青花菜锌指蛋白基因 BoCCCH1 的克隆和表达分析

蒋 明' 刘青娥' 管 铭'张 雪'陈 雅' 左诗璇'

(1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;2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 *BoCCCH*1,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,*BoCCCH*1 的基因组全长为1568 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35296.42 Da 和 8.47; BoCCCH1 有 2 个锌指结构,类型均为 C-X₈ - C-X₃ - 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,*BoCCCH*1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 *BoCCCH*1的表达量升高,到24h和36h时达到最大,推测 *BoCCCCH*1与霜霉病抗性相关。本研究为进一步探明 *BoCCCH*1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^[1-3]。霜霉病是青花菜的常见病害,由霜霉菌(*Hyaloperonos poraparasitica*)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^[4]。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^[5-6]。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^[7-8]。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 C2HCC2C2和 CCCH 等类型^[9-10]。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^[11]。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^[12-15]。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^[16-20] 此外 ,CCCH 基因参与植物抗病反应已有少 量研究^[18,21] 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

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。

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)

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 hm²,病叶带回实 验室后用无菌 ddH₂O 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^[22]。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)、荠菜 (Capsella rubella) (EOA35456.1)、亚麻荠(Camelina sativa) (XP_010511807.1) 、琴叶拟南芥(A. lyratassp. 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(Vitisvinifera)(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^[23]; RNA 提取用 Trizol 法^[24], cDNA 的合成采 用 SMART[™] 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 μ L10 × PCR 缓冲液(含20 mmol·L⁻¹ Mg²⁺), 1.2 U *Taq* DNA 聚合酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公 司) ρ . 5 μ L 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 20 μ mol·L⁻¹的上、下 游引物各 0.6µL 40 ng 模板(DNA 或 cDNA),最后加 无菌 ddH₂O 至 25µL。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 1.5μL 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/);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1000^[15]。

1.2.3 表达分析 根据测序结果,设计 *BoCCCH*1 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 μ L 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 45s ,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,*BoCCCH*1 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



注: 实心方块及上面的数字表示外显子及外显子的长度; 直线及上面的数字表示内含子及内含子的长度。

Note: Solid box and number above indicate exon and its length. Line and number above indicate intron and its length.

图 1 BoCCCH1 的基因结构

Fig. 1 Gene structure of BoCCCH1

Compute pI/Mw 预测得到的分子量为 35 296. 42 Da ,等 电点 8. 47。在线工具 ProtParam 的统计结果表明 ,编 码蛋白中甘氨酸(glycine,G)的含量最高,达 10. 6%, 丝氨酸(serine,S)次之,色氨酸(tryptophane,W)最 少,仅1个残基,占0. 3%。推导蛋白 BoCCCH1的 C 端有 2 个 CCCH 锌指结构,分别位于 234 ~ 261 和 272 ~ 299 处(图 2)。这 2 个锌指结构可用 C-X₈ - C-X₅ -C-X₃ - H 表示,其中 X 代表任意氨基酸 8×5 和 3 表示 2 个半胱氨酸之间的氨基酸数量。

2.3 BoCCCH1 与同源序列的比对

从 NCBI 下载 21 条 BoCCCH1 的同源序列,这些 蛋白质由 296~365 个氨基酸残基数组成,其中,菜豆 CCCH 的序列最长,鹰嘴豆次之,为 362 个,山萮菜的 最短。它们的 C 端均带有 2 个 CCCH 锌指结构,跟 BoCCCH1 一样,均可用 C-X₈ - C-X₅ - C-X₃ - H 表示。 比对结果表明 22 条序列的氨基酸组成和排列差异较 大 (Q 97 个保守位点 但 2 个锌指结构却十分保守,Q 个别氨基酸存在差异(图 3)。第1 个锌指结构的5、7、 9、13、14 和 15 位氨基酸存在差异,而第 2 个锌指结构 仅在 6、8 和 9 位有氨基酸残基存在差异,较第1 个保 守。

由图 4 可知 22 种植物的 CCCH 在系统发育树上 可分为 6 组。青花菜 BoCCCH1 和同为十字花科的甘 蓝型油菜、白菜、拟南芥、琴叶拟南芥、亚麻荠、山萮菜、 醉蝶花及荠菜 CCCH 聚为一组,其中 3 种芸薹属植物 即青花菜、甘蓝型油菜和白菜 CCCH 处于同一分支,支 持率达 100%; 蔷薇科(Rosaceae)的桃、梅和白梨 CCCH 聚为一组; 可可树和葡萄虽属于不同科,可可树 属梧桐科(Sterculiaceae),而葡萄属葡萄科(Vitaceae), 它们的 CCCH 在发育树上聚为一组,但支持率较低,仅 64%; 豆科(Leguminosae)(菜豆、鹰嘴豆和大豆)、茄科 (Solanaceae)(马铃薯和绒毛状烟草) 及禾本科 (Gramineae)(大麦、玉米和二穗短柄草)的 CCCH 分 别处于不同分支,支持率均为 100%。

2.4 BoCCCH1 的表达分析

以等量的根、叶、花茎、嫩角果、花蕾和开放花的 eDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,电泳结果表明,除根 外 均检测到 *BoCCCH*1 的表达,其中花茎和嫩角果中 的表达量较高,而叶、花蕾和花中的表达量相对较低 (图5)。以霜霉菌侵染前后的叶片 eDNA 为模板进行 PCR 扩增,结果表明,侵染6h时基因表达量开始增

```
1
   ATGGAAAACGAAACGGCGCCGTTTAGTTACAGCGGCACCTCCGCCGTTGGAATCGCCAACTCTCACGGCGAACCTTCTCTCTTACGCGATCAGCTCTAC
    MENETAPFSYSGTSAVGIANSHGEP
1
                                                        SLL
                                                              R D
                                                                  0
                                                                    LY
100
   CACTCCAACAGCCGCAGCGTGATGCAGCGCCAAGACCATGGTGAACCGAGAGGCGTTGTGCTACACGCGCCTCCACGAGGCGTCGCTCGAAGCGGAA
       NSRSVMQ
34
    Ħ
                       Q R Q D M V N R E A L C Y T R L
                                                       HEA
                                                                       E
      S
                                                              S L E
                                                                    A
199
   GTGCTCCGTCTCGAGAACACGGAGCTCCGCTCGATGAATCTCCACCTCAAGAAGGAGCTCGACCAGCTGATCAGATCCTCTATCCAGAACCGATTCGGC
67
      LR
         L E N T E L R S M N L H L K K E
                                           L D
                                               QLI
                                                      R
                                                        S S
                                                            I
                                                                  R
298
   TACGATAGGGTTCCGCTTCGGATGCTTAGCAATCTTTCGATCGGAGGAGGGAATAATCGCGGCGCCGAGGACGCGGGGAGAATCAGAACCGTGCGGTTAAT
100
    Y D R V P L R M L S N L S I G G G N N R G A E D A E N O N R A
                                                                      N
   CGAGATGACGTCAGCGATGAGAGTCCGACGAGCGTGATTGCGAGTGAGGATCTGAACCGTTCGTCGCCGAAGAGCATCTCCGTGAGATCCAGCGGT
397
    R D D V S D E S P T S V I A S E D L N R S S L P K S I S V R S S G
133
496
   166
              SKS
            S
                                     GGAAAA
                                                  Q C
                                                      G
                                                       KS
                                                            R
                                                              GA
                                                                  v
                                                                     A K
   595
199
            GOOLSTTOR
                               V Y
                                   VRGG
                                           KKEEEE
                                                       Е
                                                          ΙE
                                                                       N
       A
          С
694
   CARGGGATGACAAAGACAGAGCTCTGCAACAAGTGGCAAGAGACGGGGACATGCCCATACGGTGACCACTGCCAGTTCGCTCACGGCATTAAAGAACTC
      GMTKTELCNKWQETGTCPYGDHCQFAHGIKEL
232
    0
   CGCCCAGTGATCCGCCATCCTCGTTACAAGACTGAAGTTTGCAGAATGGTTCTTGCTGGTGACATCTGTCCTTACGGCCACCGTTGCCACTTCCGCCAC
793
265
    R P V I R H P R Y K T E V C R M V L A G D I C P Y G H R C H F R H
892
   TCACTATCTGAGCAAGAGAAGCTCATGGCCGCTGGTTGCAAACCCCAACAACAAGTCCTCCTTCAAGCTTGTTAAATGA
298
    S L S E Q E K L M A A G C K P N N K S S F K L V K
```

注: 阴影部分为2个 CCCH 结构域。

Note: Two CCCH domainsare highlighted in shades.

图 2 BoCCCH1 的编码区及推导的蛋白质序列

Fig. 2 Coding sequence and its deduced protein sequence of BoCCCH1

	СККН		ССН	
	380	*	420	*
XP_006344185.1	CNKWOETGACPY(DNCQFAH	CRMVLNGDPCPY	HRCHFRH
XP_009607434.1	CNKWOETGACPY	NNCQFAH	CRMVLNCDPCPY	HRCHFRH
CDX96041.1	CNKWQETCTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDICPY	HRCHFRH
XP_009105366.1	CNKWQETCTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDICPY	HR <mark>C</mark> HFRH
BoCCCH1	CNKWQETCTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDICPY	HRCHFRH
ESQ28458.1	CNKWQETGTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDACPY	HRCHFRH
EOA35456.1	CNKWQETGACPYC	NHCOFAH	CRMVLAGDNCPY	HR <mark>C</mark> HFRH
XP_010511807.1	CNKWQETCTCPYI	DHCOFAH	CRMVLAGDICPY	HRCHFRH
EFH63428.1	CNKWOETGTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDNCPY	HRCHFRH
AEE34763.1	CNKWQETGTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGDNCPY	HRCHFRH
XP_010559235.1	CNKWQETGACPY1	DDNCQFAH	CRMVLAGDMCPY	HRCHFRH
EMJ25397.1	C <mark>NKWQEIGE</mark> CPYC	EHCOFAH	C <mark>RMVLAGVAC</mark> PY	HRCHFRH
XP_008243303.1	CNKWOEAGECPY	EOCOFAH	CRMVLAGVACPY	HRCHFRH
XP_009357366.1	CNKWQEVGECPY	DHCOFAH	CRMVLSGVVCPY	HRCHFRH
ESW14969.1	CNKWQETGTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGVVCPY	HRCHFRH
XP_003535712.1	CNKWQETGTCPY	DHCOFAH	CRMVLAGVVCPY	HRCHFRH
XP_004497020.1	CNKWQETGTCPY	DHCOFAH	C <mark>RMVLAGVVC</mark> PY	HRCHFRH
EOY00014.1	CNKWQETGACPY	DHCOFAH	C <mark>RMVLAGDVC</mark> PY	HRCHFRH
XP_010663009.1	CNKWQESGTCPY	DHCOFAH	C <mark>RMVLAGD</mark> ACPY	HRCHFRH
BAJ91753.1	CNKWEETGACPYC	DOCOFAH	CRMVLNGEVCPY	HRCHFRH
XP_003569444.1	CNKWEETGACPYC	DOCOFAH	CRMVLNGOVCPY	HRCHFRH
AFW79284.1	CNKWEETGTCPY	NOCOFAH	CRMVLAGVVCPY	HRCHFRH

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 *BoCCCH*1 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: 霜霉菌侵染后叶片 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 霜霉菌侵染下 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^[26] 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 *MtC3H*14、*MtC3H*21 和 *MtC3H*32 在芽中的表达量最高 后者还在种荚中大 量表达 *MtC3H*11和 *MtC3H*23 则主要在根中表达^[15]; 水稻 OsTZF1 在愈伤组织、胚芽鞘、嫩叶和穗中表 达^[16]。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、赤霉酸和肽类 激素的响应调控相关^[27],该基因还参与盐胁迫的调 控^[19]; 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^[18]; 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^[28]。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^[29]。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24h和36h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^[30-32]。

植物 CCCH 锌指结构可用通式 C-X₄₋₁₅ - C-X₄₋₆ -C-X₃-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-X₈ - C-X₅ - C-X₃ - H^[19]; 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-X₇-C-X₅ - C-X₃ - H^[17]; 水稻 OsZF77 含 2 个不同类型的 CCCH 锌指结构 ,分别为 C-X15 - C-X5 - C-X3 - H 和 C-X₈ - C-X₄ - C-X₃ - H^[33]; 矮牵牛 PhTZF1 也有 2 个 CCCH 锌指结构,分别为 C-X7 - C-X5 - C-X3 - H 和 C- $X_5 - C-X_4 - C-X_3 - H^{[28]}$; 小麦(Triticum aestivum) 的 TaZnFP 含 2 个锌指结构 ,类型为 C-X。 - C-X、 - C-X、 -H和C-X5-C-X4-C-X3-H[34];水稻OsLIC与油菜 素内酯信号转导相关 定仅有1个 CCCH 锌指结构 类 型为 C-X₈ - C-X₅ - C-X₃ - H^[35]。本研究中, BoCCCH1 有2个同样的锌指结构 C-X₈ - C-X₅ - C-X₃ - 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 *BoCCCH*1。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-X₈ - C-X₅ - C-X₃ - 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。*BoCCCH*1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, *BoCCCH*1的 表达量增加,到24h和36h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] Gliszczyńska-Swigło A, Ciska E, Pawlak-Lemańska K, Chmielewski J, Borkowski T, Tyrakowska B. Changes in the content of healthpromoting 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] Ciftei Yilmaz S, Mittler R. The zine 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

Journal of Nuclear Agricultural Sciences 2016 30(3):0444 ~0450

- [26] 蒋明,管铭,潘小翠,张金国,胡佳渭. 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 fingerprotein 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 *BoAPX*2 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 *BoCCCH*1 From Broccoli

JIANG Ming¹ LIU Qing´e² GUAN Ming¹ ZHANG Xue¹ CHEN Ya¹ ZUO Shixuan¹

(¹Ecology Key Discipline of Zhejiang Province/College of Life Sciences, Taizhou University, Jiaojiang, Zhejiang 318000; ²College 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 *BoCCCH*1, was isolated from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), and expression patterns of *BoCCCH*1 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 *BoCCCH*1 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*BoCCCH*1 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 *BoCCCH*1 with resistance responses against *H. parasitica*. Isolation and expression analysis of *BoCCCH*1 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