

天然无咖啡碱茶叶 N-甲基转移酶基因克隆与序列分析

陈丽萍, 陈忠正*, 李 斌, 周 英, 黎秋华, 杨飞芸
(华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 本研究以天然无咖啡碱南昆山毛叶茶为主要研究材料, 以不同咖啡碱含量的英红 9 号茶树品种和红山茶等山茶属植物为对照, 采用 RT-PCR 技术, 克隆获得南昆山毛叶茶、英红 9 号和福云 6 号茶树品种的 NMT 基因全长, 分别编码 365、369 和 369 个氨基酸。序列比较分析表明南昆山毛叶茶 NMT 基因与其它茶树 NMT 基因的核苷酸序列同源性高于 86.5%, 氨基酸序列同源性高于 86.3%, 并包含了六个保守序列、三个 SAM 结合区 A、B、C 及一个保守域 VFFF。基于同源性比较, 推测核苷酸序列的差异可能是导致南昆山毛叶茶 NMT 基因活性改变、影响茶树体内咖啡碱代谢的原因之一。

关键词: 茶树; N-甲基转移酶(NMT); 基因克隆

Cloning and Sequence Analysis of N-methyltransferase in *Camellia ptilophylla* Chang

CHEN Li-ping, CHEN Zhong-zheng*, LI Bin, ZHOU Ying, LI Qiu-hua, YANG Fei-yun
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, with complete coding sequences (CDS) of N-methyltransferase (NMT) genes, the tea varieties of *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *yinghong9*, *Camellia sinensis* cv. *Fuyun6* and *Camellia ptilophylla* chang were cloned with RT-PCR, and the deduced amino acid sequences were 365aa, 369aa and 369aa respectively. The cDNA sequences of NMT were analysed and compared with other NMT. The NMT genes obtained from *Camellia* show above 86.5% homology in DNA sequence and above 86.3% in amino acid sequence, while all the cDNA include six conserve sequences, three SAM combined region of A, B, C and one VFFF conserve domain. Based on sequence homology comparisons, the differences in DNA sequence of *Camellia ptilophylla* chang are presumed to have changed the NMT substrate specificity and led to different accumulation of purine alkaloids.

Key words: tea; N-methyltransferase (NMT); gene clone

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)07-0099-05

茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*), 茶树体内含有生物碱、多酚类、氨基酸、芳香性物质、色素等理化成分, 其中生物碱包括咖啡碱、可可碱、茶碱和黄嘌呤等八种。咖啡碱含量较高, 约占茶叶干重的 3%~5%, 其次是可可碱, 约占 0.05%。咖啡碱具有刺激中枢神经、加快血液循环等药理功能, 但饮用过量会出现心悸、失眠、焦虑等不良反应, 并易引起心脏病、骨质疏松症、胚胎畸形等症状。而可可碱不会引起上述不良反应, 并具有强心、保护缺氧心肌、提高机体动态耐力、助消

化、利尿等作用。因此, 低咖啡碱高可可碱产品的市场需求日益增加。南昆山毛叶茶(*Camellia ptilophylla* chang)是 20 世纪 80 年代初在中国广东境内发现的一种天然无咖啡碱、可供饮用的茶叶, 其基本的植物学特征、生物学特性与普通茶树相似, 体内代谢产生的茶多酚、儿茶素和氨基酸等主要理化成分的含量、组成与一般茶叶无明显差异, 加工而成的茶叶在成茶风味上与普通茶叶没有明显的区别, 但是其体内生物碱的组成却由 3%~6% 的可可碱替代了 3%~5% 的咖啡碱^[1]。动物实验及相关研究证实^[2], 南昆山毛叶茶在药理和生理功能

收稿日期: 2006-04-05

*通讯作者

基金项目: 广东省自然科学基金项目(04020579); 国家“十五”科技攻关计划子课题(2001BA502B02);

茶叶化学工程农业部重点实验室开放基金资助项目

作者简介: 陈丽萍(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

上,避免了咖啡碱引起的心悸、失眠、焦虑等不良反应。

茶叶中生物碱主要属嘌呤类化合物^[3,4],在茶树中具有从嘌呤核苷酸到咖啡碱的特异代谢途径。近10年来的研究表明,咖啡碱的主要合成途径为:腺嘌呤→腺苷酸→次黄嘌呤核苷酸→黄嘌呤核苷酸→黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤→3,7-二甲基黄嘌呤(可碱)→1,3,7-三甲基黄嘌呤(咖啡碱)。N-甲基转移酶(N-methyltransferase, NMT)是催化三步转甲基反应的关键酶类。2000年, Kato等^[5]人利用RACE方法从茶叶中成功克隆得到NMT基因TCS1,它能有效催化7-甲基黄嘌呤生成可可碱,并催化可可碱生成咖啡碱。随后Kouichi等^[6]根据TCS1基因序列从咖啡中获得多个NMT基因,其核苷酸和氨基酸序列高度同源但具有不同的催化位点。余有本等^[7]从龙井43#克隆得到NMT基因,并在大肠杆菌中表达,得到的蛋白具有NMT的后两步催化活性。

本文选用天然无咖啡碱南昆山毛叶茶为主要研究材料,以高咖啡碱含量的福云6号、英红9号和天然低咖啡碱、低可可碱的油茶和红山茶等山茶植物为对照,克隆NMT基因全长,通过序列分析初步探明南昆山毛叶茶不合成咖啡碱的分子机理,为从基因水平上深入开展咖啡碱代谢调控研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

天然无咖啡碱茶树品种 南昆山毛叶茶(*Camellia ptilophylla* Chang),采于广东南昆山;

天然高咖啡碱茶树品种 福云6号(*Camellia sinensis* cv. *Fuyun 6*)和英红9号(*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *yinghong 9*),采于广东增城;

天然低咖啡碱、低可可碱山茶植物 油茶(*Camellia oleifera* Abel)和红山茶(*Camellia japonica* Linn),采于华南农业大学;

以上各品种均取1芽2叶新梢为研究材料。

1.1.2 供试菌种 菌种DH10B,由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂

MMLV逆转录酶 Invitrogen公司;Taq DNA聚合酶 上海生工;EcoRI限制性内切酶和T4 DNA连接酶 大连宝生物TaKaRa公司;Wizard DNA Clean-up回收试剂盒和pGEM-T载体 Promega公司;PCR引物上海生物工程公司合成,DNA测序交由上海英骏公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取

参照张智俊等^[8]方法提取总RNA。

1.2.2 cDNA第一链的合成

按照Invitrogen公司MMLV逆转录试剂盒所附操作方法进行。以提取的各山茶属植物mRNA为模板,以CDSSf4:5'-GTGTGAACACTGCAGAGTGGCCTACATGGCC(T)5C(T)7C(T)13(A/G/C)和Smartsap:5'-TGTGAACACTGCAGAGTGGCCTACTTGGCCGGG引物组合为反转录引物,在MMLV逆转录酶的作用下合成cDNA第一链。反转录产物-20℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增NMT基因的cDNA

参考文献设计一对引物,上游引物P1:5'-CAACTTCTCATTTCTCCCAAC3'和下游引物P2:5'-CACTGCTGTGGCAGCTGGC3',以合成的cDNA第一链为模板,PCR反应体系如下:cDNA模板1μl,10×PCR Buffer 5μl,25mmol MgCl₂ 3μl,10μmol的NMT上下游引物各1μl,10mmol dNTP 1μl,Taq酶3.0 U,用ddH₂O补充到总体积为50μl。PCR反应条件:94℃预变性4min后,分别于94℃变性50s,55℃退火50s和72℃延伸2min,共32个循环,最后在72℃延伸7min。PCR产物4℃下保存。

1.2.4 扩增产物的克隆与测序

PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的带,用Wizard DNA Clean-up试剂盒回收。连接、转化、鉴定按常规方法^[9]进行。

1.2.5 序列分析与同源性分析

根据测序得到的核苷酸序列,用NCBI的ORFfind程序推导目的基因的氨基酸序列,并利用DNA star和NCBI的Blast分析软件对获得的核苷酸序列和推导氨基酸序列进行序列比对和聚类分析。

2 结果与分析

2.1 NMT基因的RT-PCR扩增

总RNA经反转录合成cDNA第一链,以此为模板,设计引物进行NMT基因的PCR扩增。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,南昆山毛叶茶、英红9号、福云6号均扩增出大约1.3kb的目的条带(见图1A),与预期大小一致,但油茶、红山茶扩增未得到预期的目的片段。

2.2 重组质粒鉴定

把回收的目的片段同T载体连接并转化大肠杆菌。各品种随机挑取3个白斑培养单菌落用于抽提质粒DNA,抽提的质粒DNA分别采用EcoRI酶切和用特异引物PCR扩增两种技术鉴定。电泳结果显示,每个样品均能酶切、扩增出大约1.3kb的DNA条带(见图1B、C),确定所挑取的9个单菌落均为阳性克隆子,并

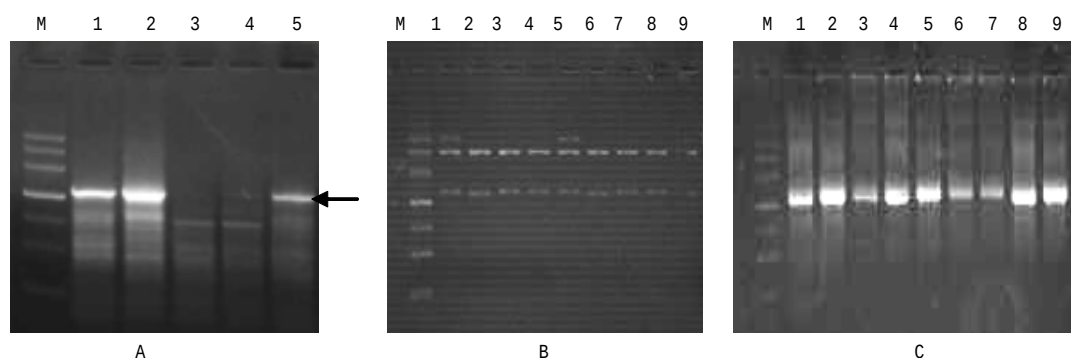


图1 NMT基因的RT-PCR、重组质粒鉴定电泳图
A、NMT基因的RT-PCR电泳图，箭头示扩出的目的片段，M—Marker、1—英红9号、2—福云6号、3—油茶、4—红山茶、5—南昆山毛叶茶；
B、重组质粒/EcoRI电泳图，M—Marker、1~3英红9号、4~6福云6号、7~9南昆山毛叶茶；
C、重组质粒PCR电泳图，M—Marker、1~3英红9号、4~6福云6号、7~9南昆山毛叶茶。

图1 NMT基因的RT-PCR、重组质粒鉴定电泳图
Fig.1 PCR product of PPO cDNA and restriction endonucleases digested recombinant plasmid

交由测序公司测序。

2.3 茶叶NMT cDNA的序列分析

根据测序的结果，南昆山毛叶茶NMT的cDNA为1098bp，编码365个氨基酸，在5'端和3'端分别有68bp和194bp非编码区。对于英红9号和福云6号，NMT的cDNA均为1357bp，各自编码369个氨基酸，在5'端和3'端分别有53bp和194bp非编码区。

2.4 NMT基因的核苷酸序列同源性比较

用Clustal W方法对克隆获得的3个NMT基因(PCCS—毛叶茶NMT、FYCS—福云NMT、YHCS—英红NMT)与国际数据库已登陆的来自茶叶^[5]^[10,11]和咖啡^[12]的NMT基因进行核苷酸序列比对分析。结果表明(见表1)，所有来自茶叶包括毛叶茶的NMT基因核苷酸序列同源性均在86.5%以上。然而茶叶的NMT基因与咖啡植物的NMT

树中克隆的NMT基因之间的氨基酸序列同源性在86.3%以上，但茶叶NMT基因与咖啡等植物的NMT基因在氨基酸水平同源性约为45%。对NMT基因的氨基酸序列的保守结构域分析(图2)表明，克隆的三个基因包含六个保守序列，其中三个为SAM结合域A(AA/VDLGCAAGP)、B'(VYLNDLF/PGNDFN)、C(PGSFHHGRLFP)和一个保守域VFFF(AYLSQFHEDFTMFL)。在这些保守序列中，第一个方框中的氨基酸为茶叶与咖啡中NMT基因第一保守序列中的特殊氨基酸，它可能对催化嘌呤环上特定位置的N原子起决定作用；第二个方框中的氨基酸为第四保守序列中的特殊氨基酸，对NMT的物化性质具有一定的影响。经过以上分析，可以确认克隆到的三个片段

表2 NMT的氨基酸序列比较
Table 2 Aligned score of amino acid of N-methyltransferase from tea

	FYCS	YHCS	TCS1	PCCS	PCS1	ICS1	PCS2	ICS2	TCS2	TCS3
FYCS	***	96.5	98.9	92.3	91.5	92.9	87.7	88.8	88.3	
YHCS		***	97.0	90.4	89.6	91.0	86.3	87.9	87.4	86.9
TCS1			***	91.8	91.3	92.3	87.4	89.0	88.5	88.0
PCCS				***	98.6	99.5	87.2	88.3	88.0	87.5
PCS1					***	98.6	86.4	87.4	87.2	87.2
ICS1						***	87.5	88.5	88.3	87.7
PCS2							***	97.5	97.0	96.5
ICS2								***	97.8	97.3
TCS2									***	98.6
TCS3										***

确为N-甲基转移酶基因。

2.6 系统发育进化分析

进化分析发现，从茶叶中克隆的各NMT基因，明显划分为三类(图3)，YHCS、FYCS与TCS1聚为一大类，PCCS与ICS1、PCS1聚为第二类，PCS2、TCS2

表1 NMT的核苷酸序列比较

Table 1	Aligned score of nucleotides of N-methyltransferase										
	FYCS	YHCS	TCS1	PCCS	PCS1	ICS1	PCS2	ICS2	TCS2	TCS3	
FYCS	***	98.4	99.4	95.2	94.8	95.4	89.8	88.7	88.8	92.9	
YHCS		***	98.8	94.8	94.4	95.1	89.6	88.7	88.6	92.5	
TCS1			***	95.0	94.8	91.6	92.6	86.5	87.1	92.9	
PCCS				***	99.3	99.2	91.3	89.6	90.1	94.3	
PCS1					***	97.8	93.3	88.2	88.9	94.2	
ICS1						***	92.7	90.7	87.6	94.2	
PCS2							***	96.6	96.5	98.3	
ICS2								***	91.5	98.2	
TCS2									***	99.2	
TCS3										***	

基因在核苷酸水平上无同源性。

2.5 NMT基因的氨基酸序列比较和保守结构域分析

氨基酸序列比对结果显示(见表2)，从不同类型茶

FYCS	1	MELATAGKVN	EVL	FMNRGEGESSYAQNSSFTQQVASMAQPALEN	AVETLFSRDFH-LQALNAADLGCAAGPNTFAVIST	78		
YHCS	1	MELATTGKVN	EVL	FMNRGEGESSYAQNSSFTQQVASMAQPALEN	AVETLFSKDFH-LQALNAADLGCAAGPNTFAVIST	78		
PCCS	1	M	—	GKVN	EVL	FMNRGEGEISYAQNSAFTQKVASMAQPALEN	AVETLFSKDFHLLQALTADLGCAAGPNTFAVIST	74
TCS1	1	MELATAGKVN	EVL	FMNRGEGESSYAQNSSFTQQVASMAQPALEN	AVETLFSRDFH-LQALNAADLGCAAGPNTFAVIST	78		
TCS2	1	M	—	KEVKEALFMNKGEGESSYAQNSSFTQVT	SMTMPVLEN	AVETLFSKDFHLLQALNAVDLGCAAGPTTFTVIST	74	
TCS3	1	M	—	KEVKEALFMNKGEGESSYAQNSSFTQVT	SMTMPVLEN	AVETLFSKDFHLLQALNAVDLGCAAGPTTFTVIST	74	
I B' C II								
FYCS	79	IKRMMEKKCRELNCQTLEL	QVYLNDLFGNDFN	TLFKGLSSEVIGNKCEEVSCYVMGV	PGSFHGRFLFPRNSLHLVHSSYS	157		
YHCS	79	IKRMMEKKCRELNCQTLEL	QVYLNDLFGNDFN	TLFKGLSSEVIGNKCEEVPCYVMGV	PGSFHGRFLFPRNGLHLVYSSYS	157		
PCCS	75	IKRMMEKKCRELYCQTLEL	QVYLNDLFGNDFN	TLFKGLSSQVVGNGKCEEVSCYVMGV	PGSFHGRFLFPRNSLHLVHSSYS	153		
TCS1	79	IKRMMEKKCRELNCQTLEL	QVYLNDLFGNDFN	TLFKGLSSEVIGNKCEEVPCYVMGV	PGSFHGRFLFPRNSLHLVHSSYS	157		
TCS2	75	IKRMMEKKCRELNCQTLEL	QVYLNDLPGNDFN	TLFKGLPSKVVGNGKCEEVSCYVGV	PGSFHGRFLFPRNSLHLVHSCYS	153		
TCS3	75	IKRMVEKKCRELNCQTLEL	QVYLNDLPGNDFN	TLFKGLQSKVVGNGKCEEVSCYVGV	PGSFHGRFLFPRNSLHLVHSCYS	153		
III VEEF IV								
FYCS	158	VHWLTQAPKGLTSREGLALNKGKIYISKTSPPV	REAYLSQFHEDFTMF	SNARSQEVVPNGCMVLILRGRQCDSPSDMQS	237			
YHCS	158	VHWLTQAPKGLTSREGLALNKGKIYISKTSPPV	REAYLSQFHEDFTMF	LNYSQEMVPNGCMVLILRGRQCFDPSDMQS	237			
PCCS	154	VHWLTQAPKGLTSREGLALNKGKIYISKTSPPV	KEAYLSQFHEDFTMF	LNARSQEVVPNGCMVLILHGRQSSDPSEMES	233			
TCS1	158	VHWLTQAPKGLTSREGLALNKGKIYISKTSPPV	REAYLSQFHEDFTMF	LNARSQEVVPNGCMVLILRGRQCDSPSDMQS	237			
TCS2	154	VHWLTQAPKGLTSKEGLALNKGKIYISKTSPPV	REAYLSQFHEDFTMF	LNRSQEVVPNGCMVLILRGRQSSDPDMGS	233			
TCS3	154	VHWLTQAPKGLTSKEGLALNKGKIYISKTSPPV	REAYLSQFHEDFTMF	LNRSQEVVPNGCMVLILRGRQSSDPDMGS	233			
V								
FYCS	238	CFTWELLAMAIAELVSQGLIDEDKLDFTNIPSYFASLEEVDIVERDGSFTIDHIEGFDLDSLEMQENDKWVRGEKFTKV	317					
YHCS	238	CFTWELLALAIAELVSQGLIDEDKLDFTNIPSYFASLEEVDIVERDGSFTIDHIEGFDLDSVEMQENDKWVRGEKFTKV	317					
PCCS	234	CFTWELLAAIAIAELVSQGLIDEDKLDFTNVP	SYWPSLKEVKDIVERDGSFTIDHIEGFELDSLEMQENDKWVRGDKFAKM	313				
TCS1	238	CFTWELLAMAIAELVSQGLIDEDKLDFTNIPSYFASLEEVDIVERDGSFTIDHIEGFDLDSVEMQENDKWVRGEKFTKV	317					
TCS2	234	CFTWELLAVAIAELVSQGLIDEDKLDFTNVP	SYFPSLEEVDIVERNGSFTIDHMEGFELDSPEMQENDKWVRGEKFATV	313				
TCS3	234	CSTWELLAVAIAELVSQGLIDEDKLDFTNVP	SYFPSLEEVDIVERNGSFTIDHMEGFELDSPEMQEDDKWVRGEKFATV	313				
VI								
FYCS	318	VRAFTEPIISNQFGHEIMDKLYDKFTHIVVSDLEAKLPKTTSIILVLSKIDG.	370					
YHCS	318	VRAFSEPIISSQFGHEIMDKLYDKFTHIVVSDLEAKLPKTTSIILVLSKIDG.	370					
PCCS	314	VRAFTEPIISNQFGHEIMDKLYDKFTHILVSDLEAKLPKTTSIILVLSKIVG.	366					
TCS1	318	VRAFTEPIISNQFGPEIMDKLYDKFTHIVVSDLEAKLPKTTSIILVLSKIDG.	370					
TCS2	314	ARAFTEPIISNQFGHEIMDKLYEKFTHIVVSDFEAKIPKITSIILVLSKIVG.	366					
TCS3	314	ARAFTEPIISNQFGHEIMDKLYEKFTHIVVSDLEAKIPKITSIILVLSKIVG.	366					
VII								

图2 NMT 基因保守序列分析

Fig.2 Conserve domain analysis of amino acid of N-methyltransferase

等聚为另一大类。Yoneyama 等^[10]根据 NMT 在 SAM 结合域 A(AA/VDLGCAAGP) 第二个氨基酸的差异和结合域 B' (VYLNDLF/PGNDFN) 第七个氨基酸的差异, 将 NMT 分为两类: 第一类体外表达酶具有酶活性, 包括 TCS1、PCS1 和 ICS1, 其中 TCS1 来源于高咖啡碱茶树品种, 具备 N-1 位甲基化能力, 能合成咖啡碱, 而 PCS1、ICS1 分别来源于低咖啡碱茶树品种, 缺乏 N-1 位甲基化能力; 第二类体外表达酶无催化活性, 包括 TCS2、PCS2 和 ICS2。本研究克隆的三个基因中, YHCS、FYCS 与具有咖啡碱合成能力的 TCS1 聚为一类, PCCS 与缺乏 N-1 位甲基化能力的 ICS1、PCS1 聚为一类, 客观地反应了相应茶树体内生物碱的不同特征, 但表达酶活性尤其是从无咖啡碱的南昆山毛叶茶克隆的 NMT 基

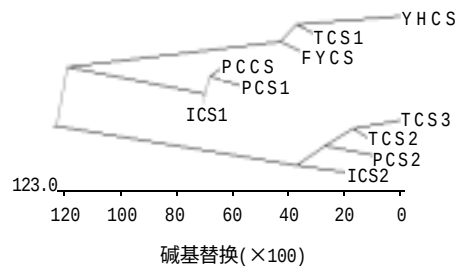


图3 茶树 NMT 进化关系图

Fig.3 Evolutionary relationship of NMT from tea

因是否符合这一分类, 还有待进一步研究证实。

3 结论与讨论

甘薯叶柄藤类黄酮的体外抗氧化作用研究

高荫榆, 洪雪娥, 罗丽萍, 夏冬华, 陈才水
(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 研究薯蓣黄酮(FSPV)的体外抗氧化作用。测定了 FSPV 对二苯代苦味酰自由基(DPPH)、超氧阴离子自由基(O_2^-)和羟自由基($\cdot OH$)的清除率, 同时用硫代巴比妥酸(TBA)法测定其对亚油酸的抗氧化性。实验结果表明: FSPV 对 DPPH 的清除效果良好($IC_{50}=8.60mg/L$); 对 O_2^- 清除能力强于芦丁但弱于 VC; 对 $\cdot OH$ 的清除能力强于芦丁和 VC; 对亚油酸也有很好的抗氧化作用。体外实验证实, FSPV 具有较强的抗氧化能力。

关键词: 甘薯叶柄藤; 黄酮; 抗氧化作用; 硫代巴比妥酸

Study on *in vitro* Antioxidant Effects of Polysaccharides from Sweet Potato Leaf, Stalk and Stem

GAO Yin-yu, HONG Xue-e, LUO Li-ping, XIA Dong-hua, CHEN Cai-shui
(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant effects of flavonoids of sweet potato vines (FSPV) were studied. The scavenging capacities of FSPV on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, superoxide and hydroxyl free radical were assayed. Meanwhile, the antioxidant activity on linoleic acid was studied with thio barbituric acid (TBA) method. These results showed, on DPPH free radical, the scavenging effect of FSPV is very good ($IC_{50}=8.60mg/L$). The scavenging activity on superoxide free radical is stronger than lutein's, but weaker

收稿日期: 2006-03-31

作者简介: 高荫榆(1940-), 女, 教授, 研究方向为食物(含生物)资源开发利用。

本文从无咖啡碱茶树——南昆山毛叶茶和高咖啡碱茶树——英红 9 号、福云 6 号克隆获得 NMT 基因全长。但在相同实验条件下, 未能从低咖啡碱、低可可碱山茶植物——油茶、红山茶中扩增得到 NMT 基因。

目前得到的茶树 NMT 基因高度同源, 但仍有部分位点存在差异, 例如, 具有可可碱催化活性, 无咖啡碱催化活性的 NMT(PCS1, ICS1) 的 192 位氨基酸是 K 赖氨酸, 其它 NMT 在该位置是 R 精氨酸。Kouichi 等^[6]认为 192 位氨基酸对 NMT 的物化性质有一定影响。本研究克隆的源于南昆山毛叶茶的 PCCS 第 192 位的氨基酸是 K 赖氨酸, 这差异是否会导致 NMT 活性变化, 进而影响生物碱代谢, 尚需作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 李斌, 郑永球, 尹逸, 等. 天然无咖啡碱茶叶资源的开发利用研究[J]. 食品科学, 2001, 22(7): 33-35.
- [2] 许实波, 王向谊, 郭文成, 等. 毛叶茶提取物的药理作用[J]. 中山大学学报(自然科学版)增刊, 1990, 29: 185-189.
- [3] Ashihara H, Crozier A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants[J]. Advances in Botanical Research, 1999, 30: 117-205.
- [4] Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(9): 407-413.
- [5] Kato M, Mizuno K, Crozier A, et al. Caffeine synthase gene from tea leaves[J]. Nature, 2000, 406: 956-957.
- [6] Kouichi M, Misako K, Fumi I, et al. The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.)[J]. FEBS Letters, 2003, 547: 56-60.
- [7] 余有本, 江昌俊, 王朝霞, 等. 茶树咖啡碱合酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 105-109.
- [8] 张智俊, 谭晓风, 陈永忠. 同时提取油茶中 DNA 和 RNA 的简便方法[J]. 生物技术, 2003, 13(3): 23-24.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 56-70.
- [10] Yoneyama N, Morimoto H, Ye C X, et al. Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme[J]. Mol Gen Genomics, 2006, 275(2): 125-135.
- [11] Ogawa W. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. Gene isolation and enzymatic properties[J]. Biologic Chemistry, 2001, 296: 8213-8218.
- [12] Kouichi M, Akira O, Kato M, et al. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee[J]. FEBS Letters, 2003, 534: 75-81.