

李金,魏艳丽,庞磊,等. 茶树咖啡碱合成途径中 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 的基因表达量差异及其与咖啡碱含量的相关性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 21–24.

# 茶树咖啡碱合成途径中 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 的基因表达量差异及其与咖啡碱含量的相关性

李金,魏艳丽,庞磊,江昌俊

(安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术重点实验室,安徽合肥 230036)

**摘要:**通过实时荧光定量 PCR 方法研究 10 个茶树品种咖啡碱合成途径中 3 个关键酶基因(咖啡碱合成酶基因 *TCSI*、次黄嘌呤核苷酸核苷酸脱氢酶基因 *TIDH*、S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *SAMS*)秋季的表达量,并与咖啡碱含量进行相关性分析,从基因转录表达水平探究其对茶树咖啡碱含量的影响。结果表明,*TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 基因表达量在品种间的变异系数分别为 24.82%、23.97%、30.31%,即 3 个基因表达量在品种间的差异为 *TIDH* < *TCSI* < *SAMS*。同时,*TCSI* 与咖啡碱含量呈显著正相关,*TIDH*、*SAMS* 与咖啡碱含量相关性不显著。因此,与 *TIDH*、*SAMS* 相比,*TCSI* 对茶树咖啡碱的合成起到更为重要的作用。

**关键词:**茶树;咖啡碱;*TCSI*;*TIDH*;*SAMS*;转录表达;相关性分析

**中图分类号:**Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0021-03

茶叶是世界三大饮料之一,咖啡碱是茶叶中的重要成分之一,其含量对茶叶品质具有至关重要的影响。目前,从茶树咖啡碱合成的主要途径中已得到克隆的 3 个酶的基因,分别为咖啡碱合成酶(*TCS*)基因(*TCSI*, GenBank: AB031280)、次黄嘌呤核苷酸核苷酸脱氢酶(*IMPDH*)基因(*TIDH*, GenBank: EU106658)和 S-腺苷甲硫氨酸(*SAM*)合成酶基因(*SAMS*, GenBank: AB041534)。咖啡碱合成的主要途径是腺苷酸(*AMP*)→次黄嘌呤核苷酸(*IMP*)→黄嘌呤核苷酸(*XMP*)→黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤→可可碱→咖啡碱<sup>[1]</sup>。咖啡碱合成酶(*TCS*)是合成咖啡碱的终端酶,也是最关键的酶<sup>[2]</sup>。*IMPDH* 催化 *IMP* 合成 *XMP*<sup>[3]</sup>。*SAM* 合成酶催化甲硫氨酸和 *ATP* 生成 *SAM*, *SAM* 是茶树咖啡碱合成的唯一甲基供体<sup>[2]</sup>。Mohanpuria 等通过基因沉默法降低了茶树再生体系的 *TCSI* 表达量,导致可可碱和咖啡碱的含量均显著下降,表明 *TCSI* 对可可碱及咖啡碱的合成具有重要作用<sup>[4]</sup>。*IMPDH* 抑制剂 Ribavirin 可以使茶叶叶片内可可碱、咖啡碱含量降低<sup>[5]</sup>。Li 等使用半定量 PCR 法研究茶树不同组织中 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 表达量的差异,发现 *TCSI* 较 *TIDH* 和 *SAMS* 在咖啡碱合成旺盛部位——嫩叶中的表达量更多<sup>[6]</sup>。

实时荧光定量 PCR 是目前用于准确、灵敏、快速地衡量基因表达量的黄金标准<sup>[7]</sup>,且已成为研究茶基因表达量的重要手段。赵丽萍等应用 qRT-PCR 方法研究茶树新梢不同叶片中与茶叶香气密切相关的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因和  $\beta$ -樱草糖苷酶基因的表达式,发现  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在茶树新梢

较成熟叶位中表达量较多, $\beta$ -樱草糖苷酶基因在幼嫩的 1 芽 1 叶部位表达量较多<sup>[8]</sup>。林郑和等应用 qRT-PCR 方法研究茶树氨基酸合成转化关键酶基因——谷氨酸脱氢酶(*GDH*)基因、谷氨酰胺合成酶(*GS*)基因、谷氨酰胺  $\alpha$ -酮戊二酸氨基转移酶(*GOGAT*)基因的相对表达量,并与氨基酸含量进行相关性分析,发现谷氨酸脱氢酶基因表达与茶氨酸含量呈正相关,而谷氨酸合成酶基因表达与茶氨酸、赖氨酸、丙氨酸含量呈负相关<sup>[9]</sup>。

目前对茶树 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 基因表达量的研究较少,且目前对这 3 个关键基因在不同品种间的差异表达与咖啡碱含量关系的研究尚无报道。因此,本研究采用 qRT-PCR 方法测定 10 个茶树品种秋季咖啡碱合成途径这 3 个酶的基因表达量,并将其与咖啡碱含量进行相关性分析,探究这 3 个酶的基因表达量对茶树中咖啡碱含量的影响,以便为进一步调控茶树咖啡碱合成及茶树的分子标记辅助育种提供理论与实践指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

2012 年 10 月,在安徽省池州市东至县茶树良种繁殖示范场选择 10 个茶树品种,采摘生长状况一致的 1 芽 2 叶茶树新梢。其中,7 个品种为国家审定品种——锡茶 5 号、锡茶 11 号、福鼎大白茶、安徽 1 号、安徽 7 号、龙井 43、政和大白茶;1 个品种为安徽省审定品种——舒茶早;1 个品种为福建省审定品种——悦茗香;1 个品种为浙江省审定品种——安吉白茶。采摘后将样品混匀,将一部分样品立即置于液氮中冷冻,之后于 -80 ℃ 冰箱中保存,剩余样品经微波杀青 1.5 min, 85 ℃ 烘干至恒重。

### 1.2 HPLC 法测定茶树新梢咖啡碱含量

1.2.1 样品提取 样品粉碎后,取 0.50 g 加入 150 mL 沸水,加入 2.25 g MgO 除去多酚,100 ℃ 水浴浸提 20 min,趁热减压

收稿日期:2013-03-25

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(编号:2011BAD01B01)。

作者简介:李金(1985—),女,辽宁鞍山人,硕士,研究方向为茶树生物技术与育种。E-mail:1114312@163.com。

通信作者:江昌俊,博士,教授,主要从事茶树生物技术育种及分子生物学研究。E-mail:jiangcj@ahau.edu.cn。

过滤,用 250 mL 容量瓶定容,过 0.22 μL 水系滤膜。测定样品含水量,每个品种 3 个重复。样品咖啡碱含量计算方法:

样品咖啡碱含量 =  $\frac{C_1 \times L_1}{L_2 \times m \times w \times 1\,000} \times 100\%$ 。

式中: $C_1$  为测定液中咖啡碱含量 (μg); $L_1$  为样品总体积 (mL); $L_2$  为进样体积 (μL); $m$  为样品质量 (g); $w$  为样品干物质含量 (%)。

1.2.2 HPLC 色谱条件 waters 600 HPLC 仪;Waters 2489 UV/Visible 检测器; $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm×250 mm×5 μm,Agilent);流动相 A 为 0.2% 乙酸;流动相 B 为 100% 乙腈;进样量 5.0 μL;柱温 25 ℃;检测波长 274 nm;流速 1.0 mL/min。梯度洗脱条件:0 min,92% A;0~25 min,92%~83% A;25~30 min,83%~10% A;30~35 min,10%~92% A。

1.3 用 qRT-PCR 法测定基因相对表达量

1.3.1 RNA 提取 取 0.20 g 样品,加入 0.30 g PVPP 及液氮充分研磨;取约 20 mg 研磨试样,加入 900 μL CTAB 提取液及 50 μL β-巯基乙醇,65 ℃ 水浴裂解 30 min;用植物 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa DP432) 提取总 RNA。

1.3.2 反转录 使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa D6110S) 进行反转录。

1.3.3 基因表达量测定 荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad CFX96。20 μL qPCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa DRR081A) 10.0 μL,PCR forward & reverse primer (10 μmol/L) 各 0.8 μL,cDNA 1st Strand (100 ng/μL) 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。qRT-PCR 程序:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 5 s,62 ℃ 30 s,采集荧光,40 个循环。在 65~95 ℃ 建立溶解曲线。以 GAPDH 作参照基因<sup>[10]</sup>,锡茶 5 号品种作校准样本,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。引物序列加见表 1。

表 1 茶树咖啡碱合成途径 3 个关键酶基因的引物序列		
基因	Up/Down	引物序列(5'→3')
TCSI	Up	CTGTCGCTCGAGTTATTTGG
	Down	GTGCCTGAGTAAGCCAATGA
TIDH	Up	TGCTGAAAGAAGTGGTGTGC
	Down	TCCCTTTTGTGCTATGCTTCC
SAMS	Up	ACCCAACACGATGAGACCG
	Down	GCCAATGACAAAGCGACCA
GAPDH	Up	TTGGCATCGTTGAGGCTCT
	Down	CAGTGGAACACGGAAGAC

1.3.4 相关性分析 将 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 的相对表达量与咖啡碱含量进行相关性分析。

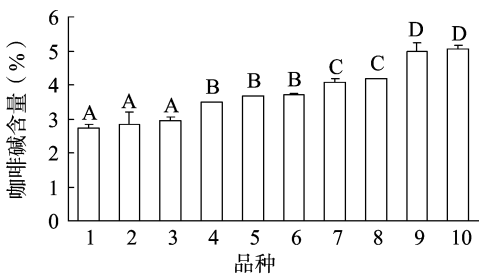
1.4 数据处理

用 DPS 2006 软件进行差异显著性分析;用 SPSS 17.0 软件及 GLM 一般线性模型进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 HPLC 法测定秋季茶树新梢咖啡碱含量结果

咖啡碱出峰时间为 15.61 min。色谱峰面积( $y$ )与浓度( $x$ ,mg/mL)的线性回归方程为  $y = 1.96 \times 10^7 x + 194$ , $r^2 = 0.9998$ 。10 个茶树品种咖啡碱含量为 2.74%~5.07%,其中锡茶 5 号咖啡碱含量最低,安徽 1 号含量最高(图 1),平均值为 3.77%,极差为 2.33%,变异系数为 21.84%。



1—锡茶5号;2—锡茶11号;3—福鼎大白茶;4—政和大白茶;5—安徽7号;6—安吉白茶;7—悦茗香;8—龙井43;9—舒茶早;10—安徽1号;不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

图1 茶树秋季新梢咖啡碱含量

2.2 茶树不同品种间 3 个关键酶基因的表达量差异

由表 2 可知,10 个品种 *TCSI* 基因的相对表达量范围为 1.00~1.94,极差为 0.94,变异系数为 24.82%;*TIDH* 的相对表达量范围在 0.57~1.37,极差为 0.80,变异系数为 23.97%;*SAMS* 的相对表达量范围在 0.61~1.49,极差为 0.88,变异系数为 30.31%。10 个品种的 3 个基因在各基因相对表达量范围中出现的频率有所不同:分别有 4、3、3 个品种的 *TCSI* 相对表达量出现在 1.00~1.20、1.40~1.60、1.80~2.00 的范围,分布相对较均匀;10 个品种的 *TIDH* 相对表达量在 0.40~1.40 范围中出现的频率呈现正态分布趋势;10 个品种中有 7 个品种 *SAMS* 相对表达量出现在 0.60~1.00 范围内,而 1.01~1.60 范围内仅有 3 个品种,分布不均匀,即大部分品种 *SAMS* 表达处于较低水平。

表 2 茶树咖啡碱合成途径 3 个关键酶基因的相对表达量

品种	3 个关键酶基因的相对表达量		
	<i>TCSI</i>	<i>TIDH</i>	<i>SAMS</i>
锡茶 5 号	1.00 ± 0.05A	1.00 ± 0.11C	1.00 ± 0.04E
锡茶 11 号	1.01 ± 0.05A	1.08 ± 0.09CD	0.64 ± 0.02AB
安徽 7 号	1.13 ± 0.06A	0.75 ± 0.02B	0.71 ± 0.05B
安吉白茶	1.16 ± 0.01A	1.37 ± 0.06E	0.90 ± 0.02CD
福鼎大白茶	1.41 ± 0.03B	0.99 ± 0.02C	1.02 ± 0.02E
舒茶早	1.52 ± 0.15B	1.16 ± 0.08D	0.84 ± 0.04C
龙井 43	1.54 ± 0.09B	0.57 ± 0.04A	1.49 ± 0.04G
政和大白茶	1.80 ± 0.07C	0.97 ± 0.05C	1.36 ± 0.03F
安徽 1 号	1.88 ± 0.07C	0.73 ± 0.04B	0.96 ± 0.04DE
悦茗香	1.94 ± 0.13C	0.95 ± 0.02C	0.61 ± 0.08A

2.3 基因表达量与咖啡碱含量的相关性分析

*TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 相对表达量与咖啡碱含量的相关系数  $r$  分别为 0.63、-0.23、0.04,其中 *TCSI* 基因表达量与咖啡碱含量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ),而 *TIDH*、*SAMS* 与咖啡碱含量的相关性不显著(图 2)。由此可见,*TCSI* 对咖啡碱合成具有更为重要的作用。

3 讨论

茶树咖啡碱含量一般为 2.00%~5.00%<sup>[11]</sup>,咖啡碱含量低于 2.00%或高于 5.00%的茶树资源即为特种种质资源。虞富莲等和杨亚军等分别在 200 份茶树种质材料中发现 7 份 (>5.00%) 和 6 份 (>5.20%) 高咖啡碱资源<sup>[12-13]</sup>。本研究的 10 份材料中有 9 份咖啡碱含量在 2.00%~5.00%,1 份略

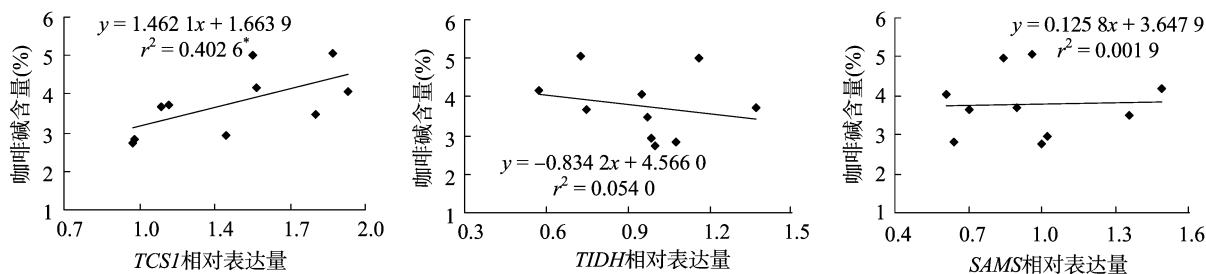


图2 秋季茶树咖啡碱合成途径3个关键酶表达量与咖啡碱含量相关性

超出 5.00%。这与前人研究的茶树咖啡碱含量及特异种质资源概率基本相符,表明本研究所选 10 个茶树品种具有一定的代表性。

*TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 基因表达量在品种间的变异系数分别为 24.82%、23.97%、30.31%,即 3 个基因表达量在品种间的差异为  $TIDH < TCSI < SAMS$ 。IMPDH 参与腺嘌呤代谢,其产物是 DNA 及 RNA 的组成成分,并对细胞增殖起重要作用,其结构及功能在不同生物及组织中相对保守<sup>[14-15]</sup>。本研究 10 个茶树品种中 *TIDH* 表达量变异系数最小,可能与其相对保守有关。*TCS* 是咖啡碱合成终端酶,本研究发现其基因表达量与咖啡碱含量显著相关。本研究咖啡碱含量基本处于正常变化范围,因此 *TCSI* 表达量在 10 个品种间变化范围不大,处于中等水平。而 *SAMS* 在品种间表达量差异最大,可能与 SAM 的植物生理功能有关。有研究表明,SAM 与植物抗性显著相关,逆境条件下植物 SAM 水平变化明显<sup>[16-17]</sup>。茶树具有喜温、好湿、耐阴的特性,当秋季气候逐渐变化,面临低温、干旱、大风等逆境胁迫时,茶树生理生化及相关调控基因会发生相应变化,以适应环境的胁迫。此外,茶树品种间抗逆性存在较大差异<sup>[18]</sup>,故 *SAMS* 表达量在品种间差异最大。

Maluf 等研究了咖啡树中咖啡碱含量高低特异的品种的 *N*-甲基转移酶基因表达量,发现高咖啡碱含量的果实中咖啡碱合成酶表达量较高,低咖啡碱含量的果实中咖啡碱合成酶表达量较低,即咖啡树咖啡碱合成酶表达量与咖啡碱含量正相关<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,*TCSI* 表达量与咖啡碱含量显著正相关,即在茶树秋季嫩叶中,*TCSI* 表达量显著影响咖啡碱的合成,与 Maluf 等的结论<sup>[19]</sup> 相似。*TIDH* 表达量与咖啡碱不呈明显相关性,这与前人的结果<sup>[6]</sup> 一致,可能是因为 IMPDH 处于咖啡碱合成较为上游的位置,其基因表达量对咖啡碱含量影响较小。*SAMS* 表达量也与咖啡碱含量无明显相关性,这也与前人的结果一致<sup>[6]</sup>,可能是因为 SAM 广泛存在于植物体内,不仅与植物抗性存在显著关联<sup>[16-17]</sup>,而且除主要参与转甲基、转硫基、转氨丙基 3 种代谢途径外,还参与其他 40 多种生化反应<sup>[20]</sup>,所以其含量与咖啡碱含量的相关性较小。因此,*TIDH* 和 *SAMS* 的表达量不是控制茶叶咖啡碱合成的关键因素。同样,春季茶树中 *TCSI*、*TIDH*、*SAMS* 基因表达量与咖啡碱含量的相关性也呈现相同的趋势(结果尚未发表)。

综上所述,*TCSI* 表达量较 *TIDH*、*SAMS* 对茶树咖啡碱的合成起到更为重要的作用,进一步研究可以从上游调控区入手,调控 *TCSI* 基因表达量,以达到更有效地调节茶树咖啡碱含量的目的。

## 参考文献:

- [1] Suzuki T, Ashihara H, Waller G R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(8): 2575-2584.
- [2] Kato M, Mizuno K, Fujimura T, et al. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 579-586.
- [3] Stasolla C, Katahira R, Thorpe T A, et al. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(11): 1271-1295.
- [4] Mohanpuria P, Kumar V, Ahuja P S, et al. Producing low-caffeine tea through post-transcriptional silencing of caffeine synthase mRNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(6): 523-534.
- [5] Keya C A, Crozier A, Ashihara H. Inhibition of caffeine biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) plants by ribavirin[J]. *FEBS letters*, 2003, 554(3): 473-477.
- [6] Li Y Y, Ogita S, Keya C A, et al. Expression of caffeine biosynthesis genes in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Zeitschrift fur Naturforschung, Section C*, 2008, 63: 267-270.
- [7] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR[J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227-230.
- [8] 赵丽萍, 陈亮, 王新超, 等. 茶树新梢不同叶片中  $\beta$ -葡萄糖苷酶和  $\beta$ -羟草糖苷酶基因表达的实时定量 PCR 分析[J]. *茶叶科学*, 2006, 26(1): 11-16.
- [9] 林邦和, 钟秋生, 陈常颂. 茶叶叶片 *GDH*、*GS*、*GOGAT* 基因的克隆及荧光定量 PCR 分析[J]. *茶叶科学*, 2012, 32(6): 523-529.
- [10] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. *植物学报*, 2010, 45(5): 579-587.
- [11] Ashihara H, Shimizu H, Takeda Y, et al. Caffeine metabolism in high and low caffeine containing cultivars of *Camellia sinensis* [J]. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Section C: Biosciences*, 1995, 50(9/10): 602-607.
- [12] 虞富莲, 俞永明, 李名君, 等. 茶树优质资源的系统鉴定与综合评价[J]. *茶叶科学*, 1992, 12(2): 95-125.
- [13] 杨亚军, 虞富莲, 陈亮, 等. 茶树优异资源评价与遗传稳定性研究[J]. *茶叶科学*, 2003, 23(6): 1-8.
- [14] Kozhevnikova E N, van der Knaap J A, Pindyurin A V, et al. Metabolic enzyme IMPDH is also a transcription factor regulated by cellular state[J]. *Molecular Cell*, 2012, 47(1): 133-139.
- [15] Zhang R, Evans G, Rotella F J, et al. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(15): 4691-4700.

袁晓航,高剑峰,岳远瑞,等. 绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎的关联性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):24-27.

# 绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎的关联性分析

袁晓航,高剑峰,岳远瑞,周 路,陈月娥,苟亚峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

**摘要:**为了从自身的角度提高绵羊对传染性胸膜肺炎的抗感染能力,采用 MSAP(甲基敏感扩增多态性)的方法对 20 只患病绵羊和 20 只正常绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎关联性进行了分析。以绵羊在患传染性胸膜肺炎前后的全基因组 DNA 为研究对象,经过同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对其进行双酶切,最后通过测序胶的聚丙烯酰胺电泳处理从 16 对 MSAP 选择性引物组合中挑选出 4 对引物的扩增结果,进行绵羊患病前后甲基化变化的评估。分析结果,传染性胸膜肺炎的患病与否,与绵羊的甲基化程度有一定的关联,通过统计学分析得出患病绵羊甲基化水平普遍高于非患病绵羊,同时甲基化多态性也随之升高。结果对研究动物疾病与动物自身表观遗传之间关联起到一定的参考意义,也为今后的研究提供了理论依据。

**关键词:**湖羊;小尾寒羊;全基因组;甲基敏感扩增多态性(MSAP);DNA 甲基化

**中图分类号:**Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0024-04

绵羊支原体性肺炎是由绵羊肺炎支原体引发的,是一种高度接触性传染性疾病,临床特征表现为高热、咳嗽、喘气、渐进性消瘦和肺间质增生性炎症。病羊是主要的传染源,肺病组织和胸腔渗出液中含有大量病原体,主要经呼吸道分泌物排菌。不同品种羊对支原体性肺炎的易感性差异较大,国外肉用羊易感性最高,本地绵羊易感性略高于山羊,杂交羊的易感性介于两者之间。支原体性肺炎常体现出地方流行性,一年四季均可发生,冬夏两季多发,羊只机体抵抗力降低,寒冷潮湿、羊群密集等因素都有利于该疾病的发展。新疫区暴发该病,几乎都是由引进或迁入病羊或带菌羊引起的。发病后,在羊群中传播迅速,20 d 左右可以波及全群。李颖等对石河子地区湖羊支原体肺炎进行了流行病学调查,结果表明,湖羊的发病率是 20.4%,同群细毛羊发病较湖羊少<sup>[1]</sup>。

DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶的催化下,将甲基转移到胞嘧啶的 5' 位置上,使 DNA 分子中碱基结合甲基的过程<sup>[2]</sup>。众多研究表明,DNA 甲基化在基因表达、细胞分化、染色质失活、基因印记等方面起了重要的作用<sup>[3-4]</sup>。随着甲基化研究的深入,检测甲基化的方法也不断改进,根据其原理这

些方法可分为两大类:(1)是以亚硫酸盐为基础,未甲基化的胞嘧啶经亚硫酸盐处理后转变为胸腺嘧啶,而甲基化的胞嘧啶残基保持不变<sup>[5]</sup>。(2)甲基敏感性内切酶。甲基敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)是扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术经过改进而用于甲基化研究的方法。许多研究证实,MSAP 是检测基因组甲基化水平较为理想的方法<sup>[6]</sup>。目前研究 DNA 甲基化与病原感染后疾病关系的报道很少,李遇梅等对系统性红斑狼疮患者进行了研究,通过甲基化特异 PCR(MSP)方法检测 NDA 甲基化状态与趋化因子受体表达水平,结果表明 *p16* 基因在患者血浆 DNA 中启动子呈现高甲基化状态。本研究就采用 MSAP 的技术对绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎关联性分析进行了研究,以期能从自身的角度来提高绵羊对传染性胸膜肺炎的抗感染能力提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取 20 只患有传染性胸膜肺炎和 20 只正常的绵羊肌肉组织为试验样本。采自乌鲁木齐畜牧研究基地羊场和石河子西部牧业屠宰场。

### 1.2 方法

1.2.1 传染性胸膜肺炎的检测 通过临床症状、物理变化、实验室诊断(PCR 检测)3 方面检测羊是否患有传染性胸膜肺炎。

收稿日期:2013-03-27

基金项目:国家重点基础研究发展计划(国家“973”计划)(编号:2010CB530200)。

作者简介:袁晓航(1986—),男,山西人,硕士研究生,研究方向为功能基因组与分子免疫学。E-mail:yuanxiaohang2006@126.com。

通信作者:高剑峰,教授。E-mail:13519931689@163.com。

[16] 林凡云,王士强,胡银岗,等. 糜子 *SAMS* 基因的克隆及其在干旱复水中的表达模式分析[J]. 作物学报,2008,34(5):777-782.

[17] Ma X L, Wang Z L, Qi Y C, et al. Isolation of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(11): 1359-1365.

[18] 杨广容,倪金卫. 秋冬季茶树种抗寒性对光合呼吸作用的影响[J]. 福建茶叶,2002(4):14-15.

[19] Maluf M P, da Silva C C, de Oliveira M de P A, et al. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica* [J]. Genetics and Molecular Biology, 2009, 32(4): 802-810.

[20] Bottiglieri T. *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAME): from the bench to the bedside-molecular basis of a pleiotrophic molecule[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002, 76(5): 1151S-1157S.