

文章编号: 1000-8551(2016)03-0444-07

# 青花菜锌指蛋白基因 *BoCCCH1* 的克隆和表达分析

蒋明<sup>1</sup> 刘青娥<sup>2</sup> 管铭<sup>1</sup> 张雪<sup>1</sup> 陈雅<sup>1</sup> 左诗璇<sup>1</sup>(<sup>1</sup>台州学院生命科学学院/生态学浙江省重点学科, 浙江 椒江 317000; <sup>2</sup>丽水学院生态学院 浙江 丽水 323000)

**摘要:** CCCH 锌指蛋白广泛存在于真核生物中, 在植物的生长、发育和逆境胁迫响应中起着重要作用。为获知青花菜 CCCH 转录因子基因的序列特征和表达特性, 从青花菜叶片中克隆到 1 个 CCCH 基因, 命名为 *BoCCCH1*, 同时, 利用 RT-PCR 方法研究了其在不同器官及霜霉菌侵染叶片中的表达模式。序列分析结果表明, *BoCCCH1* 的基因组全长为 1 568 bp, 包含 1 个长度为 599 bp 的内含子, 2 个长度分别为 627 bp、342 bp 的外显子, 编码 322 个氨基酸, 蛋白质的分子量与等电点分别为 35 296.42 Da 和 8.47; *BoCCCH1* 有 2 个锌指结构, 类型均为 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H。系统发育分析结果表明, *BoCCCH1* 与其它植物的 21 条同源序列在进化树上分为 6 组, 来自十字花科的 CCCH 与 *BoCCCH1* 处于同一分支。基因表达结果表明, *BoCCCH1* 在叶、花茎、嫩角果、花蕾和花中表达, 其中花茎和嫩角果的表达量最高, 但在根中未检测到表达; 在霜霉菌侵染下, 叶片 *BoCCCH1* 的表达量升高, 到 24 h 和 36 h 时达到最大, 推测 *BoCCCH1* 与霜霉病抗性相关。本研究为进一步探明 *BoCCCH1* 在霜霉病抗性反应中的功能奠定了基础。

**关键词:** CCCH 锌指蛋白; 霜霉病; 基因表达; 青花菜

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.03.0444

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 又名绿花椰菜、绿菜花和西兰花等, 为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属植物, 由于富含矿物质、维生素、脂肪酸和萝卜硫素等, 成为深受人们喜爱的保健蔬菜<sup>[1-3]</sup>。霜霉病是青花菜的常见病害, 由霜霉菌 (*Hyaloperonos porarparasitica*) 引起, 该病害在整个生育期均可发生, 给青花菜生产带来一定的损失<sup>[4]</sup>。挖掘抗病基因是解析植物-病原菌互作机理的基础, 是开展抗病分子育种的重要前提条件之一。

锌指蛋白广泛存在于真核生物中, 它们的功能多样, 涉及 DNA 识别、RNA 包装、蛋白互作、信号转导、转录激活、蛋白折叠和组装等<sup>[5-6]</sup>。锌指蛋白参与诸多生物学及逆境胁迫响应过程, 高等植物中, 锌指蛋白在光形态建成、器官发育、干旱响应和抗病反应等方面起着重要作用<sup>[7-8]</sup>。根据锌指模体中半胱氨酸 (cysteine, C) 和组氨酸 (histone, H) 的数量及排列位

置, 锌指蛋白可分为 C2H2、C2C2、C2HC、C2C2C2C2、C2HCC2C2 和 CCCH 等类型<sup>[9-10]</sup>。CCCH 锌指蛋白在植物、动物和微生物中均有发现, 其锌指结构由 3 个半胱氨酸和 1 个组氨酸构成, 每个 CCCH 蛋白通常含有 1~6 个锌指结构<sup>[11]</sup>。CCCH 在植物中以家族形式存在, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中有 67 个成员, 水稻 (*Oryza sativa* L.) 和玉米 (*Zea mays* L.) 各有 68 个成员, 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 有 91 个成员, 而蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 仅有 34 个成员, 根据 CCCH 模体的数量和类型, 每个家族均可分为若干亚家族<sup>[12-15]</sup>。目前, 已从多种植物中克隆到 CCCH 基因, 如水稻、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、拟南芥和紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 等<sup>[16-20]</sup>。此外, CCCH 基因参与植物抗病反应已有少量研究<sup>[18, 21]</sup>, 但在青花菜中未见报道。本研究以青花菜为材料, 在克隆 *BoCCCH1* 基因的基础上, 进行序列

收稿日期: 2015-03-27 接受日期: 2015-06-16

基金项目: 浙江省本科院校中青年学科带头人学术攀登项目 (pd2013420) 浙江省自然科学基金项目 (LY13C150003) 浙江省重点学科 (浙江省台州学院生态学) 开放课题 (EKD2013-03)

作者简介: 蒋明, 男, 副教授, 主要从事植物发育生物学及其分子调控研究。E-mail: jiangming1973@139.com

通讯作者: 同第一作者。

分析和表达研究,为基因功能的验证奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

青花菜材料 Bo0112 为抗霜霉病纯合株系,花蕾紧密、细小,定植后 75~85 d 收获。于花期采集根、叶、花茎、花蕾、开放的花和嫩角果,用于 RNA 的提取;霜霉菌采自临海上盘青花菜基地,该基地位于浙江省东南沿海,常年青花菜种植面积 3 500 hm<sup>2</sup>,病叶带回实验室后用无菌 ddH<sub>2</sub>O 小心冲洗叶片上的白色霉层,将收集到的孢子稀释备用,待青花菜长至两叶一心时用喷雾法接种<sup>[22]</sup>。采集接种 0、6、12、24、36、72 h 时的叶片,置于 -80℃ 备用。*BoCCCH1* 的同源序列下载自 NCBI 中甘蓝型油菜 (*B. napus*) (登录号: CDX96041.1)、白菜 (*B. rapa*) (XP\_009105366.1)、山萮菜 (*Eutrema salsugineum*) (ESQ28458.1)、芥菜 (*Capsella rubella*) (EOA35456.1)、亚麻荠 (*Camelina sativa*) (XP\_010511807.1)、琴叶拟南芥 (*A. lyrata*) (EFH63428.1)、拟南芥 (*A. thaliana*) (AEE34763.1)、醉蝶花 (*Tarenaya hassleriana*) (XP\_010559235.1)、可可树 (*Theobroma cacao*) (EOY00014.1)、葡萄 (*Vitis vinifera*) (XP\_010663009.1)、白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) (XP\_009357366.1)、桃 (*Prunus persica*) (EMJ25397.1)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) (XP\_004497020.1)、梅 (*P. mume*) (XP\_008243303.1)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) (ESW14969.1)、大豆 (*Glycine max*) (XP\_003535712.1)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) (XP\_006344185.1)、绒毛状烟草 (*Nicotiana tomentosiformis*) (XP\_009607434.1)、大麦 (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) (BAJ91753.1)、玉米 (*Zea mays*) (AFW79284.1) 和二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) (XP\_003569444.1) 的 CCCH。

### 1.2 方法

1.2.1 基因克隆和转化 基因组 DNA 的提取采用 SDS 法<sup>[23]</sup>; RNA 提取用 Trizol 法<sup>[24]</sup>, cDNA 的合成采用 SMART<sup>™</sup> cDNA 合成试剂盒 (Clontech, USA) 操作根据其提供的说明书进行。引物 BoC3H1up: 5'-ATGG AAAACGAAACGGC-3' 和 BoC3H1dn: 5'-TCATTTAACA AGCTTGAAGGA-3'。在 0.2 mL PCR 管中依次加入 2.5 μL 10 × PCR 缓冲液(含 20 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>)、1.2 U *Taq* DNA 聚合酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 0.5 μL 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs、20 μmol·L<sup>-1</sup> 的上、下

游引物各 0.6 μL、40 ng 模板(DNA 或 cDNA),最后加无菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s、52.5℃ 退火 60 s、72℃ 延伸 90 s,共 35 个循环。

PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳后,切胶回收含目的条带的胶块,采用试剂盒法(上海碧云天生物技术研究所)回收 DNA。取 1.5 μL 回收产物与 p-GEM-Teasy 载体 (Promega) 连接过夜,用热激法导入 DH-5α 感受态细胞中,经涂布培养,挑取白色单菌落于 37℃ 振荡培养 12 h。用菌液 PCR 验证阳性克隆,PCR 程序同基因的克隆,反应体系中的模板改为 0.5 μL 菌液,其它不变,经电泳验证后各取 3 个阳性克隆用于测序。

1.2.2 生物信息学分析 DNAMAN 5.2.2 用于推导 *BoCCCH1* 编码的蛋白序列;分子量和等电点的预测采用在线工具 Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)); 在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 用于统计氨基酸的组成;用 Clustal X 1.81 软件比对 CCCH 及其同源序列;采用 Mega 3.1 软件构建进化树,建树方法为邻接法,自举检测次数 1 000<sup>[15]</sup>。

1.2.3 表达分析 根据测序结果,设计 *BoCCCH1* 的 RT-PCR 引物,分别为 BoC3H1RTup: 5'-CGCCAAGACA TGGTGAA-3' 和 BoC3H1RTdn: 5'-CTGGCAGTGGTCAC CGTAT-3',以等量 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。采用 25 μL 反应体系,RT-PCR 引物和 cDNA 模板的用量同 1.2.1。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s、55.6℃ 退火 40 s、72℃ 延伸 70 s,共 32 个循环。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳并拍照。以肌动蛋白基因为内标,上下游引物分别为 5'-TCTCGATGGAAG AGCTGGTT-3' 和 5'-GATCCTTACCGAGGGAGGTT-3',扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s、55.6℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 90 s,共 32 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BoCCCH1* 基因的特征

以 BoC3H1up 和 BoC3H1dn 为引物,分别以叶片基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,经测序后得到各自的序列。结果表明, *BoCCCH1* 的基因组全长为 1 568 bp,包含 1 个内含子,长度为 599 bp,第 1 与第 2 外显子的长度分别为 627、342 bp(图 1)。

### 2.2 *BoCCCH1* 编码蛋白的特征

青花菜 *BoCCCH1* 编码 322 个氨基酸,在线工具



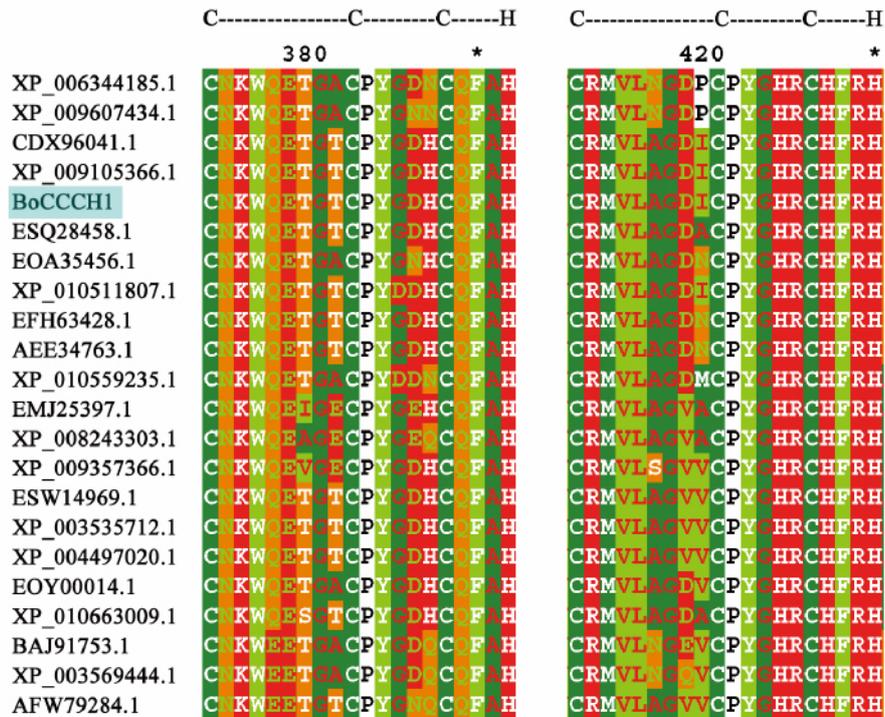


图 3 *BoCCCH1* 与同源序列锌指基序的比对

Fig. 3 Comparisons of zinc finger motifs between *BoCCCH1* and its homologous sequences

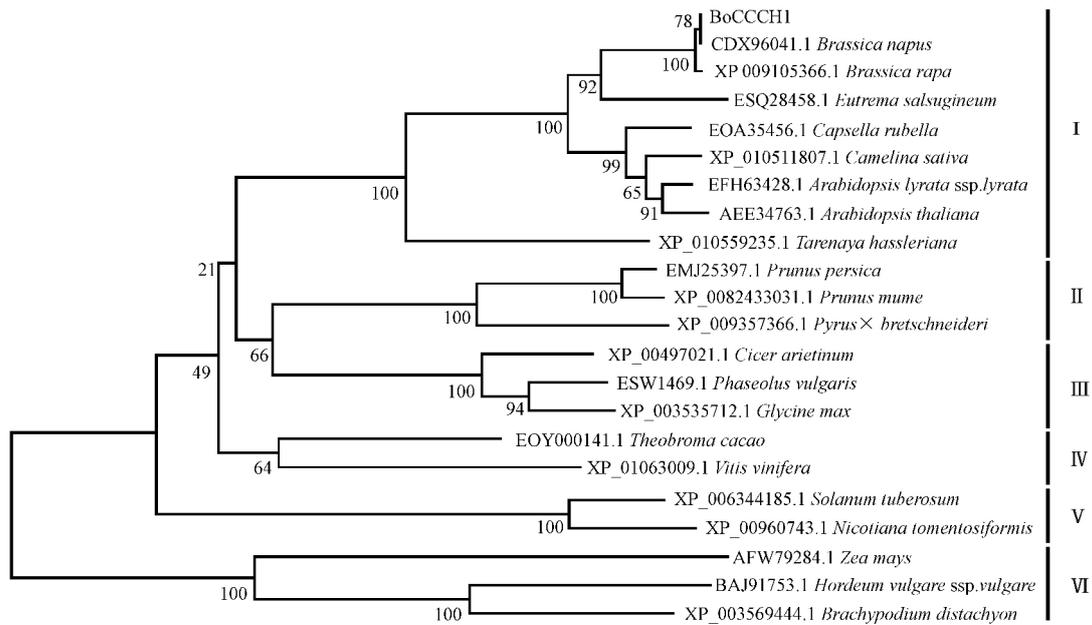
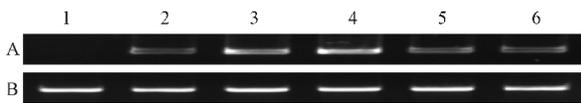


图 4 *BoCCCH1* 及其同源序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *BoCCCH1* and its homologous sequences

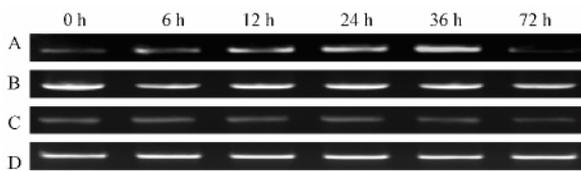


注: A: *BoCCCH1* 基因的表达; B: 肌动蛋白内标;  
1~6: 根、叶、花茎、嫩角果、花蕾和花。

Note: A: Expression of *BoCCCH1* gene. B: Actin control. 1 to 6:  
Roots, leaves, stalks, young siliques, flower buds and flowers.

图 5 *BoCCCH1* 在不同器官中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *BoCCCH1* in different organs



注: A: 霜霉菌感染后叶片 *BoCCCH1* 基因的表达; C: 对照叶片 *BoCCCH1* 基因的表达; B 和 D: 肌动蛋白内标。

Note: A: Expression of *BoCCCH1* gene challenged by *Hyaloperonos poraparasitica*. C: Expression of *BoCCCH1* gene in control leaves. B and D: Actin control.

图 6 霜霉菌感染下 *BoCCCH1* 在叶片中的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *BoCCCH1* in leaves challenged by *Hyaloperonos poraparasitica*

加 24 h 和 36 h 时达到最大, 72 h 时表达量下降(图 6)。

### 3 讨论

CCCH 锌指蛋白广泛存在于动物、植物和微生物中, 它们以家族形式存在于生物体。蒋明等<sup>[26]</sup>从核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 和灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 中共鉴定出 22 个 CCCH。CCCH 参与多种细胞生命活动, 在植物生长、发育和逆境响应过程中起着重要作用。CCCH 基因在不同组织器官中有着不同的表达模式, 蒺藜苜蓿 34 个成员中, *MtC3H14*、*MtC3H21* 和 *MtC3H32* 在芽中的表达量最高, 后者还在种荚中大量表达, *MtC3H11* 和 *MtC3H23* 则主要在根中表达<sup>[15]</sup>; 水稻 *OsTZF1* 在愈伤组织、胚芽鞘、嫩叶和穗中表达<sup>[16]</sup>。本研究中, 青花菜 *BoCCCH1* 基因在叶片、花茎、花、花蕾和嫩角果中表达, 其中花茎和嫩角果中的表达量最大, 根中则未检测到 *BoCCCH1* 基因的表达。CCCH 的表达与逆境响应相关, 拟南芥 *AtC3H23*

(*AtTZF1*) 参与葡萄糖代谢, 与脱落酸、赤霉素和肽类激素的响应调控相关<sup>[27]</sup>, 该基因还参与盐胁迫的调控<sup>[19]</sup>; 陆地棉 *GhZFP1* 的表达受 NaCl、干旱和水杨酸诱导, 其通过与 *GZIRD21A* 和 *GZIPR5* 互作, 参与盐胁迫和抗病反应<sup>[18]</sup>; 矮牵牛 (*Petunia hybrida*) *PhTZF1* 在根、茎、叶和花中均有表达, 表达量较小, 但在低温、干旱、ABA、MeJA、高盐和高渗胁迫下, 表达量均有不同程度的上调<sup>[28]</sup>。莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) *CCCH* 锌指蛋白基因 *Limp77* 在减氮条件下培养, 其表达量显著下降, 导致油脂含量增加, 说明该基因的表达抑制油脂的积累<sup>[29]</sup>。近年来霜霉病发生严重, 而分子育种缺少优良的靶标基因, 本研究通过接种霜霉菌, 研究 *BoCCCH1* 基因在该病原菌侵染下的表达模式。经 RT-PCR 检测, 发现 *BoCCCH1* 的表达受霜霉菌诱导, 表达量在 24 h 和 36 h 时最大, 暗示 *BoCCCH1* 基因参与霜霉病抗性反应。前期在青花菜中克隆到抗坏血酸过氧化物酶基因 *BoAPX2*、查尔酮合成酶基因 *BoCHS2*、防御素基因 *BoDFN* 等, 它们均在霜霉菌的诱导下表达, 过量表达 *BoDFN* 增加了青花菜对霜霉病的抗性<sup>[30-32]</sup>。

植物 CCCH 锌指结构可用通式 C-X<sub>4-15</sub>-C-X<sub>4-6</sub>-C-X<sub>3</sub>-H 表示, 数量为 1~6 个。拟南芥 *AtSZF1* 和 *AtSZF2* 的 C 端各含有 2 个相同的锌指结构 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[19]</sup>; 黄瓜 *CsSEF1* 蛋白中有 1 个 CCCH 锌指结构, *AtSZF1* 和 *AtSZF2* 相比, 其第 1 和第 2 个半胱氨酸之间少 1 个氨基酸, 锌指结构类型为 C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[17]</sup>; 水稻 *OsZF77* 含 2 个不同类型的 CCCH 锌指结构, 分别为 C-X<sub>15</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H 和 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[33]</sup>; 矮牵牛 *PhTZF1* 也有 2 个 CCCH 锌指结构, 分别为 C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H 和 C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[28]</sup>; 小麦 (*Triticum aestivum*) 的 *TaZnFP* 含 2 个锌指结构, 类型为 C-X<sub>9</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H 和 C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[34]</sup>; 水稻 *OsLIC* 与油菜素内酯信号转导相关, 它仅有 1 个 CCCH 锌指结构, 类型为 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H<sup>[35]</sup>。本研究中, *BoCCCH1* 有 2 个同样的锌指结构 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H, 类型与 *AtSZF1* 和 *AtSZF2* 相同。进化树结果表明, 青花菜 *BoCCCH1* 与同为十字花科的拟南芥、甘蓝型油菜和亚麻荠等处于同一分支, 而与禾本科植物的玉米、大麦和二穗短柄草关系最远, 聚类结果与植物传统分类一致。青花菜 *BoCCCH1* 基因的克隆与表达分析, 为该基因在抗病反应中的功能研究奠定了基础。下一步将利用实时荧光定量 PCR 开展基因表达分析, 以获得更为精确的表达数据; 同时, 将构建植物表达载体, 研究

*BoCCCH1* 过量和抑制表达时,青花菜植株对霜霉菌抗性的影响。

## 4 结论

本研究以青花菜为材料,克隆到 1 个 CCCH 基因,定名为 *BoCCCH1*。该基因包含 1 个内含子,编码区全长为 969 bp,编码 322 个氨基酸。推导的蛋白质有 2 个 CCCH 结构域,类型均为 C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H,序列比对结果表明,*BoCCCH1* 的 2 个锌指结构序列十分保守,仅个别氨基酸残基发生变异。*BoCCCH1* 在青花菜的叶片、花茎、嫩角果、花蕾和花中表达,在根中未能检测到该基因的表达;在霜霉菌侵染下,*BoCCCH1* 的表达量增加到 24 h 和 36 h 时达到最大值,暗示该基因与青花菜霜霉病抗性相关。

### 参考文献:

- [1] Gliszczynska-Swiglo A, Ciska E, Pawlak-Lemanska K, Chmielewski J, Borkowski T, Tyrakowska B. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2006, 23(11): 1088-1098
- [2] 曾爱松, 华秀红, 张云霞, 宋立晓, 高兵, 严继勇. 四倍体青花菜小孢子培养及胚胎发育途径研究 [J]. *核农学报*, 2014, 28(8): 1358-1364
- [3] 李庆鹏, 崔文慧, 郭芹, 靳婧, 李伟明, 哈益明. 曲酸处理对鲜切西兰花品质及生理变化的影响 [J]. *核农学报*, 2014, 28(9): 1664-1668
- [4] 陈海平, 董荷玲, 冯春梅. 青花菜霜霉病的发生和流行规律 [J]. *浙江农业科学*, 2013, (1): 56-58
- [5] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(1): 39-46
- [6] Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(7/8): 1150-1160
- [7] Takatsuji H. Zinc-finger transcription factors in plants [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1998, 54(6): 582-596
- [8] D'Andrea R M, Triassi A, Casas M I, Andreo C S, Lara M V. Identification of genes involved in the drought adaptation and recovery in *Portulaca oleracea* by differential display [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 90: 38-49
- [9] Klug A, Schwabe J W. Protein motifs 5. Zinc fingers [J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9(8): 597-604
- [10] Krishna S S, Majumdar I, Grishin N V. Structural classification of zinc fingers: survey and summary [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(2): 532-550
- [11] 秦智慧, 杨青川, 晁跃辉, 康俊梅. CCCH 型锌指蛋白研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010, (8): 1-6
- [12] Wang D, Guo Y, Wu C, Yang G, Li Y, Zheng C. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 44
- [13] Peng X, Zhao Y, Cao J, Zhang W, Jiang H, Li X, Ma Q, Zhu S, Cheng B. CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40120
- [14] Chai G, Hu R, Zhang D, Qi G, Zuo R, Cao Y, Chen P, Kong Y, Zhou G. Comprehensive analysis of CCCH zinc finger family in poplar (*Populus trichocarpa*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 253
- [15] Zhang C, Zhang H, Zhao Y, Jiang H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y. Genome-wide analysis of the CCCH zinc finger gene family in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(10): 1543-1555
- [16] Jan A, Maruyama K, Todaka D, Kidokoro S, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. OsTZF1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1202-1216
- [17] Tazuke A, Asayama M. Expression of CsSEF1 gene encoding putative CCCH zinc finger protein is induced by defoliation and prolonged darkness in cucumber fruit [J]. *Planta*, 2013, 237(3): 681-691
- [18] Guo Y H, Yu Y P, Wang D, Wu C A, Yang G D, Huang J G, Zheng C C. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5 [J]. *New Phytologist*, 2009, 183(1): 62-75
- [19] Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Wu X, Xie Q, Li C. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48(8): 1148-1158
- [20] Chao Y, Zhang T, Yang Q, Kang J, Sun Y, Gruber MY, Qin Z. Expression of the alfalfa CCCH-type zinc finger protein gene MsZFN delays flowering time in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Science*, 2014, 215/216: 92-99
- [21] Deng H, Liu H, Li X, Xiao J, Wang S. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 876-889
- [22] Jiang M, Miao L X, He C M. Overexpression of an oil radish superoxide dismutase gene in broccoli confers resistance to downy mildew [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(4): 966-972
- [23] Pich U, Schubert I. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3328-3328
- [24] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163

- [26] 蒋明,管铭,潘小翠,张金国,胡佳涓. 核盘菌和灰葡萄孢菌 CCCH 锌指蛋白基因的鉴定和比较分析 [J]. 核农学报, 2013, 27(8): 1118 - 1124
- [27] Lin P C, Pomeranz M C, Jikumaru Y, Kang S G, Hah C, Fujioka S, Kamiya Y, Jang J C. The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses [J]. Plant Journal, 2011, 65(2): 253 - 268
- [28] 宁露云,李蓓,包满珠,张蔚. 矮牵牛冷响应锌指蛋白基因 *PhTZF1* 的分离与表达分析 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(2): 24 - 30
- [29] 王蒙,费小雯,徐立新,邓晓东. 莱茵衣藻中 Limp77 基因干涉后油脂含量升高 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(12): 1180 - 1186
- [30] 蒋明,张志仙,袁菱婧. 青花菜抗坏血酸过氧化物酶基因 *BoAPX2* 的克隆与表达 [J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 374 - 380
- [31] 蒋明,苗立祥,钱宝英,魏冬梅. 青花菜 *BoCHS2* 基因的克隆、表达和反义载体的构建 [J]. 核农学报, 2011, 25(3): 443 - 447
- [32] Jiang M, He C M, Miao L X, Zhang Y C. Overexpression of a broccoli defensin gene *BoDFN* enhances downy mildew resistance [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(7): 1137 - 1144
- [33] 刘梅芳,周淑芬,徐桂磊,刘华清,王锋. 一个水稻 CCCH 型锌指蛋白基因的表达模式分析 [J]. 福建农业学报, 2008, 23(3): 225 - 230
- [34] Min D H, Zhao Y, Huo D Y, Li L C, Chen M, Xu Z S, Ma Y Z. Isolation and identification of a wheat gene encoding a zinc finger protein (TaZnFP) responsive to abiotic stresses [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(5): 1597 - 1604
- [35] Wang L, Xu Y, Zhang C, Ma Q, Joo S H, Kim S K, Xu Z, Chong K. OsLIC, a novel CCCH-type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids signaling [J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3521

## Isolation and Expression Analysis of a Zinc Finger Protein Gene *BoCCCH1* From Broccoli

JIANG Ming<sup>1</sup> LIU Qing'e<sup>2</sup> GUAN Ming<sup>1</sup> ZHANG Xue<sup>1</sup> CHEN Ya<sup>1</sup> ZUO Shixuan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Ecology Key Discipline of Zhejiang Province/College of Life Sciences, Taizhou University, Jiaojiang, Zhejiang 318000; <sup>2</sup>College of Ecology, Lishui University, Lishui, Zhejiang 323000)

**Abstract:** CCCH zinc finger proteins are widely distributed in eukaryotic organisms, and they play important roles in plant growth, development and stress responses. To learn about sequence features and expression characters of broccoli CCCH transcription factor gene, a CCCH gene designated *BoCCCH1*, was isolated from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), and expression patterns of *BoCCCH1* in different organs as well as leaves invaded by *Hyaloperonospora parasitica* were performed by means of RT-PCR. Sequence analysis results indicated that the full length genome of *BoCCCH1* was 1 568 bp with a sole intron of 599 bp. The two exons were 627 and 342 bp in length encode 322 amino acids, the molecular weight and isoelectric point were 35296.42 Da and 8.47, respectively. Phylogenetic analysis results indicated that *BoCCCH1* and its homogeneous sequences were divided into 6 groups, and it was grouped with sequences from other Cruciferae plants. Expression analysis results revealed that *BoCCCH1* expressed in leaves, stalks, young siliques, flower buds and flower, with the highest expression levels in stalks and siliques, however, no expression was detected in roots. The expression were increased in leaves when infected by *H. parasitica*, and the highest expression levels were identified on 24 h and 36 h, indicating *BoCCCH1* with resistance responses against *H. parasitica*. Isolation and expression analysis of *BoCCCH1* will provide evidences for further studies on gene functions during downy mildew resistance responses.

**Keywords:** CCCH zinc finger protein, downy mildew gene expression, *Brassica oleracea* var. *italica*