

# 油菜COR基因的克隆及原核表达

张腾国<sup>1</sup>, 郭艳峰<sup>1</sup>, 陈琼琼<sup>1</sup>, 夏小慧<sup>2</sup>

(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 兰州城市学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以冬油菜陇油6号叶片为材料, 利用RT-PCR法克隆到油菜COR基因编码区序列, 全长390 bp。将其与大肠杆菌表达载体pET-30a连接, 构建原核表达载体pET-30a-COR, 并转化大肠杆菌BL21, 经IPTG诱导表达后, SDS-PAGE检测结果表明该基因表达了1个约14.3 kD的蛋白, 为进一步研究目的蛋白的结构和功能提供了实验基础。

**关键词:** 陇油6号; COR基因; 克隆; 原核表达

**中图分类号:** Q753; S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)04-0001-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.04.001

## Cloning and Prokaryotic Expression of *Brassica campestris* COR Gene

ZHANG Teng-guo<sup>1</sup>, GUO Yan-feng<sup>1</sup>, CHEN Qiong-qiong<sup>1</sup>, XIA Xiao-hui<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Lanzhou City University, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** A full-length of COR gene is cloned by RT-PCR from Longyou 6 (*Brassica campestris* L.), the gene encoding area of COR is 390 bp. It is connected with the *E. coli* expression vector pET-30a. A recombinant prokaryotic expression vector pET30a-COR is constructed and transformed into *E. Coli* BL21, after IPTG induction, SDS-PAGE showed that the gene express an approximately 14.3 kD protein. For the further study on the structure and function of target protein provides an experimental basis.

**Key words:** Longyou 6; COR gene; Cloning; Prokaryotic expression

植物为了维持正常的生长和发育, 需要不断的感知和适应外界环境的变化。低温是主要的环境胁迫因素之一, 当受到低温胁迫时, 绝大多数植物需要经过一段低温驯化(cold acclimation)过程以获得对低温的耐受能力。在植物响应低温胁迫的驯化过程中, 体内发生着许多生理生化和分子变化<sup>[1]</sup>, 包括细胞和组织结构的变化、新陈代谢过程的变化、基因表达水平的变化等<sup>[1-3]</sup>, 其中以低温激活或抑制基因的转录最为重要。拟南芥中受低温调节的基因占到了基因组的4%~20%<sup>[4]</sup>, 其中有一类低温胁迫响应基因COR (for cold responsive), 其启动子区有干旱反应元件DRE/CRT, 拥有共同的核心基序(CCGAC)。拟南芥中有几种COR基因(cold responsive genes), 其中COR15a基因编码一个Mr为15 000的多肽, 转基因研究表明, 在-8~-4℃的范围内, 含有COR15am的原生质体比不含有COR15am的原生质体更具有抗冻性, 且COR15a的表达能增加原

生质膜的低温稳定性(cryostability)<sup>[5]</sup>。除了COR15a以外, 还有COR66、COR47和COR78等低温反应基因。在低温驯化期间, 这几个基因也能表达。COR15a与它们的协同表达可明显提高植物的抗寒性<sup>[6]</sup>。

人们对COR基因协同表达进行了大量的研究, 发现了它们的转录激活因子CBF, Stockinger等从拟南芥中分离得到了能够结合干旱反应元件DRE/CRT的转录因子DREB1/CBF<sup>[7]</sup>。CBF基因家族的3个成员可以被低温胁迫短暂而迅速的诱导<sup>[8,9]</sup>, 诱导的CBF转录因子可以结合到COR基因启动子顺式作用元件上, 激活COR基因的表达。

从拟南芥中分离得到1个组成型表达的转录因子ICE1(inducer of CBF expression 1), ICE1基因编码类似MYC的bHLH转录因子, 在低温胁迫响应途径中, ICE1作为CBFs的上游因子, 可特异地结合到CBF3启动子的MYC作用元件, 激活CBF3的表达并诱导CBF/DREB1下游基因的转录

收稿日期: 2015-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(31460099、31160089); 甘肃省自然科学基金(1208RJZA268)

作者简介: 张腾国(1971—), 男, 甘肃会宁人, 教授, 博士, 主要从事抗逆生理及分子生物学研究工作。E-mail: zhangtengguo@163.com

表达。组成型过量表达 *ICE1* 可以增强低温驯化过程中 *CBF3*、*CBF2* 以及 *COR* 基因的表达, 增强转基因植株的低温耐受能力, *ICE1* 突变体可以减弱低温对 *CBF3* 及受 CBFs 转录因子控制的 *COR* 基因的诱导表达<sup>[4]</sup>。以上研究表明, 由 *ICE1*→*CBF*→*COR* 组成的低温响应转录网络在植物低温驯化过程中发挥着重要的作用。

油菜是重要的油料作物, 白菜型油菜 (*Brassica campestris*.L) 新品种陇油 6 号是一种超强抗寒性品种, 适于极端低温为  $-30 \sim -20$  °C 的旱区、寒区种植。本研究以陇油 6 号油菜为材料, 克隆了 *ICE1*→*CBF*→*COR* 低温响应转录网络中的 *COR* 基因, 并在大肠杆菌中进行了表达, 以期在植物抵御低温胁迫的作用机制补充新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

以陇油 6 号油菜为供试材料。将陇油 6 号油菜种子播种到含有混合营养土的小塑料盆内, 置于室温条件下培养 28 d 左右, 然后转入 4 °C 冰箱冷处理 24 h, 剪取油菜叶片, 直接用于 RNA 的提取。

原核表达载体 pET30a 由西北师范大学生命科学学院分子生物学实验室保存, 克隆载体 pTG19-T、T4 DNA 连接酶购自于捷瑞公司, Premix Ex Taq DNA Polymerase、限制性内切酶购自于 TaKaRa 公司, Trans5 $\alpha$  感受态细胞购自于全式金公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及反转录 选取生长良好的陇油 6 号油菜幼嫩叶片, 按照 Trizol 试剂说明书进行总 RNA 的提取, 提取的 RNA 用 PrimerScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 逆转录试剂盒 (TAKARA 公司) 合成 cDNA。放置于  $-20$  °C 冰箱保存备用。

1.2.2 油菜 *COR* 基因编码区的克隆 根据本实验室已扩增得到的油菜 *COR* 基因 CDS 区设计引物, 上游引物 CORYHBD-U1: 5'-TCCGAATTCATG-GCTATGTCTTTCTC-3' (下划线序列为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物 CORYHBD-D1: 5'-GGCGTC-GACTCATGCCTGTAGTGT-3' (下划线序列为 *Sal* I 酶切位点)。以 cDNA 为模板, 扩增 *COR* 基因 CDS 序列, 扩增产物经纯化后连接到 pTG19-T 载体上, 转化 Trans5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆,

经 PCR 确认后, 送北京六合华大测序。

1.2.3 原核表达载体 pET30a-COR 的构建及转化 利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I, 对测序正确的 pTG19-T-COR 重组载体和表达载体 pET30a 分别进行双酶切。酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达载体。构建好的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 过夜培养, 蓝白斑筛选后挑取白斑提取质粒, 经 PCR 与酶切验证为阳性克隆后, 送北京六合华大测序。测序正确的重组质粒命名为 pET30a-COR。

1.2.4 含有重组表达质粒大肠杆菌的诱导表达 将经过序列分析的含有融合表达质粒 pET30a-COR 的重组菌 30  $\mu$ L 接种至 3 mL 含 1% 葡萄糖的 LB 培养液 (含 50  $\mu$ g/mL Kan) 中, 37 °C 振荡过夜。取过夜培养物 200  $\mu$ L 接种于 20 mL 含 1% 葡萄糖的 LB 培养液 (含 50  $\mu$ g/mL Kan) 中, 剧烈振荡至 OD600 为 0.6~1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 37 °C 诱导表达, 5 h 后收集 2 mL 菌液, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 检测表达产物。用转化空白质粒载体的大肠杆菌 BL21 作为阴性对照。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测 收集的菌液以 12 000 rpm 离心 5 min, 菌体用无菌水吹悬, 12 000 rpm 离心, 弃去上清液, 用 50  $\mu$ L pH 7.4 的 PBS 悬浮, 加入等体积的 2 $\times$  SDS loading-buffer [100 mM Tris.c1 (pH 8.0)、4% SDS、200 mM 巯基乙醇、20% 甘油、0.2% 溴酚兰] 混匀, 水浴煮沸 5 min, 用微量进样器上样 20  $\mu$ L, 打开电源, 浓缩胶中用 60 V 电压, 电泳至溴酚兰进入分离胶, 把电压提高到 100 V, 继续电泳至溴酚兰到达凝胶底部。取下凝胶用蒸馏水冲洗, 用凝胶 5 倍体积的考马斯亮兰染色液 (45 mL 甲醇: 45 mL 水: 10 mL 冰醋酸中溶解 0.25 g 考马斯亮兰) 浸泡凝胶, 放在平缓摇动的平台上室温染色 1 h。用脱色液在脱色摇床上脱色, 其间更换脱色液 3~4 次。待背景完全脱净后, 将凝胶浸入蒸馏水中终止脱色。

## 2 结果与分析

### 2.1 陇油 6 号总 RNA 的提取

通过对实验操作技术的不断改进, 使用 Trizol 试剂从陇油 6 号油菜叶片中提取得到了高质量的总 RNA 产物, 样品的 28S 和 18S rRNA 条带清晰, 无 DNA 和蛋白质污染 (图 1)。

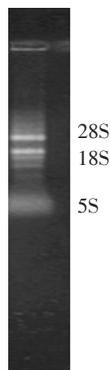


图 1 油菜总 RNA 提取电泳图

### 2.2 油菜 COR 基因 CDS 区的克隆

应用特异引物 CORYHBD-U1 和 CORY-HBD-D1 进行 PCR 扩增, 得到了 1 条 390 bp 大小的单一条带(图2)。测序结果表明, 该序列与已得到的油菜 COR 基因编码区是完全一致的。测序结果如下:

ATGGCTATGTCTTTCTCAGGAGCTGTTCTCAG  
TGGGATTAATTCTTCTTTCCCCAGCGGCGTAGCCA  
AGCAGAGCGGCGTTGGCGCCGTCAGATTTGGCCG  
GAAACTGAGCTCGTTGTCGTCGCTCAGCGCAAG  
AAGTCGTTGATCTACGCCGAGAAAGGTGATGGAA  
ACATTCTCGATGACATCAATGAGGCCACAAAGAG  
AGCTTCAGATTACGTGACAGACAAGACAAAGGAG  
GCGTTGAAAGATGGAGAGAAAGCAAAAAGACTAC  
GTTGATGAGAAAAACGTTGAAGCCAAAGACACTG  
CATTGGATGAAGCTCAGAAAGTTTTGGATTATGTG  
AAGGAAAAAGGAAACGAAGCAGGAGAGGATAAG  
GACACTACAAAGGCATGA

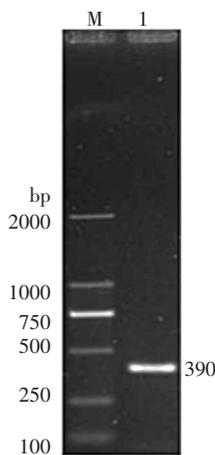


图 2 油菜 COR 基因 PCR 扩增结果电泳图  
(M 为 DNA 分子量标准, 1 为 PCR 扩增产物)

利用 DNASTar 软件, 将油菜 COR 基因与其他植物中克隆得到的响应环境胁迫有关的 COR 基因编码区(CDS序列)输入 MegAlign 软件, 用 Clustal 方法进行序列同源性比对。结果发现: 油菜 COR 与多种植物的 COR 基因有较高的同源性, 与拟南芥 *AtCOR15B*、白菜 *BrCOR15*、芥菜 *CbCOR15a*、油菜 *BnCOR115* 的同源性分别为 74.6%、76.4%、71.1%、86.2%(图3)。因此可以判断, 扩增产物为油菜 COR 基因片段。

		Percent Identity					
		1	2	3	4	5	
Divergence	1	■	74.6	76.4	71.1	86.2	1
	2	31.0	■	85.6	74.3	75.4	2
	3	28.4	16.0	■	81.9	79.9	3
	4	36.5	31.5	20.8	■	71.4	4
	5	15.3	29.9	23.5	36.0	■	5
		1	2	3	4	5	
							COR .seq
							ATCOR15B.seq
							CBCOR15.seq
							CbCOR15a.seq
							BnCOR115.seq

图 3 油菜 COR 基因与其他植物 COR 基因同源性

### 2.3 融合表达载体 pET30a-COR 的构建与 PCR 鉴定

将重组质粒 pTG19-T-COR 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 得到目的基因片段, 与同样双酶切处理的原核表达载体 pET30a 连接, 得到融合表达载体 pET30a-COR。构建好的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21, 过夜培养, 从过夜培养的 LB 培养基中挑选白色菌落, 提取质粒 DNA, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶得到 390 bp 左右的片段(图4), 与预期的片段相符。测序结果表明, 所测序列为油菜 COR 基因 390 bp 的正确阅读框架, 没有移码突变。该重组质粒命名为 pET30a-COR。

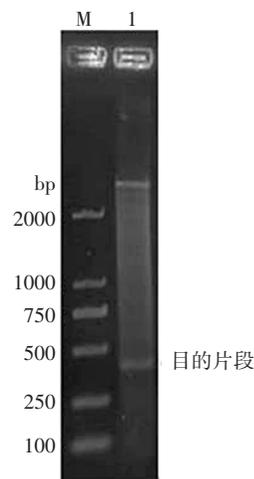


图 4 重组表达质粒 pET30a-COR 酶切分析  
(M 为 DNA 分子量标准, 1 为重组表达质粒的酶切鉴定)

## 2.4 重组表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测

重组质粒 pET30a-COR 经 IPTG 诱导后, 在大肠杆菌 BL21 中进行表达。SDS-PAGE 电泳 (图5) 显示, 存在 1 条融合蛋白诱导表达的条带, 而诱导的转化空载体未出现目的蛋白带。表明重组质粒 pET30a-COR 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达了油菜 COR 蛋白。

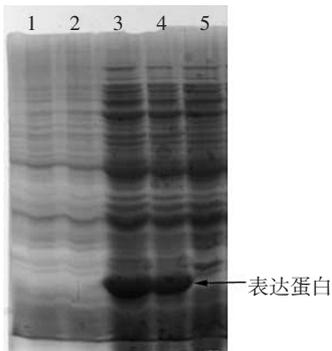


图5 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

(1、2 为阳性对照, 重组表达质粒 pET30a-COR 未诱导; 3、4 为重组表达质粒 pET30a-COR 诱导后; 5 为阴性对照, pET30a 诱导后)

## 3 讨论

1) 冷诱导基因的表达水平与 *CBF* 基因的表达水平有很大的线性关联, *CBF* 基因表达水平越高, 冷诱导基因的表达水平就越强<sup>[10]</sup>。*CBF* 转录激活因子的 AP2 氨基酸序列能够特异性的识别并结合 *COR* 基因启动子中的 CRT/DRE 元件, 调控植物体内相关的基因表达, *COR* 基因在植物受低温诱导下是持续表达的, 而 *CBF* 基因的表达是瞬时产生的, *CBF* 基因的诱导表达可能作为低温反应中信号传递的一个早期的信号放大事件, 其体内叶绿素、可溶性糖、游离脯氨酸的含量都明显高于正常生长下的植株, 说明 *CBF* 基因促进功能蛋白的合成, 激发其调节的下游 *COR* 基因的表达积累<sup>[11]</sup>。

2) 由 ICE1→*CBF*→*COR* 组成的低温响应转录网络在植物低温驯化过程中发挥着重要的作用。油菜中与拟南芥 *AtCOR15* 同源的基因还没有克隆得到, 根据已经克隆得到的植物 *COR15* 基因序列, 从陇油 6 号油菜克隆得到了全长 390 bp 的 *COR* 基因编码区, 测序结果与已获得的油菜 *COR* 基因 CDS 区序列是完全一致的, 同时对该基因在大肠杆菌中进行了表达, 并得到了体外表达产物。下一步将对表达产物进行纯化, 以纯化产物为抗原制备 *COR* 蛋白抗体, 对该基因的功能在蛋白水平做进一步研究。

## 参考文献:

- [1] THOMASHOW M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999, 50: 571-599.
- [2] THOMASHOW M F. Arabidopsis thaliana as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 807-834.
- [3] VISWANATHAN C, ZHU J K. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription[J]. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 2002, 357: 877-886.
- [4] LEE B, HENDERSON D, ZHU J. The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1 [J]. Plant Cell, 2005, 17: 3 155-3 175.
- [5] LIN C, THOMASHOW M F. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold regulated Arabidopsis gene *cor15* and characterization of the *COR 15* polypeptide[J]. Plant Physiology, 1992, 99: 519-525.
- [6] JAGLO OTTOSEN K R, GILMOUR S J, Zarka D G et al. Arabidopsis CBF1 over expression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance [J]. Sci. 1998, 280: 104-106.
- [7] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 1 035-1 040.
- [8] GILMOUR S J, ZARKA D G, STOCKINGER E J, et al. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression[J]. Plant, 1998, 16: 433-442.
- [9] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, et al. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 463-469.
- [10] UEMURA M, STEPONKUS P L. Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves[J]. Plant Physiology, 1989, 91(3): 1 131-1 137.
- [11] KNIGHT H, VEALE E L, WARREN G J, et al. The *sfr6* mutation in Arabidopsis suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif [J]. The Plant Cell Online, 1999, 11 (5): 875-886.

(本文责编: 郑立龙)