

# 臺灣茶優良品系之活性成分HPLC指紋圖譜與ITS分子基原鑑定關鍵技術之建立

顏睿宏、李世傑

E-mail: 9701082@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本實驗利用台灣獨有的茶葉品種，篩選出高含量的兒茶素和酯型兒茶素，並建立台灣茶葉的兒茶素含量的數據資料，提供茶改場育種以及開發茶保健食品的依據。本實驗所開發的HPLC分析方法可以同時定量7種茶葉主要的兒茶素，分析的材料包括20種台茶系列TA01~20號、部份發酵茶14種、野生山茶12種和商業化品種5種等共計有52種茶種進行定量分析。結果發現兒茶素含量多寡依序為Epigallocatechin gallate (EGCG) > Epigallocatechin (EGC) > Epicatechin (EC) > Gallocatechin (GC) > Epicatechin gallate (ECG) > Catechin (C)。酯型兒茶素以EGCG的含量最高，每百克的乾葉中含有 $7.25 \pm 2.67$  (g/100g d.w.)。游離型兒茶素以EGC含量最高，為 $2.59 \pm 1.02$  (g/100g d.w.)。總兒茶素(TC=GC+EGC+C+EC+EGCG+ECG)最高含量為TM03品系的 $16.69 \pm 0.12$  (g/100g d.w.)，最低含量為TC04品系的 $7.91 \pm 0.26$  (g/100g d.w.)兩者相差一倍以上。7種個別兒茶素含量中，其中GC、EC和ECG變異較大(CV大於50%)，其餘4種相對較小。TA03、TA07、TA08、TA12、TA14、TA17、TA18、TM03和TM05這些品種茶樹的TC或是TCG皆有較高的含量，基於品種資源的保護，或因應未來開發保健食品的需求，都應得永續保留。甲基化的兒茶素(EGCG3" Me)具有抗過敏的功效，因此本研究針對特定茶樹葉片進一步行EGCG3" Me含量的比較性分析，結果顯示所分析的50種茶葉中，EGCG3" Me的含量高於0.6%乾葉重的有16種茶樹，大於0.8%的有14種，大於1%的有9種，僅占全部調查樣品1/3；其他34種茶葉相對的含量頗低。由此可知，不同茶樹來源的不同茶葉的EGCG3" Me含量差異頗大，有必要進一步對現有台灣茶樹進行更大規模的篩選具有更高含量EGCG3" Me茶樹。本實驗也選擇了40種台灣茶對其核醣體內轉錄區間(Internal Transcribed Spacer, ITS)序列定序，結果發現，在分佈於台灣山茶屬的種或變種的nrDNA區序列它們的序列長度在594bp~647bp之間，然而和中國大陸的山茶屬序列長度大約在476bp~496bp之間，且各序列的相似度在台茶間為0.571~1(1=100%)，與大陸茶的相似度在0.741~0.946(1=100%)之間，這個結果不僅顯示了台茶種源的多樣性，同時也提供了進一步以DNA鑑定台茶、大陸茶產地來源的可能性。本研究的成果建立台茶活性成分之HPLC指紋圖譜資料庫，並提供分子基原鑑定的平台技術，不僅提升台茶之國內外市場的競爭力，同時也促進茶葉生技產業之永續發展。

關鍵詞：兒茶素, 表沒食子兒茶素沒食子酸酯, 指紋圖譜, 內轉錄區域, 高效液相層析儀

## 目錄

封面內頁 簽名頁 授權書	iii 中文摘要
iv 英文摘要	vi 誌謝
viii 圖目錄	vii 目錄
xi 表目錄	xiii 1. 文獻討論
1.1 茶葉簡史	1.1.1 茶葉簡介
1.1.2 茶葉之化學成份	1.1.2 茶葉之生理活性
1.1.3 茶葉在分類學上的研究	1.1.3 茶葉抗過敏活性成分EGCG3" Me
1.1.4 台灣茶樹品種的簡史	1.2 茶葉的應用
2.1 茶葉的應用	2.1.1 茶葉的化學成份
2.1.2 茶葉之生理活性	2.1.2 茶葉之生理活性
2.1.3 茶葉抗過敏活性成分EGCG3" Me	1.3 植物在分子基原鑑定上的應用
5.1.3.1 RAPD在植物分子標記的研究進展	5.1.3.1 RAPD在植物分子標記的研究進展
5.1.3.2 AFLP在植物分子標記的研究進展	8.1.3.3 ITS在植物分子標記的研究進展
10.1.4 台灣茶葉未來的展望	11.2. 材料與方法
13.2.1 實驗材料	13.2.1.1 實驗茶葉
13.2.1.2 實驗藥品	13.2.1.3 實驗試劑組
14.2.1.4 酵素	14.2.1.5 儀器設備
15.2.2 研究方法	15.2.2.1 兒茶素測定
15.2.2.2 DNA萃取	16.2.2.3 DNA的定量與稀釋
17.2.2.4 ITS rDNA核酸引子進行聚合鏈鎖反應	18.2.2.5 膠體電泳回收純化
18.2.2.6 質體DNA之構築	19.2.2.7 質體DNA以熱休克(heat shock)之轉形
19.2.2.8 質體DNA之萃取	20.2.2.9 質體DNA定序
21.2.3 茶葉ITS-rDNA序列分析	21.2.3.1 序列分析
21.2.3.2 親緣關係圖的建立	21.2.4 統計分析
23.3. 結果與討論	24.3.1 台灣茶優良品系與高酯型兒茶素茶種源之篩選
24.3.1.1 兒茶素定量與定性	24.3.1.2 沸水萃取時間比較
24.3.1.3 茶葉中兒茶素與咖啡因含量檢測	25.3.1.4 台灣雜交茶種兒茶素含量差異
26.3.1.5 台灣部份發酵茶種和紅茶兒茶素含量差異	28.3.1.6 台灣野生茶種和商業化茶種兒茶素含量差異
29.3.1.7 EGCG3" Me兒茶素定量與定性	30.3.1.8 台灣綠茶EGCG3" Me的篩選
30.3.1.9 50個茶葉品種之主成份聚類分析(PCA)	31.3.2 探討台灣茶樹品種(山茶屬)ITS片段之變異性
32.3.2.1 山茶屬ITS片段	32.3.2.2 茶葉總DNA的抽取
33.3.2.3 ITS-PCR結果	34.3.2.4 40種品系ITS定序結果
34.3.2.5 40種品系演化樹探討	35.4. 結論
38 參考文獻	76 附錄
81	

參考文獻

王建波、張文駒、陳家寬1999植物分類學報。37(4): 450~490。史全良、諸葛強、黃敏仁2001 分子系統學原理及其在林木上的應用 生命科學。13(2):90-93。伊東明、?敏仁 1997 AFLP分子標記及其在植物育種上的應用生物工程。25(170): 6~11。汪小全、洪德元 1997植物分類學報。35(5): 465~480。邱湧忠 2005 綠茶生機。一橋出版社, 台北。胡智益、蔡右任、林順福 2004 利用簡單重複序列 ( ISSR ) DNA分子標誌評估台灣茶樹種原之遺傳變異, 中華農學會報。原征彥 1998 茶兒茶素 ( Catechin ) 類的生理活性作用 茶葉多元酚在食品/保健食品產業之製造及應用研討會 食品工業發展 研究所。新竹, 台灣。陳宗懋 2003 中國茶經 上海文化出版社。蔡永生、劉士綸、王雪芳、區少梅 2004 台灣茶業研究彙報 23: 115-132。張同吳 2003保健植物應用於休閒產業之研究。休閒作物資源之開發與應用研討會專刊, 農改場, 151-164。譚和平、徐利遠、余桂容、杜文平、馬增強 2004 RAPD技術對茶樹品種鑑別的研究。中國測試技術:30 3-6。Balasaravalan,T., P.K. Pius, R.R. Kumar, N. Muraleedharan, and A.K.Shasany. (2003) Genetic diversity among south India tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers. *Plant Sci.* 165:365-372. Cao,Y. and R. Cao. (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398: 381-382 Facts and Comparisons, (2002) The review of natural products : the most complete source of natural product information. 189:20-21 Chiu F.L., Lin J.K. (2005) HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3"- and 4"-methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages.*J Agric. Food Chem.* 53 ; 7035-7042. Gupta,S., K. Hastak, N. Ahmad, J.S. Lewin, and H. Mukhtar. (2001) Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10350-10355. Hour,T.C., Y.C. Liang, I.S. Chu and J.K. Lin. (1999) Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate,gallic acid and caffeine. *Food Chem. Toxicol.* 37:569-579. Kremer, A. and Petit, R.j. (1993) Gene diversity in natural pulations of oak Species .*Ann.Sci.*50:186-20. KYOJI YOSHINO, KENJIRO OGAWA, TOSHIO MIYASE,(2007) Inhibitory effects of the C-2 epimeric isomers of tea catechins on mouse type IV allergy. *J Agric. Food Chem.* 52:4660-4663.23. Kaundun,S.S., A. Zhyvoloup, and Y.G. Park. (2000) Evaluation of genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica* 115:7-16. Li Y.G., Dewald C.L., Sims P.L.(1999) Genetic relationships with in *tripsacum* and detected by RAPD variation .*Ann.Bot.*84:695-704. Lai,J.A., Yang, W.C., and Hsiao,J.Y. (2001) An assessment of genetic relationship in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:93-100. Liao, S., Kao, YH, Hiipakka, RA (2001) Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam.Horm.* 62:1-94. Lu,Y.P., Y.R. Lou, J.G. Xie, Q.Y. Peng, J. Liao, C.S. Yang, and M.T. Huang.(2002) Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12455-12460. Lotito, S. B. and Fraga, C. G. 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation *Free Radic. Biol. Med.* 24(3):435-441. Jankun, J., Selman, S. H., and Swiercz, R. 1997. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*, 387(5):561. Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, D.,and White, D. A. 1992. The inhibition of low-density lipoprotein by (+) catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem Pharmacol* 43: 445-450. Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M., and Tomita, I.1994. Inhibitory effects of tea polyphenols ( flavan-3-olderivatives ) on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biol Pharm. Bull.*17:1567-72. Mondal,T.K.(2002) Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz ) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica* 128:307-315. Maeda-Yamamoto, M.(1998) Effects of tea infusions of varieties or different manufacturing types on inhibition of mouse mast cell activation. *Biosci. Biotechnol.Biochem*,62:2277-2279. Maeda-Yamamoto, M.(2001) The change of Epigallocatechin-3-o-(3-o-methyl) gallate content in tea of different varieties, tea seasons of crop and processing method. *J Agric. Food Chem.*,1:64-68. Mitsusaki Sano,Massazumi Suzuki,Toshio Miyase,(1999) Novel anti-allergic catechin derives isolated form oolong tea.*J. Agric. Food. Chem.*,47:1906-1910. Nakagawa,K., M. Ninomiya, T. Okubo, N. Aoi, L.R. Juneja, M. Kim, K. Yamanak, and T. Miyazawa. (1999) Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J. Agric. Food Chem.* 47:3967-3973. Oiki S,Kawahara TK., (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among poplations of the insularendemic plant *Campanulamicrodonta* ( *Campanulaceae* ).*Ann.Bot.*, 87:661-667. Petit,S.,and phisms R.J. (1993) Geographic strcture of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks .*l'heor. Appl. Genet.* 1993,87:122-128. Risesberg,L.H. (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons.*Mol.Ecol*,5:99-105. Shaw, P. C. (2002) Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology. World Scientific Publishing. Singapore, 220:123-124. Sharma, S.K.(1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of 1ens and its comparison with RAPD analysis .*Theo Appl Genet*, 93:751-758. Swofford, D. L. (2001) Phylogenetic Analysis Using Parsimony, PAUP 4.08. Sinauer, Sunderland, MA. Saitou, U. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining methods: A new method for reconstructing phylogenetics tree. *Mol. Evol. Biol.* 4:25-26 Visser, T., Ferwarda, F., Wit, H., Veenman N.V and Zonen E., (1969) Outline of perennial crop breeding in the tropics. 22:459 – 493. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 38:315-322. Wachira,F., J. Tanaka, and Y. Takeda. (2001) Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. *J. Horti. Sci. Biotech.* 76:557-563. Wight, W., (1959) Nomenclature and classification of the tea plant. *Nature* 183: 1726 – 1728. Welsh, J.and Mmclell, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers .*Nucleic.Acid.Res.*1818:7213-7218. Widmer A.and Baltisberger M. (1999) Molecular evidence for alloyploid speciation and asingle origin of the narrow endemic *draba ladina* (*Brassicaceae*). 86: 1282-1289. Willams, P. L. and Fitch, W. M. (1989) Finding the minimalchang in a given tree. In “ The hieracy of life. ” P. Fernholm eds. Elsevier Science Publishers B. 453-469. Yang, T. T. and Koo, M. W. 1997. Hypocholesterolemic effect of Chinese tea. *Pharma. Res.* 35(6):505-1