

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12P 19/34 C12N 15/11

C12N 15/52 C07H 21/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310109569.3

[43] 公开日 2004年12月8日

[11] 公开号 CN 1552905A

[22] 申请日 2003.12.18

[21] 申请号 200310109569.3

[71] 申请人 中国农业科学院茶叶研究所

地址 310008 浙江省杭州市西湖区云栖路1号

[72] 发明人 赵丽萍 陈亮 高其康

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 韩介梅

权利要求书2页 说明书21页

[54] 发明名称 一类茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签及其生物芯片

[57] 摘要

本发明公开了一类茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签及其生物芯片。表达序列标签具有SEQ ID No.1~SEQ ID No.2所示的序列;所示2条序列中的一条或数条的组合;每条序列的互补序列或同源序列;每条序列中8~100个连续核苷酸为探针的序列或其互补序列。运用表达序列标签技术对构建的茶树互补脱氧核糖核酸(cDNA)文库进行脱氧核糖核酸序列测定,获得的表达序列标签通过剔除冗余序列、互联网数据库进行检索、分类,富集非冗余序列,获得了2条茶树胱硫醚- γ -合成酶表达序列标签,本发明应用于作物种质资源的鉴定评价、作物杂种优势的早期预测、作物育种和新品种的产生与鉴定、植物抗逆性的研究、植物单核苷酸多态性(SNP)的检定、转基因农产品的安全性检测、新型除草剂和新型农药的筛选等。

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1. 一类分离出的茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签的序列，其特征在于：表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；所示 2 条序列中的一条或数条的组合；每条序列的互补序列或同源序列；每条序列中 8~100 个连续核苷酸为探针的序列或其互补序列。

2. 根据权利要求 1 所述的一类分离出的茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签的序列，其特征在于，它的制备方法为：

- 1) 茶树总 RNA 提取；
- 2) mRNA 分离与纯化；
- 3) 采用 PCR 法合成 cDNA 第一链和第二链；
- 4) cDNA 酶切、纯化，并与载体连接；
- 5) 产生噬菌体文库与质粒 cDNA 文库转化；
- 6) 重组质粒的培养和提取；
- 7) 表达序列标签序列的测定；
- 8) 剔除载体序列、冗余序列，互联网数据库进行检索、分类，获得 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 表达序列标签序列。

3. 一种由权利要求 1 所述表达序列标签所组成的生物芯片，其特征在于：在载体上结合有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；同源序列或其互补序列的核酸分子；所说的核酸分子是脱氧核糖核酸；核糖核酸和多聚寡核苷酸。

4. 根据权利要求 3 所述的一种表达序列标签的生物芯片，其特征在于，所说的芯片制备方法为：

- 1) 对 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 表达序列标签进行重新 PCR 扩增；
- 2) PCR 产物纯化处理后用于芯片制作；
- 3) 芯片由芯片点样仪点制。

5. 根据权利要求 3 所述的一种表达序列标签的生物芯片，其特征在于：所说的载体为固相载体或液相载体。

6. 根据权利要求 3 所述的一种表达序列标签的生物芯片，其特征在于：所说的固相载体为玻片、硅片、尼龙膜、硝酸纤维素膜、凝胶。

7. 一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测，其特征在于：利用表达序列标签具有

SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；所示的序列中的一条或数条的组合；每条序列的互补序列或同源序列；每条序列中的 8~100 个连续核苷酸序列或其互补序列作为基因表达分析检测的探针。

8. 根据权利要求 7 所述的一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测，其特征在于：所说的茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测方法，它的步骤为：

- 1)靶基因组织总 RNA 或 mRNA 的提取；
- 2)甲醛凝胶变性电泳分离 RNA；
- 3)将变性电泳后的 RNA 转移至尼龙膜或硝酸纤维素膜；
- 4)利用 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、同源序列、互补序列、8-100 个核苷酸序列为探针，采用同位素法制备探针；
- 5)探针与靶基因杂交、放射自显影，通过定性、定量比较杂交图谱，可以明确基因是否表达、表达的活性是上调还是下调。

9. 一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆，其特征在于：利用表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、所示的序列中的一条或数条的组合、每条序列的互补序列或同源序列、每条序列中的 30~100 个连续核苷酸为探针的序列或其互补序列来合成 PCR 扩增的基因特异引物、扩增胱硫醚- γ -合成酶基因全长的 5'或 3'引物。

10. 根据权利要求 9 所述的一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆，其特征在于：所说的茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆方法，它的步骤为：

- 1)总 RNA 的提取和 mRNA 的分离；
- 2)PCR 法合成 5'或 3' cDNA；
- 3)利用表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、同源序列、互补序列或 30~100 个连续核苷酸来合成基因特异引物，PCR 快速扩增末端 cDNA；
- 4)Southern 杂交或克隆测序鉴定 PCR 产物的特性；
- 5)当 PCR 产物被部分或全部测序所鉴定后，以 5' cDNA 为模板，用表达序列标签 5'或 3'设计的引物，采用长距离 PCR 扩增获得基因全长。

一类茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签及其生物芯片

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一类茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签及其生物芯片。胱硫醚- γ -合成酶是氨基乙酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径中的重要酶类。

背景技术

生物体基因组中可转录表达的序列(即基因)仅占总序列的 2%左右，对这部分序列进行测定，将直接导致新基因的发现，并获取基因组中与产业化关系最为密切的信息。20 世纪 80 年代，高通量的自动测序的出现，使从质粒互补脱氧核糖核酸 (Complementary DNA, 简称 cDNA, 下同)文库随机选取许多 cDNA 克隆和测定来自非载体两端的几百个碱基(Base Pair, 简称 bp, 下同)的脱氧核糖核酸(简称 DNA, 下同)序列成为可能。这些短的 DNA 序列叫作“表达序列标签”(Expressed Sequence Tags, 简称 ESTs)。表达序列标签的概念最早是由 Adams 等在 1991 年提出来的 (*Science*, 252(5013): 1651-1656)。随后 Venter 等(1991) (*Science*, 252(5013): 1651-1656)创立了大规模表达序列标签技术，其基本特征就是从以质粒为载体，构建完成的组织的 cDNA 文库中，随机选择许多 cDNA 克隆，利用质粒上携带的通用引物对 cDNA 两端进行一轮脱氧核糖核酸序列测定，所获得的来自 3'端或 5'端的几百个碱基的非载体短脱氧核糖核酸序列。1992 年 Sikela 和 Matsubara (Sikela, *et al. Nucleic Acids Research* 19, 1837-1843; Matsubara, *et al. Nature Genetics*, 2, 173-179) 针对获得大量信使核糖核酸(mRNA, 下同)序列的迫切需要，提出大规模 cDNA 测序的研究战略。简而言之，表达序列标签是来自表达基因片段 3'端或 5'端的短脱氧核糖核酸序列(通常为 300-500 bp)，代表一个特定组织或发育阶段的表达基因部分转录片段。表达序列标签技术对于基因组研究缺乏的物种，如茶树，具有特别重要的意义和价值。

根据表达标签序列提供的序列信息设计合成基因特异引物(Gene specific primer, GSP)在使用 Oligo (dT)对 mRNA 进行反转录的同时加上锚定引物(Anchored primer)，然后在总 RNA 中，采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification cDNA ends)技术，获得目的基因的全长序列。也可以用该标签序列提供的信息设计引物，合成探针对 cDNA 文库进行筛选，挑取最长的阳性克隆进行测序，以期获得目的基因。邢桂春等(*中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(2)203-208)用电子延伸结合 cDNA 末端快速扩增技术克隆出了肿瘤相关 MAGE 基因家族的一个新基因

MAGE-D1; 罗瑛等(*生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(2)188-191)据表达序列标签序列设计巢式PCR引物, 成功分离了*RIG1*基因的全序列; Qian J等(*Acta Biochem Biophys Scnica*, 2001, 33(2): 147- 152)用一个与泛蛋白途径相关的表达序列标签序列, 结合RACE-PCR技术分离了*UBAP1*基因全长。

随着生物技术和生命科学发展的需要以及表达序列标签固有的特点, 近几年, 人们发明了生物芯片。生物芯片(Biochips)的实质就是在面积不大的基片上有序地点阵排列了一系列固定于一定位置地可寻址的生物识别分子(Lipshutz, RJ *et al. Bio Techniques* 19(1995), 442-447; Fodor, SP *et al. Nature* 364(1993), 555-556; Fodor, SP *et al. Science* 251(1991), 767-773; Pease, AC *et al. Proceedings of National Academy of Science, USA* 91(1994), 5022-5026)。由于最初的生物芯片主要是用于DNA序列测定、基因表达谱鉴定(Lockhart, DJ *et al. Nature Biotechnology* 14(1996), 1675-1680)、基因突变体的检测和分析(Feriotto, G *et al., Human Mutation* 13(1999), 390-400; Hacia, JG *et al. Nature Genetics* 21 (suppl 1) (1999), 42-47; Hacia, JG *et al. Nature Genetics* 22(1999), 164-167; Nilsson, P *et al. Bio Techniques* 26(1999), 308-316), 所以又称为DNA芯片或生物芯片。目前, 这一技术已扩展至免疫反应、受体结合等非核酸领域, 因此生物芯片已超出了原来的范围。如今生物芯片主要包括cDNA微阵列、寡核苷酸微阵列、动电微阵列、蛋白质芯片和免疫芯片等, 还出现了组织芯片、细胞芯片、多肽芯片、质谱芯片和电芯片等新的品种和技术。

1995年10月P. Brown和他的同事(*Bio Techniques*, 19(1995), 442-447)提出了cDNA微阵列技术, M. Schena (*Science* 270(1995), 467-470)和D. Shalon(*Genome Research* 6 (1996), 639-645)等首次制造了cDNA阵列, 随后这项技术得到了飞速的发展。运用生物芯片技术, 将获得的芯片运用杂交技术和扫描技术对生物芯片进行芯片处理、有效数据提取、分析和报告, 可获得相应的基因表达谱(Gene expression profiling)。目前DNA芯片因具有强有力性、灵活性、敏感性和相对简单等特点而被应用在许多领域, 如: DNA序列测定、基因多态性检测(Wang, *et al. Science* 280(1998), 1077-1082; Nalushka, *et al. Nature Genetics* 22(1999), 239-247)、新基因的发现、疫苗和药物研究、植物的抗逆性研究(Schenk, PM *et al. Proceedings of National Academy of Science, USA*, 97(2000), 11655-11660)、有机体的发育、调节细胞功能的基因的协调性研究、检测不同发育时期不同组织中基因的波动性活动等。分析基因组规模化的基因表达数据, 将最终导致对细胞分化的整体性观察, 涉及细胞增殖、细胞死亡、能量代谢、胞间和胞内信号传导、免疫反应的产生、细胞迁移的基因组分子图谱等。表达序列标签的生物芯片用于生物功能的研究和检测平台。生物包括动物、植物以及它们的器官、植

物的种子、动植物细胞和它们的产物；所说的生物功能的研究包括基因药物、疫苗、植物的抗逆性、动植物育种和植物新品种的产生、动植物生长和发育的机理和药物的毒理学；生物功能的检测包括转基因植物的安全性检测、食物成分的功能性评估、病原体的检测和诊断、生物物种的鉴定，包括动植物和微生物。抗逆性包括抗干旱、抗病害、抗虫害、抗低温和抗盐碱的特性。

通过对茶树胱硫醚- γ -合成酶表达序列标签及其构成的生物芯片进行基因表达分析，有助于发现并克隆基因家族新成员、基因定位克隆、作为序列标签位点(Sequence-Tagged Sites, 简称 STSs)进行染色体的基因定位和基因图谱制作、遗传突变位点的鉴定、分析基因在不同组织中的表达特异性和建立 DNA 物理图谱和对细胞和有机体的整体研究等。正因为表达序列标签具有如此的优越性，因此表达序列标签测序已经成为许多基因组研究机构的工作重点。

发明内容

本发明一个目的是提供一类茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签及其生物芯片。

本发明另一个目的是提供一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测。

本发明另一个目的是提供一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆。

一类分离出的茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签的序列：表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；所示 2 条序列中的一条或数条的组合；每条序列的互补序列或同源序列；每条序列中 8~100 个连续核苷酸为探针的序列或其互补序列。

它的制备方法为：

- 1)茶树总核糖核酸(RNA)提取；
- 2)信使核糖核酸(mRNA)分离与纯化；
- 3)采用聚合酶链反应(PCR)法合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)第一链和第二链；
- 4)cDNA 酶切、纯化，并与载体连接；
- 5)产生噬菌体文库与质粒 cDNA 文库转化；
- 6)重组质粒的培养和提取；
- 7)表达序列标签序列的测定；
- 8)剔除载体序列、冗余序列，互联网数据库进行检索、分类，获得 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 表达序列标签序列。

一种由权利要求 1 所述表达序列标签所组成的生物芯片：在载体上结合有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；同源序列或其互补序列的核酸分子；所说的核酸分子是脱氧核糖核酸；核糖核酸和多聚寡核苷酸。

所说的芯片制备方法为：

- 1)对 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 表达序列标签进行重新 PCR 扩增；
- 2)PCR 产物纯化处理后用于芯片制作；
- 3)芯片由芯片点样仪点制。

所说的载体为固相载体或液相载体；固相载体为玻片、硅片、尼龙膜、硝酸纤维素膜、凝胶。

一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测：利用表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列；所示的序列中的一条或数条的组合；每条序列的互补序列或同源序列；每条序列中的 8~100 个连续核苷酸序列或其互补序列作为基因表达分析检测的探针。

茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测方法的步骤为：

- 1)靶基因组织总 RNA 或 mRNA 的提取；
- 2)甲醛凝胶变性电泳分离 RNA；
- 3)将变性电泳后的 RNA 转移至尼龙膜或硝酸纤维素膜；
- 4)利用 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、同源序列、互补序列、8-100 个核苷酸序列为探针，采用同位素法制备探针；
- 5)探针与靶基因杂交、放射自显影，通过定性、定量比较杂交图谱，可以明确基因是否表达、表达的活性是上调还是下调。

一种茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆：利用表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、所示的序列中的一条或数条的组合、每条序列的互补序列或同源序列、每条序列中的 30~100 个连续核苷酸为探针的序列或其互补序列来合成 PCR 扩增的基因特异引物、扩增微管蛋白基因全长的 5'或 3'引物。

茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆方法的步骤为：

- 1)总 RNA 的提取和 mRNA 的分离；
- 2)PCR 法合成 5'或 3' cDNA；
- 3)利用表达序列标签具有 SEQ ID No. 1~SEQ ID No.2 所示的序列、同源序列、互补序列或 30~100 个连续核苷酸来合成基因特异引物，PCR 快速扩增末端 cDNA；
- 4)Southern 杂交或克隆测序鉴定 PCR 产物的特性；
- 5)当 PCR 产物被部分或全部测序所鉴定后，以 5' cDNA 为模板，用表达序列标签 5'或 3'设计的引物，采用长距离 PCR 扩增获得基因全长。

本发明的优点是：

1.用获得的表达序列标签制成表达序列标签芯片具有许多商用价值和科研价值：(1)应用该表达序列标签芯片可用于作物种质资源的鉴定评价。(2)应用该生物芯片也可用于对农作物的杂种优势进行早期预测，筛选出最佳的优势杂交种。(3)应用该生物芯片也能用于对转基因农产品进行商品检验，以检验可食转基因产品的安全性。(4)应用该生物芯片还可用于查找药物的毒性和副作用，进行毒理学研究，利于对新型除草剂和新型农药的筛选。(5)该生物芯片可用于植物的育种和植物新品种的产生。(6)该生物芯片还可用于从整体上研究整个信使核糖核酸(mRNA)的表达，这对生物体基因调节的整体性研究具有重要的科研和实践指导价值。(7)应用该生物芯片还可以运用突变体研究植物中胞间和胞内信号传导，为发现植物中的基因功能和生理代谢途径提供重要的理论依据。(8)该生物芯片能够作为一种商品，广泛应用于农业、林业科学研究和实际生产中。

2.应用这些表达序列标签可进行茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的表达分析检测。通过对茶树基因的分析，经过与这些表达序列标签的比较，可以判定茶树胱硫醚- γ -合成酶基因是否表达以及表达的强弱，表达是上调，还是下调。

3.应用这些表达序列标签可进行茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆。采用 PCR 技术，根据表达序列标签所提供的序列信息来合成茶树胱硫醚- γ -合成酶基因 PCR 反应的基因特异引物以及 PCR 扩增基因全长的 5'和 3'引物，非常容易获得茶树胱硫醚- γ -合成酶的全长基因。

4.还可以利用这些表达序列标签绘制基因图谱。如果一个表达序列标签在基因组中只出现一次，那么它可以做为序列标签位点。由表达序列标签构建的物理图谱叫表达图或转录图(expression or transcript maps)。利用表达序列标签进行基因图制作，可以加快序列标签位点的制作和新基因的染色体定位。

5.表达序列标签序列可以作为基因特异性探针，对组织特异性基因表达的研究具有重要的作用。

6.这些新的表达序列标签丰富了表达序列标签数据库，并可以最大限度地利用公开的表达序列标签数据库信息，大大缩短克隆新的全长互补脱氧核糖核酸的周期并可减少克隆的成本，加快生物信息积累较薄弱的茶树基因克隆进度。

7.表达序列标签还可进行新基因的遗传进化关系分析。表达序列标签可以对所有动植物的基因作为一种标签库，通过不同的序列比较可以获得保守序列片段，从而获得基因的遗传进化图谱。

具体实施方式

实施例 1, cDNA 文库的构建

一、茶树总 RNA 的提取

春天取生长健壮的茶树嫩叶 100 mg, 迅速加液氮冷冻研磨成细粉末状, 加入 1000 μL Trizol 试剂(购自 Gibco BRL)继续研磨后, 又再加入 1000 μL Trizol 试剂, 混匀分装到两个经焦炭酸二乙酯处理的 1.5 mL 离心管中, 冰上放置 5 分钟, 各加入 200 μL 的氯仿, 颠倒混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 转/分钟离心 10 分钟, 取 500 μL 上清液, 加入等体积的异丙醇, 上下轻轻颠倒 10 次, 室温放置 10 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 转/分钟离心 10 分钟, 去上清, 沉淀中加入 1 mL 75%乙醇轻轻清洗, 倒去乙醇, 干燥后加入 20 μL 经焦炭酸二乙酯处理过的双蒸水溶解沉淀。甲醛凝胶变性电泳检测 RNA 质量, RNA 3.5 μL 中加入上样缓冲液(1 mL: 由 45%甲酰胺 545 μL 、37%甲醛 196 μL 、 $10\times$ 3-(*N*-玛林代)丙磺酸 121 μL 、80%甘油 76 μL 和 10%溴酚兰 62 μL 配制)16.5 μL , 混匀后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 分钟后, 迅速放入冰浴中, 防止退火。电泳时, 电泳槽置于冰上, 保证低温, 电压不超过 5v/cm。RNA 可放于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中长期保存, 备用。

二、mRNA 的分离和纯化

1. 生物素标记的 Oligo(dT)探针与 mRNA 的退火

在经焦炭酸二乙酯处理不含 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中加入 0.5 mg 总 RNA, 溶解于 500 μL 焦炭酸二乙酯处理水中, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 分钟, 加入 3 μL 的 Oligo(dT)探针, 13 μL 的 20 \times SSC (1 L 20 \times SSC 含: 175.3g 氯化钠和 88.2g 柠檬酸钠, pH 7.0)轻轻混匀, 室温放置约 10-20 分钟至冷却。

2. 亲和素顺磁磁珠的冲洗

将一管亲和素顺磁磁珠(购自 Promega Corporation)轻轻悬浮后放入磁性分离架中, 使亲和素顺磁磁珠集中到管的一侧, 小心除去上清, 用 300 μL 0.5 \times SSC 清洗亲和素顺磁磁珠三次, 每次用磁性分离架集中磁珠, 去除上清液, 将清洗过的亲和素顺磁磁珠溶于 100 μL 的 0.5 \times SSC 中备用。

3. 杂交体的生成和漂洗

将已退火的生物素标记探针, 加入到溶于 100 μL 的 0.5 \times SSC 的亲和素顺磁磁珠中, 轻轻混匀, 室温放置 10 分钟, 每隔 1-2 分钟轻混匀一次, 用磁性分离架捕获磁珠亲和素顺磁磁珠, 小心去除上清, 用 300 μL 的 0.1 \times SSC 洗涤亲和素顺磁磁珠, 磁性分离架集中后去除上清液, 共重复 4 次。

4. 洗脱 mRNA

将漂洗过的亲和素顺磁磁珠重新悬浮于 100 μL 的焦炭酸二乙酯水中, 用磁性分离架捕获磁珠, 将洗脱的水相吸至一新管中, 重复清洗亲和素顺磁磁珠, 共得到 250 μL 的 mRNA。

5. mRNA 的沉淀和溶解

加入 0.1×体积的醋酸钠(pH 5.2)和 1×体积的异丙醇沉淀 mRNA, -20℃过夜。12000 转/分钟离心 10 分钟, 去上清。加入 1 mL 的 75%的乙醇悬浮后, 离心片刻, 去上清, 干燥, 复溶于 30 μL 的焦炭酸二乙酯处理的水中。3.5 μL mRNA 加入 16.5 μL 上样缓冲液(按 7: 33 配)混匀后在 95℃变性 2 分钟, 拿出后立即放入冰上, 防止退火, 甲醛凝胶变性电泳时, 电泳槽置于冰上, 保证低温。电压不超过 5v/cm。

三、cDNA 文库的构建

(一)cDNA 第一链合成

在 0.5 mL 的离心管中, 分别加入 3 μL 的茶树 mRNA, 1 μL 10 μM 5'PCR 第一链合成引物(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGG CCGGG-3'), 1 μL 10 μM 3' PCR 引物(5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGC CGACATG- d(T)₃₀N₁N-3') (N=A, G, C 或者 T; N₁=A, G, C)。混匀, 稍离心, 72℃温育 2 分钟, 冰上冷却 2 分钟, 离心把组分收集到底部, 每管中加入 2 μL 5×第一链合成缓冲液(250 mM Tris, pH8.3, 30 mM 氯化镁, 375 mM 氯化钾), 1μL 二硫苏糖醇(20 mM), 1μL dNTP 混合物(10 mM), 1 μL 反转录酶, 至总体积为 10 μL。经涡旋、瞬间离心混匀, 在 PTC-220 PCR 仪(MJ Research, Inc.)中 42℃温育 1 小时后, 取出放于冰上, 终止第一链的合成。放于-20℃冰箱中可保存 3 个月, 备用。

(二)cDNA 第二链的合成

先把 PCR 仪加热到 95℃。在一个 0.5 mL 的离心管中加入 2 μL 第一链 cDNA, 80 μL 无离子水, 10 μL 10×PCR 缓冲液, 2 μL 50×dNTP mix, 2 μL 10 μM 5' PCR 第二链合成引物(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCA GAGT-3'), 2 μL 3'PCR 引物(5'-ATTCT AGAGG CCGAGGCGGCCGACA TG-d(T)₃₀N₁N-3') (N=A, G, C 或者 T; N₁=A, G, C), 2 μL 50×聚合酶混合物至总体积为 100 μL, 轻轻振动混匀, 稍离心, 将物质收集到底部, 必要时加 2 滴矿物油以覆盖液面。放进经预热到 95℃的 PCR 仪中, PCR 反应程序如下: 95℃变性 20 秒, 接着 95℃ 5 秒, 68℃ 6 分钟共 24 个循环, PCR 结束后, 取 5 μL 用 1.1%琼脂糖凝胶在 0.5 ×TBE (45 mM Tris-硼酸, 1 mM 乙二胺四乙酸, pH8.0)中电泳。其余放于-20℃冰箱可保存 3 个月。

(三)蛋白消化及 cDNA 纯化

1. 取 75 μL cDNA 加到一个 0.5 mL 的管中, 加 2 μL 的蛋白酶 K(20 μg/μL)。
2. 45℃温育 20 分钟
3. 取出后, 离心一下, 将组分收集到管底

4. 加入 23 μL 的无离子水, 保证总体积为 100 μL
5. 加入等体积充分混匀的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, v/v/v), 来回混匀 1-2 分钟
6. 14000 转/分钟离心 5 分钟
7. 离心后有三层, 取上层到一个新的 0.5 mL 的管中
8. 加入 100 μL 的氯仿: 异戊醇(24:1, v/v)来回混匀 1-2 分钟
9. 14000 转/分钟离心 5 分钟
10. 取上清液
11. 加入 10 μL 的醋酸钠 (3M, pH4.8)、1.3 μL 糖原 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 260 μL 95%乙醇。迅速以 14000 转/分钟室温离心 20 分钟
12. 小心除去上清
13. 用 100 μL 80%的乙醇洗涤沉淀
14. 干燥约 10 分钟去除残留的乙醇
15. 加入 79 μL 的无离子水, 悬浮沉淀

(四)*Sfi* I 酶切获得可连接的 cDNA

1. 在一个 0.5 mL 的离心管中加入, 79 μL cDNA(经蛋白酶 K 消化), 10 μL 10 \times *Sfi* I 缓冲液, 10 μL *Sfi* I 内切酶(20 单位/ μL), 1 μL 100 \times 牛血清白蛋白充分混匀
2. 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 2 小时, 取出后放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中
3. 分离时再加入 2 μL 1% 二甲苯青, 充分混匀

(五)建库用 cDNA 分离

1. 准备 16 个 1.5 mL 离心管
2. 准备 CHROMA SPIN-400 柱(购自 Clontech Laboratories, Inc.)
 - 1)将 CHROMA SPIN-400 从 4 $^{\circ}\text{C}$ 中取出, 在室温下放置 1 小时, 颠倒数次彻底悬浮胶体;
 - 2)从柱中除去气泡, 用 1000 μL 的移液器轻轻悬浮胶体, 避免产生气泡。拿走底部的盖, 让柱体自然流下。(如 3 分钟之后不流了, 盖上上面的盖, 会使柱体继续流下);
 - 3)铁夹夹住柱子;
 - 4)贮存缓冲液通过柱子自然流下, 直至能看到柱体中胶的表面, 胶的高度应在 1 mL 标记处。如果少的话, 可以用其它柱中的胶来调整;
 - 5)流速大约为 1 滴/40-60 秒, 1 滴约为 40 μL 。(如果流速太低, <1 滴/100 秒, 或者每滴的体积<25 μL 必须重新悬浮, 重复上述步骤)
3. 贮存缓冲液流完后, 靠柱内边缘小心加入 700 μL 的柱子缓冲液, 直到流光。

4. 当柱子缓冲液流完后(约 15-20 分钟),小心将约 100 μL 经 *Sfi* I 酶切的 cDNA 和二甲苯青的混合物加到胶顶部中心部位的表面,不光滑的胶表面不会影响下面的分离。
5. 进行下一步之前,让样品充分进入胶内(在胶表面没有残留的液体)。
6. 用 100 μL 的柱子缓冲液清洗含有 cDNA 的管,再轻倒入胶表面。
7. 让缓冲液流光,当停止时,继续下一步,让染料层进入胶内几毫米。
8. 将放有 16 个管子的架子放在柱子下面,第一个管子正在柱子下的出口。
9. 加 600 μL 的柱子缓冲液,立即开始收集,每管 35 μL (约 1 滴),收集后的管子立即加盖,当都收集完后,盖上柱子的盖子。
10. 在进行实验前,检查每个管子的组分,在 1.1%的琼脂糖/EB 胶上电泳,每管用 3 μL 连续在点样孔加样,用 1 kb DNA Marker 作分子量标记,150 V 电泳 10 分钟。收集最亮的 3-4 个组分到一个新 1.5 mL 的管中。
11. 将 1/10 体积醋酸钠 (3M; pH4.8), 1.3 μL 糖原(20 mg/mL), 2.5 体积 95%乙醇(-20 $^{\circ}\text{C}$)混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
12. 室温 14000 转/分钟离心 20 分钟。
13. 小心去上清。
14. 轻离心,去剩余的上清,干燥约 10 分钟。
15. 溶于 7 μL 的无离子水,轻轻混匀。这些 *Sfi* I 酶切的 cDNA 现在已经可以与经 *Sfi* I 酶切的 λ TripIEx2 载体(购自 Clontech Laboratories, Inc.)连接。

(六)cDNA 与载体连接

1. 按下列组分准备一个连接反应	对照(μL)	样品(μL)
cDNA	0	1.0
λ TripIEx2 载体(500 ng/ μL)	1.0	1.0
10 \times 连接酶缓冲液	0.5	0.5
ATP (10 mM)	0.5	0.5
T ₄ DNA 连接酶(400 单位/ μL)	0.5	0.5
无离子水	2.5	1.5
总体积	5.0	5.0

其中 10 \times 连接酶缓冲液由 500 mM Tris-盐酸, pH 7.8, 100 mM 氯化镁, 100 mM 二硫苏糖醇, 0.5 mg/mL 牛血清白蛋白组成。

2. 轻轻混匀,避免产生气泡,瞬间离心使组分沉到底部,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜
3. 对于每一个连接,做一个包装反应。

(七)包装反应

1. 在每一个连接产物中加入 25 μL 的包装蛋白。
2. 30 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 分钟。
3. 取出放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 2 周。经过扩增的文库可以在 4 $^{\circ}\text{C}$ 稳定保存 6-7 个月，或在 7% 二甲基亚砷中 -70 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存 1 年以上。

(八)测定滴度

1. 原始和工作平板的制备

为复苏冰冻细胞，取 5 μL 冰冻的大肠杆菌细胞 XL1-Blue 在含氨卞青霉素的 LB 平板(1L LB: 蛋白胨 10 g, 酵母 5g, 氯化钠 5 g, 琼脂糖 15 g, pH7.0 高压灭菌 20 分钟)上划线，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后，作为原始平板，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 2 周。从原始平板中挑取单克隆在另一个含氨卞青霉素的 LB/硫酸镁 (1L LB/硫酸镁含: 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, 氯化钠 5 g, 10 mM 硫酸镁, 琼脂 15 g, pH 7.0, 高压灭菌 20 分钟)平板上涂板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后，作为工作平板。

2. 未扩增文库的滴度测定

从工作平板中挑取分离良好的单克隆接种到含 15 mL LB/硫酸镁/麦芽糖培养基(1L 含: 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, 氯化钠 5 g, 10 mM 硫酸镁, 琼脂 15 g, 0.2% 麦芽糖, pH 7.0, 高压灭菌 20 分钟)的 50 mL 试管中，140 转/分钟震荡 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜直至 OD 值达到 2.0，5000 转/分钟离心 5 分钟，去上清液，用 7.5 mL 10 mM 硫酸镁重新悬浮沉淀。将包装产物用噬菌体缓冲液稀释 5-20 倍，在 200 μL 过夜培养的 XL-1Blue 受体菌中加入 1 μL 稀释的噬菌体，让噬菌体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 吸收 10-15 分钟，再加入 2 mL 溶解的 LB/硫酸镁顶层琼脂。快速颠倒混匀并倒入经 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB/硫酸镁平板，快速摇动平板使均匀分布，室温冷却 10 分钟让顶层琼脂变硬，倒置平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6-17 小时，统计菌斑并根据公式：文库滴度 (pfu/mL)=(噬菌斑数 \times 稀释倍数)/受体菌的体积，计算未扩增文库滴度 6.8×10^5 pfu/mL，总克隆数为 3.5×10^5 个。

(九)文库重组率的测定

本文库可以利用 X-Gal 显色原理测定重组率，在测定滴度时加入 100 mM 的 IPTG 及 100 mM 的 X-Gal，过夜培养后，通过蓝斑(未重组克隆)、白斑(重组克隆)的数量计算重组率为 98.05%。

(十)cDNA 插入片段的 PCR 鉴定

从 LB 平板上随机挑取 15-20 个独立的噬菌斑，分别加到含有 200 μL 噬菌体缓冲液的离心管中，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 小时后，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，利用 λ TripEX2 噬菌体 5' PCR 引物 (5'-CTCCGAGATCTGGACGAGCT-3')和 3' PCR 引物(5'-GGGATATCACTCAG CATAAT-3')对构建的文库进行 PCR 鉴定。PCR 反应体积为 20 μL ，其中的组成为：含单克隆噬菌斑的稀

释液 2 μL , 25 mM 镁离子 1.4 μL , 10 μM 核苷酸 0.4 μL , 10 \times PCR 缓冲液 2 μL , 10 μM 5' 及 3'引物分别 0.1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL , 去离子水 13.9 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 分钟, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 分钟, 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟。反应在 PCR 仪(PTC-225 型, MJ Research, Inc.)上进行。PCR 结果表明插入片段大多分布在 0.5-2.0 kb 之间, 绝大部分在 1.0-1.5 kb 左右。

(十一)cDNA 文库的扩增、滴度测定

从工作平板中挑取分离良好的 XL1-Blue 单克隆接种到含 15 mL 的 LB/硫酸镁/麦芽糖培养基的 50 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 140 转/分钟震荡培养过夜至 OD 值达到 2.0。5000 转/分钟离心 5 分钟, 去上清液, 用 7.5 mL 10 mM 硫酸镁重新悬浮沉淀。在 7 mL 试管中加入 500 μL 细菌培养液和足够稀释过的溶菌物, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温育 15 分钟, 加 4.5 mL 熔化的 LB/硫酸镁软顶层琼脂(1L 含: 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, 氯化钠 5 g, 10 mM 硫酸镁, 琼脂 7.2 g, pH 7.0, 高压灭菌 20 分钟), 快速混合并倾倒细菌/噬菌体混合物到 LB/硫酸镁平板上, 使琼脂均匀铺于平板上。室温冷却 10 分钟, 使顶层琼脂变硬, 倒置平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6-18 小时直至菌落长至相互接触。加入 12 mL 1 \times Lambda 稀释缓冲液(0.1 M 氯化钠, 10 mM 硫酸镁 \cdot 7H₂O, 35 mM Tris-盐酸, 0.01%明胶)于每个平板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 一个平板可以成为一个扩增文库的溶菌物。平板在室温 50 转/分钟震荡 1 小时后倒入一个已灭菌的广口瓶。为去除细胞碎片和裂解剩余的完整细胞, 充分混合噬菌体裂解物并倒入一个 50 mL 聚丙烯带盖的灭菌离心管中, 加入 10 mL 氯仿盖紧盖子, 涡旋 2 分钟后, 7000 转/分钟离心 10 分钟, 上清液转移至另一个灭菌的 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 并按前述方法测定扩增后文库的滴度为 7.2×10^9 pfu/mL。

把经扩增的文库分装成 1 mL, 加入终浓度 7%的二甲基亚砷于-70 $^{\circ}\text{C}$ 可长期保存, 尽量避免多次冻融过程。

(十二)cDNA 质粒文库的产生

在 LB 固体培养基上加入 5 μL DH12S 菌液, 涂板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取其单克隆到含有 10 mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 140 转/分钟培养至 OD 值为 1.2。取出后加入氯化镁至终浓度为 10 mM, 混匀, 取 1 μL 噬菌体 cDNA 文库与 100 μL 的 DH12S 菌液混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 分钟, 然后加入 700 μL SOC 培养基(1L SOC 含: 细菌培养用胰化蛋白胨 20 g, 细菌培养用酵母提取物 5 g, 氯化钠 0.5 g, 2.5 mM 氯化钾, 10 mM 氯化镁, 20 mM 葡萄糖, pH 7.0, 高压灭菌 20 分钟)37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 45 分钟, 获得质粒文库, 取出放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

实施例 2, 表达序列标签测序和获得

(一)质粒的培养和提取

1. 将获得的 cDNA 质粒文库稀释, 进行梯度试验, 选出最佳稀释浓度。

2. 在 LB 固体培养基(1L LB 含: 蛋白胨 10 g, 酵母 5g, 氯化钠 5 g, 琼脂糖 15 g, pH7.0, 高压灭菌 20 分钟)上涂板。
3. 37°C 培养 12-16 小时左右, 直至长出菌落。
4. 将菌落接种在 96 孔板上, 每孔加入 1mL LB(含氨卞青霉素)(1L: 蛋白胨 10g, 酵母 5g, 氯化钠 5g, 氨卞青霉素终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)接种单细菌克隆。37°C 培养 16-18 小时左右。
5. 保存菌种, 3000 转/分钟离心 5 分钟, 弃去上清液, 收集细胞。
6. 加入 200 μL 溶液 I (50mM Tris-盐酸, pH8.0, 10mM 乙二胺四乙酸, 0.1mg/mL RNA 酶, 4°C), 用胶带封口, 振荡混匀。
7. 加入 200 μL 溶液 II (0.2N 氢氧化钠, 1% 十二烷基硫酸钠, 室温), 用新胶带封口, 翻转混合 10 次。此时裂解液应该透明、粘稠, 不含细菌碎片。
8. 加入 200 μL 溶液 III (3 M 醋酸钾, 冰醋酸调节 pH 至 5.5, 4°C), 用新胶带封口, 翻转混合 10 次。
9. 沸水浴 5 分钟。
10. 冰浴 10 分钟。
11. 4000 转/分钟离心 20 分钟, 上清液全部转入下面的深孔板中。
12. 取下深孔板, 加入 300 μL 异丙醇溶液, 用胶带封口, 立即翻转混合 3 次。离心 15 分钟(4000 转/分钟), 沉淀 DNA。
13. 去掉上清, 加入 300 μL 70%乙醇, 4000 转/分钟离心 5 分钟。
14. 用水重新溶解 DNA, -20°C 保存备用。

(二)测序 PCR 反应和序列测定

1. 用水稀释 5'测序引物 (5'-CTCCGAGATCT GGACGAGC T-3')。注意: 加到每个反应的 DNA 和引物的体积要依赖于他们的浓度。调整加入的无菌水的量, 反应混合物的终体积是 20 μL 。
2. 在 96 孔板上, 将要测序的每个模板加入下列试剂: DYEnamic ET 终止子试剂预先混合物 8 μL , 引物 (5 μM)1 μL , DNA 模板 0.2-2 μg , 使总体积为 20 μL 。
3. 将混合物轻轻震荡充分混合。
4. 将 96 孔板封口并放到预先设计好程序的 PCR 热循环仪上。
5. 按照下列条件进行聚合酶链式反应, 95°C, 20 秒, 50°C, 15 秒, 60°C, 1 分钟, 共 32 个循环。
6. 循环完成后, 简单离心收集管子底部的溶液。

7. 每个反应管中加 1 μL 7.5 M 乙酸铵, 27.5 μL 无水乙醇, 5 μL 去离子水。
8. 4000 转/分钟离心 40 分钟。
9. 除掉上清液。
10. 每个反应管中加 50 μL 70%的乙醇, 并混合好。
11. 4000 转/分钟离心 20 分钟。
12. 除去上清液, 真空干燥或空气干燥沉淀。不要过分干燥。
13. 将沉淀重新悬浮在 5 μL 的点样溶液中, 用力震荡 10-20 秒, 确保完全悬浮, 简单离心收集样品。
14. 将样品放入 DNA 测序仪(型号为 Megabace™ 1000, Amershan Pharmacia Biotech Inc.)中进行测序。

(三)表达序列标签的获得

1. 将序列测定结果输出。
2. 剔除载体序列和冗余序列获得表达序列标签的序列。
3. 用非冗余序列对公共表达序列标签数据库进行检索, 按功能将其分类。表达序列标签对应的克隆进行保存、备用。

实施例 3, 生物芯片的制备

一、对表达序列标签进行重新 PCR 扩增

茶树 cDNA 质粒插入片段 PCR 扩增, 反应在 PCR 仪上进行(PTC-225 型, MJ Research, Inc.), 引物为 M13 通用引物 (正向为 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3', 反向为 5'-AGCGGATAATTT CACACAGG-3'), 每 100 μL 的反应体系包括: 10 \times PCR 缓冲液 10 μL ; 25 mM 氯化镁 7 μL ; 100 ng/ μL 的正反向引物各 1 μL , 20 mM dNTPs 1 μL , 3 单位的 *Taq* DNA 聚合酶 (购自 Promega Corporation)和 15 ng 的质粒模板。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 分钟, 每个循环于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 分钟; 共 36-40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟。

二、PCR 产物处理

加入 100 μL 异丙醇和 10 μL 3 M 的醋酸钠(pH 5.2)于-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 8 小时, 4000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 40 分钟, 弃上清, 沉淀用 70%的乙醇洗涤, 干燥后溶解于 20 μL DNA 变性液(0.4 M 氢氧化钠, 10 mM 乙二胺四乙酸)。

三、芯片制备

变性液溶解后的表达序列标签用于茶树胱硫醚- γ -合成酶特异表达序列标签芯片的点制,

芯片由芯片点样仪点制，芯片的载体为玻片，所有的点点制为 36×24 一级阵，每一个点在 8 个基因构成的 4×4 的二级阵中平行两次以验证试验的重复性。

实施例 4，茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测

一、茶树总 RNA 的提取和 mRNA 纯化

取待分析的不同生长发育阶段或不同器官的茶树幼嫩材料 100-500 mg (材料多少视 RNA 含量而定)，采用实施例 1，“cDNA 文库的构建”中的“RNA 的提取”、“mRNA 的分离和纯化”所描述的流程、方法提取总 RNA，分离和纯化 mRNA 用于以下的步骤。

二、甲醛凝胶变性电泳

1. 配制 $5 \times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液：0.1M 3-(*N*-玛林代)丙磺酸 (pH 7.0)，40 mM 醋酸钠，5 mM 乙二胺四乙酸(pH 8.0)。
2. 凝胶制备：将适量的琼脂糖溶于水，冷却至 60°C ，加入 $5 \times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液至终浓度为 $1 \times$ 和 2.2 M。在通风橱内灌制凝胶，在室温放置 30 分钟以上，使凝胶凝固。
3. 在一灭菌的离心管中混合下列液体，以制备样品：总 RNA 或 mRNA $4.5 \mu\text{L}$ ， $5 \times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液 $2.0 \mu\text{L}$ ，甲醛 $3.5 \mu\text{L}$ ，甲酰胺 $10 \mu\text{L}$ 于 65°C 温育 15 分钟，冰浴冷却，离心 5 秒使管内液体集中于管底。
4. 加 $2 \mu\text{L}$ 灭菌并经焦炭酸二乙酯处理的甲醛凝胶加样缓冲液(50%甘油，1 mM 乙二胺四乙酸，pH 8.0，0.25%溴酚蓝，0.25%二甲苯青 FF)。
5. 加样前将凝胶预电泳 5 分钟，电压为 5 V/cm，随后将样品加至凝胶样孔。以已知大小的 RNA 混合物作为分子量标准参照物。
6. 将凝胶浸入 $1 \times$ 甲醛凝胶加样缓冲液中，3-4 V/cm 电压降进行电泳。
7. 电泳结束后，溴化乙锭染色，在紫外灯下照相(分子量标记旁放一把透明直尺以距离计算 RNA 分子的大小)后将 RNA 转移至膜上。

三、转膜

1. 将凝胶移至一个玻璃干烤皿内，用锋利刀片修去凝胶的无用部分，并在其右上角(加样孔一端为上)切去凝胶一小角作为以下操作的记号。
2. 用长和宽均大于凝胶的一块有机玻璃作为平台，将其放入大干烤皿内，上面放一张滤纸作为纸桥，倒入 $20 \times \text{SSC}$ 使液面略低于平台，当平台上的滤纸湿透后，用玻璃棒赶出所有的气泡。
3. 用一把锋利的裁纸刀裁一张硝酸纤维素膜或者尼龙膜，其长度和宽度应各比凝胶大 2 mm，并切去一角使之与凝胶对应。

4. 将滤膜浸入去离子水表面，直至湿透为止，随后用 20×SSC 浸泡滤膜至少 5 分钟。
5. 将凝胶翻转后置于平台上湿润的滤纸中央，两者之间不留任何气泡。
6. 用双层保鲜膜包裹凝胶四周。
7. 在凝胶上方放置湿润的滤膜，并使两者的切角重叠。
8. 用 2×SSC 溶液浸湿 2 张与凝胶同样大小的滤纸，并放置在滤膜上方，赶出所有气泡。
9. 切一叠与滤纸同样大小的纸巾，放于滤纸上方，并在纸巾上方压一块玻璃板，然后用约 500 g 重物压实。目的是建立自液池经凝胶流向滤膜的上行流路，使 RNA 在毛细管的作用下从凝胶流向并聚集在滤膜上。
10. 使上述 RNA 转膜 12-18 小时，当中更换湿纸巾一次。
11. 转移结束后，揭去凝胶上方的纸巾和滤纸，从凝胶上剥离滤膜。以 5×SSC 溶液浸泡滤膜 5 分钟，于室温干燥 30 分钟以上。
12. 将晾干的滤膜放在两张滤纸之间，在 80℃ 烤箱中干烤 2-3 小时。

四、探针的制备

采用实施例 3，“生物芯片的制备”中“对表达序列标签进行重新 PCR 扩增”所描述的方法和流程，对特定的表达序列标签进行 PCR 扩增，获得 15 ng/μL 的 PCR 产物作探针，用同位素标记法制备探针。

1. 混合 PCR 产物 5 μL，合成的寡核苷酸引物 5 μL。
2. 于 60℃ 加热 5 分钟，然后冷却至 4℃。
3. 加入：

100 mM 二硫苏糖醇	5 μL
10×RP 缓冲液(900 mM HEPES, pH 6.0, 100 mM 氯化镁)	5 μL
各 5 mM 的 dCTP、dGTP、dTTP 混合液	5 μL
[α- ³² P]dATP (比活度>3000 Ci/mM, 10 μCi/μL)	25 μL
DNA 聚合酶 I (Klenow)(12.5 单位)	2.5 μL

 于室温反应 5-6 小时。
4. 加入：0.5 M 乙二胺四乙酸 (pH 8.0) 1.0 μL，20% 十二烷基硫酸钠 2.5 μL。
5. 利用 Sephadex G-50 小柱进行柱层析或离心柱层析，使标记的表达序列标签与未掺入的 dNTP 分开。

五、预杂交、杂交和放射自显影

1. 在含 50%甲酰胺，5×SSPE，2×Denhardt 试剂，0.1% 十二烷基硫酸钠溶液中预杂交 1-2 个小时。

2. 在预杂交液中加入变性的已标记的探针，在适宜温度下继续温育 12-24 小时。
3. 用 $1\times$ SSC, 0.1% 十二烷基硫酸钠于室温洗膜 20 分钟，随后用 $0.2\times$ SSC、0.1% 十二烷基硫酸钠洗膜 3 次，每次 20 分钟。
4. 用医用 X 光片进行放射自显影，可于 -70°C 曝光 24-72 小时。

六、基因表达的分析检测

观察 X 光片，进行茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达分析检测，通过定性、定量比较杂交图谱，可以明确该基因是否表达、表达的活性是上调还是下调。

实施例 5，茶树胱硫醚- γ -合成酶基因的克隆

一、总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

采用实施例 1，“cDNA 文库的构建”中的“RNA 的提取”、“mRNA 的分离和纯化”所描述的流程、方法提取总 RNA，分离和纯化 mRNA 用于以下的步骤。

二、5'或 3' cDNA 的合成

1. 在 0.5 mL 灭菌离心管中混合

(1)进行 5' cDNA 合成: 1-3 μL RNA 样品, 1 μL 5'引物[5'-(T)₂₅VN-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)], 1 μL Oligo(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCG GG-3'), (2)进行 3' cDNA 合成: 1-3 μL RNA 样品, 1 μL 3'引物A(5'-AAGCAGTGGTA TCAACGCAGAG TAC(T)₃₀VN-3', (N = A, C, G, or T; V = A, G或C)

2. 加入灭菌水至每个反应的总体积为 5 μL
3. 混合样品并瞬间离心
4. 离心管在 70°C 温育 2 分钟
5. 冰上冷却 2 分钟
6. 瞬间离心收集样品到管底
7. 加入下列成分到每个离心管(已含 5 μL): 2 μL $5\times$ 第 1 链合成缓冲液(250 mM Tris-盐酸 (pH 8.3), 375 mM KCl, 30 mM MgCl_2), 1 μL 二硫苏糖醇 (20 mM), 1 μL dNTP 混合物 (10 mM), 1 μL 逆转录酶, 总体积为 10 μL
8. 用移液器轻轻混合反应成分
9. 瞬间离心收集成分到管底
10. 在 42°C 有热盖的 PCR 仪保温 1.5 小时
11. 用 Tricine-乙二胺四乙酸缓冲液稀释第一链合成反应产物: 从 <200 ng 总 RNA 开始加 20 μL , 从 >200 ng 总 RNA 开始加 100 μL , 从 mRNA 开始加 250 μL

12. 在72°C加热离心管7分钟

13. 样品能在-20°C保存3个月

三、对照 PCR 反应

1. 按每管50- μ L PCR反应体积混合下列试剂: 34.5 μ L PCR-级水, 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 1 μ L dNTP混合物(10 mM), 1 μ L 50 \times 聚合酶混合物, 总体积41.5 μ L

2. 涡旋混匀并瞬间离心

3. 按下表准备PCR反应, 顺序加入各成分到PCR管中, 轻轻混匀

反应成分	1(5'对照)(μ L)	2(3'对照)(μ L)	3(5' cDNA内部对照)(μ L)	4(3' cDNA内部对照)(μ L)
5'-cDNA对照	2.5	-	2.5	-
3'-cDNA对照	-	2.5	-	2.5
5'-TFR 引物(10 μ M)	1	-	1	1
3'-TFR 引物(10 μ M)	-	1	1	1
10 \times 通用引物混合物*	5	5	-	-
水	-	-	4	4
PCR混合物	41.5	41.5	41.5	41.5
总体积	50	50	50	50
预计长度	2.6 kb	2.9 kb	0.3 kb	0.3 kb

*10 \times 通用引物混合物: 长引物(0.4 μ M) 5'-CTAATACGACTCACTATA GGGCAAGCAG

TGGTATCAACGCAGAGT-3', 短引物(2 μ M), 5'-CTAA TACGACTCACTATAGGGC-3'

4. 在PCR管中加入2滴矿物油, 盖紧盖子。如果用有热盖的PCR仪, 可以不加矿物油。

5. 采用如下的程序, 进行热启动 PCR, 94°C 30秒, 72°C 3分钟, 5个循环, 94°C 30秒, 70°C 30秒, 72°C 3分钟, 5个循环, 94°C 30秒, 68°C 30秒, 72°C 3分钟, 27个循环

6. 取5 μ L在1.2% 琼脂糖/溴化乙锭电泳分析, 直到对照试验能工作。

四、cDNA末端快速PCR扩增

1. 按每管50- μ L PCR反应体积混合下列试剂: 34.5 μ L PCR-级水, 5 μ L 10 \times PCR缓冲液, 1 μ L dNTP 混合物(10 mM), 1 μ L 50 \times 聚合酶混合物, 总体积41.5 μ L

2. 涡旋充分混匀(避免产生气泡), 瞬间离心

3. 进行5'-PCR扩增时, 按下表准备PCR反应, 顺序加入各成分到PCR管中, 轻轻混匀: 5' cDNA 2.5 μ L, 10 \times 通用引物混合物 5 μ L, ^s基因特异引物1(10 μ M) 1 μ L, PCR混合物41.5 μ L,

总体积为50 μL 。

⁵末端快速扩增PCR必须根据已知的表达序列标签合成2个基因特异引物，5'PCR需要一个反义引物，3'PCR需要一个正义引物，它们必须满足下列条件：23–28 bp，50–70% GC含量， $T_m \geq 65^\circ\text{C}$ 可获得最佳结果，如果 $T_m > 70^\circ\text{C}$ 可采用热启动 PCR。

4. 进行3'-PCR时，按下表准备PCR反应，顺序加入各成分到PCR管中，轻轻混匀：3' cDNA 2.5 μL ，10 \times 通用引物混合物5 μL ，基因特异引物2(10 μM) 1 μL ，PCR混合物 41.5 μL ，总体积达到50 μL 。
5. 在PCR管中加2滴矿物油，盖紧盖子。如果用有热盖的PCR仪，可以不加矿物油。
6. 根据最初从总RNA或mRNA开始，正确选择如下程序的一个，进行热启动 PCR。

程序1：(如果基因特异引物 $T_m > 70^\circ\text{C}$)， 94°C 30 秒， 72°C 3分钟，5 个循环， 94°C 30秒， 70°C 30秒， 72°C 3 分钟，5个循环， 94°C 30秒， 68°C 30秒， 72°C 3分钟，20个循环(如果用mRNA)或25个循环(如果用总RNA)

程序2：(如果基因特异引物 $T_m = 60-70^\circ\text{C}$) 94°C 30秒， 68°C 30秒， 72°C 3分钟，20个循环(如果用mRNA)或25个循环(如果用总RNA)

七、PCR 产物的特性鉴定

(一)Southern杂交

1. 先进行1.2% 琼脂糖/溴化乙锭电泳，紫外灯下拍照。
2. 按照实施例4，“茶树胱硫醚- γ -合成酶基因表达的分析检测”的“转膜”程序把DNA转移到尼龙膜上。
3. 可采用末端标记的巢式基因特异引物1或2为探针。另外，如果合成的基因特异引物具有5'和3'重叠区，基因特异引物2可作为鉴定5'-PCR的探针，基因特异引物1可作为鉴定3'-PCR的探针。
4. 预杂交、杂交，并在中等严谨度下洗膜，放射自显影。

(1)把含有靶DNA的滤膜漂浮于一盘 $6\times\text{SSC}$ 液面上，上下湿润后在液体内浸泡2分钟。(2)将滤膜装入塑料袋中，按 $0.2\text{ mL}/\text{cm}^2$ 滤膜加入预杂交液($6\times\text{SSC}$ ， $0.05\times\text{Blotto}$ ，50%甲酰胺)，挤出袋内的空气，在 42°C 水浴中温育1-2小时。(3) 100°C 加热5分钟使探针变性，迅速在冰水浴中使探针骤冷。(4)快速从水浴中取出杂交袋，剪去袋的一角，向预杂交液中加入已变性的探针，尽量去除袋中的空气，重新封口。(5)将杂交袋放入 42°C 水浴中，杂交2-3小时。(6)取出杂交袋迅速剪去一角，将杂交液倒入安全容器内，沿3边剪开袋子，将滤膜取出放到一个盛有足够的 $2\times\text{SSC}$ 和0.5%十二烷基硫酸钠塑料盒中，室温浸泡。(7)5分钟

后滤膜转移至另一个2×SSC和0.1%十二烷基硫酸钠的塑料盒中，于室温轻摇浸泡15分钟。(8)滤膜转移至另一个0.1×SSC和0.5%十二烷基硫酸钠的塑料盒中，于37°C轻摇浸泡1小时。(9)将溶液换为新配的0.1×SSC和0.5%十二烷基硫酸钠，并把塑料盒转移至68°C温育1小时。(10)用0.1×SSC于室温短暂漂洗滤膜，用纸吸去大部分液体。(11)包装膜包被滤膜，将滤膜对X光片曝光24-72小时以获得放射自显影影象。

5. 比较杂交带型与琼脂糖凝胶照片。
6. 当获得与预期大小一致的条带后，从凝胶中回收DNA，继续下面的试验。

(二)PCR产物的克隆和测序

1. 糖凝胶中回收可能的目的条带

(1)加入3-4倍体积的10 M碘化钠。(2)50 °C溶解凝胶。(3)加入40%的氧化硅。(4)混匀，37°C水浴保温5分钟。(5)离心，加入2倍体积的清洗缓冲液(50%酒精，0.1 M氯化钠，0.1M Tris-盐酸, pH 7.5)。(6)离心，去上清。(7)室温干燥3分钟。(8)加入10 μL灭菌的双蒸水。(9)离心，把上清液转移至新离心管，即可将回收片段克隆到载体上。

2. 回收条带克隆到T/A类型或T类型载体上(可从Promega Corporation和Invitrogen Corporation购买)。

(1)瞬时离心T载体和对照插入DNA管子，使组分集中于管底。(2)按下表设置回收DNA与T载体的连接反应：

	标准连接	阳性对照	背景对照
T载体(50ng)	1 μL	1 μL	1 μL
回收的DNA	3-5 μL	-	-
对照插入DNA	-	1 μL	-
5×T ₄ DNA连接酶缓冲液	2 μL	2 μL	2 μL
T ₄ DNA连接酶(3单位/μL)	1 μL	1 μL	1 μL
去离子水至总体积	10 μL	10 μL	10 μL

(3)移液器混匀，瞬间离心。室温连接1小时或4°C连接过夜。(4)转化连接产物：混合5 μL连接产物与50 μL大肠杆菌感受态细胞；于冰上放置30分钟；42°C热激2分钟后立即于冰上放置2分钟；加入600 μL 2×YT(1 L含：蛋白胨16 g，酵母提取物10 g，氯化钠5g，pH 7.0，高压面菌20分钟)肉汤培养基；37°C摇动培养1小时；加入100 μL X-Gal (30 mg/mL)，10 μL IPTG (30 mg/mL)；分别取10 μL、50 μL、100 μL、200 μL在含氨卞青霉素的LB平板上涂板，37°C倒置培养过夜；挑取3-5个白色单克隆在含氨卞青霉素的LB液体培养基中于37°C

培养过夜，提取质粒；(5)以T载体的通用引物，采用“实施例2，表达序列标签测序和获得”类似的方法测定插入的目的DNA片段序列。

3. 采用³²P标记的巢式基因特异引物为探针杂交或者用基因特异引物为测序引物测定8-10个克隆的序列，鉴别出含特定基因插入的阳性克隆。

(八)全长基因的获得

当PCR产物被部分或全部测序所鉴定后，可以用下列方法的获得全长基因

1. 以5' cDNA为模板，用表达序列标签5'或3'设计的引物，采用长距离PCR扩增获得基因全长。
2. 用基因重叠区的限制性酶切位点，克隆5'或3'的重叠区，再获得基因全长。

表达序列标签的序列表

(1)SEQ ID No.1 的信息：

(a)序列特征：

长度：602 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线型

(b)分子类型：cDNA

(c)最初来源：茶树

(d)序列描述：SEQ ID No.1：

```
GGGGACGACTGACTTGTTATAGGAAGACTCGGATATTTATTGAAACTATCCTTCCCAAAA
TGGGGATCAAGGCCACTGTGATTGACCCTGCAGATATTGGAGCCCTTGAATCTGCACTG
GATAAAAATAAAGTTACTCTATTTCTTCACTGAGTCCCCAACCAATCCATTCCTGAGATGT
GTTGACATTGAATTGGTTTCAAACTTTGCCACGATAAAGGAGCACTTGTCTGCATAGAT
GGAACATTTGCAACACCTCTACAACCAGAAGGCCCTTGCTCTTGGGGCTGACATTGTTT
TGCCTCCGCAACAAAATTCATTGCAGGACACAATGACGTCCTTGCAGGTTGCATCAGC
AGTTCAGAGAAGTTAATTTAGTCGTTTCGTAACCTGTCATCATATTCTGGGTGGTGCTCTC
AACCTAATGCCGCATATCTGATCATCCGAGGCATGAAGACACTGCATCTTCGTGTACAG
CAGCAAAAATTTAACAGCATTGAGGATGGCCGAGATTTTAGAGGCACATCCTAAGGTGAA
ACACGTTTATATATCCGGGCTTGCCAAAGTCATCCAGAGCATCATATTGCCAAGCGGCAA
ATAGA
```

(2)SEQ ID No.2 的信息：

(a)序列特征：

长度：405 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线型

(b)分子类型：cDNA

(c)最初来源：茶树

(d)序列描述：SEQ ID No.2:

```
GGGGGGCTAAGTATGGGATCATGGACAATTGGTTCGCTTCAGCTTGGAGTCGAAGACTT
TGAGGACGTGAAGGCTGATATTCTTCAGGCTCTGGAGACCATATAGAGTGGTTCACCTG
CACCGCTGTTTTCTTTTTATATTGTTATATTTGGGTATGTGCTCACTAAATGTTCTCCTT
CACTTTACTAGGTTTGTTCAGTTGAACAACCCTAGTAATAATGTCTGTTTTCTTTCTGTGAT
GTGTGCTTTCTTGTTTTTGAGTTTAAACAACCTAGCGCGTACAATGAGAAATGAACTTCAAA
GTGTTGTAGCAATGAGTTTTTGCTCATCTTCATTCCACATCTTTTTAAATTTAATGCCGTT
CAGTTCTGAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```