

蜡梅 α -半乳糖苷酶基因的克隆和表达分析^①

孙晶晶^{1,2}, 刘亚娟^{1,2}, 秦 琴^{1,2},
眭顺照¹, 李名扬¹

1. 西南大学 园艺园林学院/重庆市花卉工程技术研究中心/南方山地园艺学 教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 重庆能源职业学院, 重庆 400041

摘要: 从蜡梅中克隆 α -半乳糖苷酶基因, 通过对其酶学性质及基因表达分析, 为研究蜡梅的低温适应的分子机理提供参考. 通过 PCR 扩增获得 α -半乳糖苷酶基因(CpGAL), 构建了该基因的原核表达载体 pET28a-CpGAL 并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 诱导表达并分离纯化得到融合蛋白. 利用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 CpGAL 基因在蜡梅不同发育时期的表达差异.

关 键 词: 蜡梅; α -半乳糖苷酶; 克隆; 原核表达; 荧光定量

中图分类号: S685.17

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)01-0025-08

蜡梅(*Chimonanthus praecox*)是蜡梅科(Calycanthaceae)蜡梅属(*Chimonanthus*)落叶丛生灌木, 喜阳光, 能耐阴、耐寒、耐旱、耐修剪、易整形. 蜡梅花在霜雪寒天傲然开放, 浓香扑鼻, 是冬季主要观赏花木. α -半乳糖苷酶能专一地催化 α -半乳糖苷键的水解, 广泛存在于动植物和部分微生物中. 根据其最适的 pH 可分为酸性 α -半乳糖苷酶和碱性 α -半乳糖苷酶. Keller F 等首次从葫芦科植物中发现碱性 α -半乳糖苷酶, 该酶对水苏糖的亲合力高, 催化棉子糖分解的活性低^[1]. Smart 等在黄瓜叶片中分离得到 2 种酸性 α -半乳糖苷酶, 分子量分别为 25KD 和 50KD, 并推测前者是后者的一个亚基^[2]. α -半乳糖苷酶在促进种子萌发和成熟^[3]、叶片的发育和衰败^[4-6]、果实发育和成熟^[7-10]过程中发挥着重要的作用, 同时, α -半乳糖苷酶在生物胁迫和非生物胁迫反应中也起着至关重要的作用^[11-12]. 本研究以蜡梅 α -半乳糖苷酶基因的表达为切入点, 通过克隆该基因、序列分析、原核表达及基因表达分析, 探索该基因的功能, 对研究 α -半乳糖苷酶在蜡梅中的生理作用及低温适应有重要意义.

1 材料与方法

1.1 植物材料

蜡梅花 cDNA 文库由重庆市花卉工程技术研究中心构建保存. 多年生蜡梅花采自西南大学校园内. 蜡梅小苗播种繁殖, 种子 37℃ 水浴 72 h, 浓硫酸处理 0.5 h 后, 播种, 发芽后在人工气候箱中培养(温度: 昼 25℃/夜 20℃, 湿度: 85%, 光周期: 昼 16 h/夜 8 h, 光照度: 20 000 lx).

1.2 菌株、载体及主要试剂

原核表达载体 pET-28a(+), 为重庆市花卉工程技术研究中心保存. 氨苄青霉素(Amp), 宿主菌 BL21(DE3)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态菌株 DH5 α 购自天根生物技术(北京)有限公司, RNA 提取试

① 收稿日期: 2013-11-12

基金项目: 国家自然科学基金(30872063, 31070622); 重庆市教委科技项目基金(KJ060308).

作者简介: 孙晶晶(1985-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事花卉遗传转化研究.

通信作者: 李名扬, 教授, 博士生导师.

剂盒、DNA 提取试剂盒分别为 TIANGEN 公司生产的 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒和 DNAprep pure Plant Kit 试剂盒. 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I、克隆载体 pMD19-T、ExTaq 酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒 PrimeScript™-RT reagent Kit 均购于大连 TaKaRa 公司. SsoFast™EvaGreen® Supermix 试剂盒 (Bio-Rad)、引物由北京六合华大基因有限公司合成. 对硝基-苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)购自 SIG-MA 公司. SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购于上海生物工程有限公司. His-Band 蛋白纯化回收试剂: Ni-TAHis-Bind 树脂(70666)、空色谱柱(69673)、Ni-TA 缓冲液试剂盒(70899-3)均购自德国 Merek 公司.

1.3 目标克隆子的获得及序列分析

参照睦顺照^[13]等的操作, 采用随机克隆测序的方法获取目标基因. 分析蛋白信号肽利用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 生物信息分析采用 DNAMAN 4.0 和 DNASTar 7.0 软件包进行.

1.4 蜡梅总 DNA、RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

采用 DNAprep pure Plant Kit 试剂盒提取蜡梅叶片总 DNA, -20°C 环境下保存. 在同一植株(长势一致、无病虫害)上分别摘取根、茎、叶(子叶、嫩叶). 在同一植株(无病虫害)上分别采集成熟叶片、不同时期花芽(萌动期、蕾期、露瓣期、初开期、盛花期和衰败期)^[14]和处于盛花期花的雄蕊、雌蕊、外瓣、中瓣和内瓣. 选取长势一致、无病虫害, 处于盛花期的蜡梅切花分别用清水(CK)和 6-苄氨基腺嘌呤(10 mg/L 6-BA)处理^[15], 3 组重复. 每组重复处理和对照分别取处于衰败期的花, 用 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒分别提取上述叶片、花芽的总 RNA, 然后以 1 μL 总 RNA 为模板, 按 PrimeScript® RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒的方法合成 cDNA 第一链.

1.5 原核表达载体的构建

根据目的基因序列, 切除信号肽, 设计合成 PCR 扩增引物. 上游引物: 5'-CGGATCCATGGGGTG-GAATAGTTTGAATC-3', 下划线为 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物: 5'-CGAGCTCTCAATCAACT-GAAGAAATTGGTGT-3', 下划线为 *Sac* I 酶切位点. 取 1 μL 蜡梅 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增. PCR 产物的回收按 BioFlux 公司的 Gel Extraction Kit 说明书进行, 连接按 TaKaRa 公司的 pMD 19-T 载体说明书进行, 对重组质粒 PCR 扩增进行检测, 将阳性克隆送生工测序. 连接 *CpGAL* 基因 cDNA 序列的重组质粒记作 pMD19T-*CpGAL*. 提取质粒与表达载体 pET-28a(+)均用 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切, 分别回收目的片段和线性载体并连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, PCR、酶切及测序验证. 筛选阳性克隆, 命名为 pET28a-*CpGAL*.

1.6 pET28a-*CpGAL* 在 BL21(DE3)的表达、分离纯化和复性

将重组质粒 pET28a-*CpGAL* 转化表达菌株 BL21(DE3), 接种于含有 50 mg/mL 液体培养基(Kan+LB)中培养 12 h, 然后按 1:50 的比例扩大培养, 至 OD $\approx$ 0.8 时, 吸取 1.0 mL 菌液作为未诱导对照, 空载转化菌加入 IPTG(终浓度 1.0 mmol/L)诱导为阳性对照, 以未加 IPTG 诱导的空载体转化菌为阴性对照. 在剩余菌液中加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h 进行诱导表达, 吸取 1.0 mL 诱导培养物样品. 将所有收集的菌液 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液. 用 pH 7.4 的 PBS 液 3 mL 悬浮沉淀菌, 加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 水浴煮沸 10 min, 然后 10 000 r/min 离心 2 min, 取上清液作为蛋白样品上样.

按默克公司的蛋白纯化系统操作指南进行分离纯化. 过柱后的溶液在一定尿素梯度(6 mol/L—5 mol/L—4 mol/L—3 mol/L—2 mol/L—1.5 mol/L—1 mol/L—0.5 mol/L—0 mol/L—清水)下从高到低于 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温透析, 每 6 h 更换一次透析缓冲液, 最后在清水中透析 12 h.

1.7 蛋白质含量的测定和蜡梅 α -半乳糖苷酶酶学性质分析

利用 Bradford 法测定复性后蛋白质含量^[16]. 将 25 μL 的 30 mmol/L pNPG 与 100 μL pH 分别为 2.0~9.0 (1.0 的梯度)的 McIlvaine 缓冲液(30 mmol/L pNPG+100 mmol/L 柠檬酸+200 mmol/L 磷酸氢二钠)混合, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min 后, 加入 100 μL 的酶液混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min, 立即加入 600 μL 5%的 Na_2CO_3 溶液终止反应. 在上述标准反应体系中(pH 6.0), 于 20~50 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C}$ 的梯度)分别测定酶活力^[17].

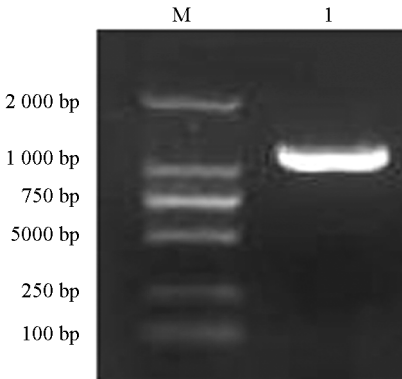
1.8 蜡梅 α -半乳糖苷酶基因表达特性分析

使用 SYBR Green I 荧光染料法, 对 *CpGAL* 基因在蜡梅不同组织(根、叶、花芽)、不同花期(萌动期、

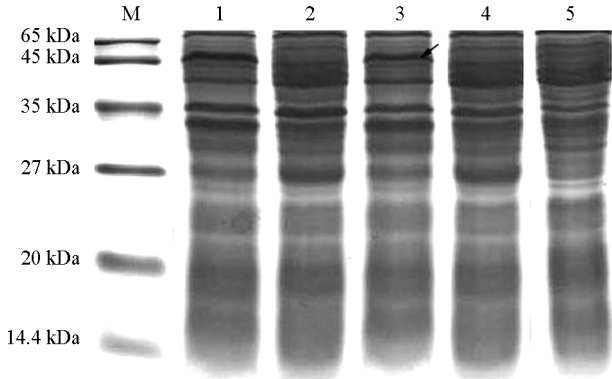
图2 *CpGAL* 同源序列比对分析

2.2 原核表达载体的构建、表达以及 SDS-PAGE 分析

将经 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切的 *CpGAL* 基因片段亚克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 的相应位点上, 构建原核表达载体 pET28a-*CpGAL*(图 3). 经过 IPTG 诱导及超声裂解, 用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析, 结果表明, 在约为 46 kD 处有一条明显的电泳带, 与预期的分子质量大小相符, 但破碎上清中并没有出现特异条带, 破碎沉淀中则有特异条带, 说明该融合蛋白是包涵体(图 4).



M: DL2000 marker; 1: 菌液 PCR 检测.
图 3 PCR 扩增 *CpGAL* 电泳验证



M: 蛋白质标准分子质量; 1: pET28a-*CpGAL* 诱导总蛋白; 2: pET28a-*CpGAL* 未诱导总蛋白; 3: pET28a-*CpGAL* 诱导沉淀; D: pET28a-*CpGAL* 诱导上清; 5: pET28a 诱导总蛋白载体诱导.

图 4 pET28a-*CpGAL* 表达产物的 SDS-PAGE

2.3 重组蛋白的分离纯化、复性及酶活检测

重组蛋白以包涵体的形式存在, 通过复性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 5)与预期结果一致, 表明提取高浓度(0.523 mg/mL)的重组蜡梅 α -半乳糖苷酶.

纯化的重组蜡梅 α -半乳糖苷酶在 pH6.0 值缓冲液体系中, 于 20~50 $^{\circ}\text{C}$ 分别测定酶活力, 结果如图 6 所示, 该酶的最适反应温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 在 35~45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活力相对较高, 大于 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶的活性都会急剧下降. 在不同 pH 值缓冲液体系中测定其酶活性结果如图 7 所示, 酶的最适反应 pH 值为 6.0.

2.4 *CpGAL* 基因表达特性的分析

2.4.1 *CpGAL* 基因组织特异性表达的分析

CpGAL 基因在蜡梅不同组织中均有表达, 具有较强的组织特异性(图 8). 其转录产物在根中最多, 茎、子叶、幼叶、成熟叶、盛开的全花中明显少于根. *CpGAL* 基因在蜡梅叶片不同时期的表达具有特异性, 其中成熟叶片中的表达量最高.

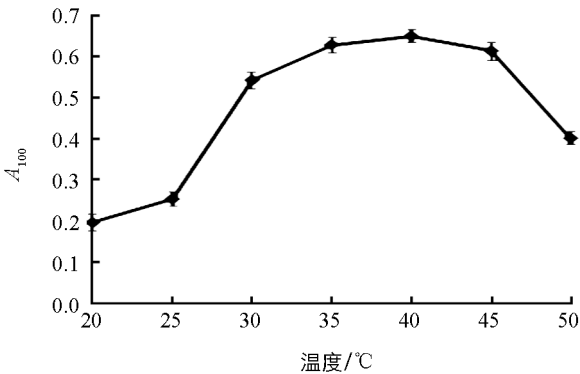
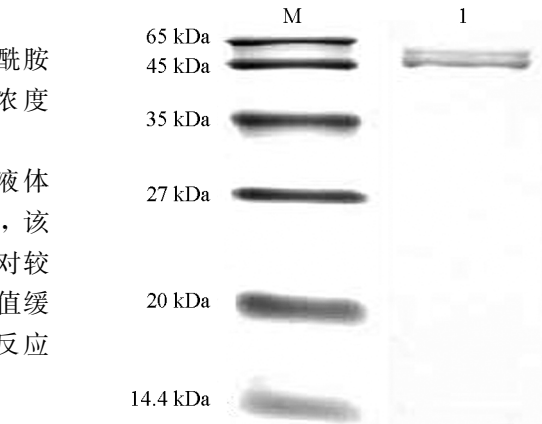


图 6 温度对 *CpGAL* 活性的影响



M: 蛋白质标准分子质量; 1: pET28a-*CpGAL* 重组蛋白.
图 5 纯化的 pET28a-*CpGAL* 蛋白 SDS-PAGE 分析

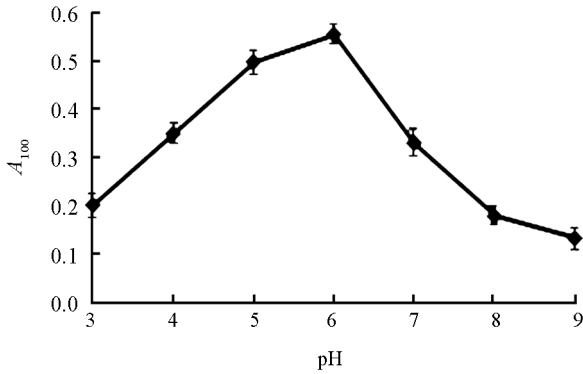


图 7 pH 对 *CpGAL* 活性的影响

2.4.2 *CpGAL* 基因在花发育不同时期表达

CpGAL 基因在蜡梅单花开放过程中表达量有较大差异. 其转录水平从花芽萌动期到蕾期下降, 盛花期达到最低, 露瓣期到花朵初开期上升, 盛花期快速下降, 衰败期大幅度上升达到峰值(图 9).

CpGAL 基因在蜡梅花中表达量较高, 但在蜡梅不同花器官中差异显著, 外瓣、内瓣和雌蕊中转录水平极低, 中瓣明显高于雄蕊(图 10).

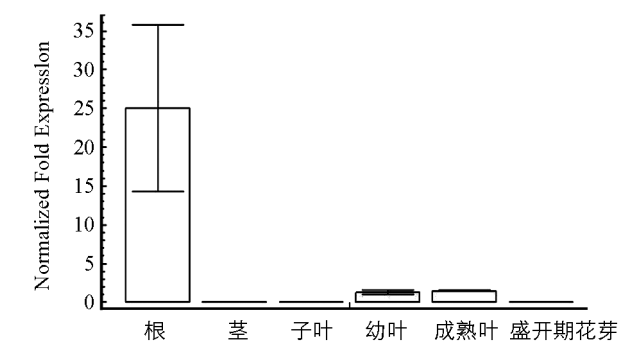


图 8 *CpGAL* 在不同组织中的表达

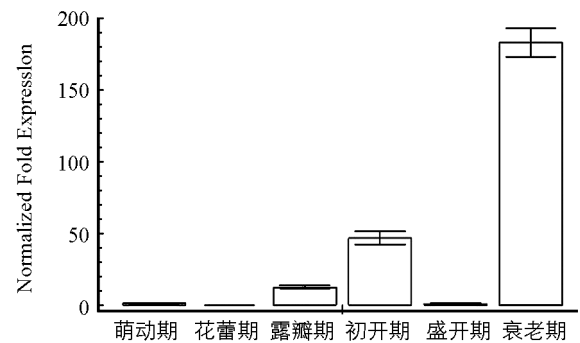


图 9 *CpGAL* 在不同花期的表达分析

2.4.3 *CpGAL* 基因对 6-苄氨基腺嘌呤诱导的响应

用 10 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)处理处于盛开期的瓶插蜡梅切花, 结果显示其衰败时间推迟了 5 d 左右(表 1). 雄蕊衰败程度相同, 用 6-BA 处理的瓶插蜡梅切花的花瓣明显比对照更具观赏价值(图 11). 检测发现, 6-BA 处理的蜡梅切花 *CpGAL* 基因转录水平明显低于对照, 表明 6-BA 抑制了 *CpGAL* 基因的表达(图 12). 综上, 推测 *CpGAL* 基因具有促进蜡梅切花衰败的作用, 6-BA 具有抑制 *CpGAL* 基因表达的作用.

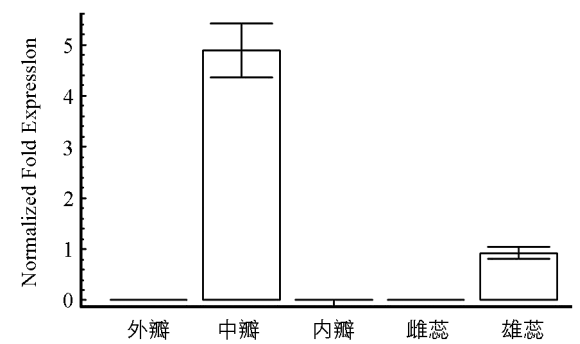


图 10 *CpGAL* 在不同花器官中表达

表 1 6-BA 对蜡梅切花衰败时间的影响

重复	CK 衰败时间/d	6-BA 处理衰败时间/d	6-BA 推迟衰败时间/d
1	5	10	5
2	5	9	4
3	6	12	6



a. 清水处理蜡梅的盛花期 b. 清水处理蜡梅的衰败期 c. 6-BA处理蜡梅的盛花期 d. 6-BA处理蜡梅的衰败期

图 11 6-BA 对蜡梅切花的外观影响

3 讨 论

本研究成功克隆了蜡梅 α -半乳糖苷酶基因 *CpGAL*, 构建了蜡梅 *CpGAL* 基因原核表达载体 pET28a-*CpGAL*, 经诱导表达获得的重组蛋白为包涵体蛋白. 通过对包涵体的分离、纯化、变性、复性, 获得具有生物活性的重组 α -半乳糖苷酶, 最适反应温度为 40 °C, 表现出一定的抗高温能力, 为进一步活体纯化获得高活力、pH 值稳定及热稳定的 α -半乳糖苷酶提供了理论基础.

近年来, α -半乳糖苷酶表达调节和生理功能日益成为植物学研究的新热点. 本试验对 α -半乳糖苷酶基因在不同组织转录水平进行分析, 发现 *CpGAL* 基因在蜡梅不同组织中均有表达. 其在根中表达量最高, 推测该基因与根的吸收功能有关. 植物在受到低温、干旱、高盐等渗透胁迫时, α -半乳糖苷酶调节胞内渗透压, 有利于吸收水和无机盐, 抵御不良影响.

Del Rio 等研究发现叶片衰败期棉子糖家族寡糖增加是叶片衰败过程中一个重要的特征^[19]. Lee 等研究水稻 α -半乳糖苷酶发现, 其在水稻叶片叶绿体中表达, 并且在叶片衰老过程中, 可以降解叶绿体中半乳糖脂^[6]. Pharr、Gaudreault 等研究葫芦科碱性 α -半乳糖苷酶时, 发现黄瓜中碱性 α -半乳糖苷酶的含量与叶片生长发育有关, 在降解幼叶中的水苏糖过程中起着主要的作用^[20-21]. 本文在研究蜡梅不同时期叶片转录水平时发现该基因表达具有组织特异性, 转基因烟草生长速度明显加快, 叶片生长肥大, 说明酸性 α -半乳糖苷酶也与叶片生长发育有关^[22], 但是酸性 α -半乳糖苷酶如何影响叶片生长发育需要进一步研究.

CpGAL 基因在蜡梅单花开放过程中表达量有较大差异. 其转录水平从花芽萌动期到蕾期下降, 盛花期达到最低, 露瓣期到花朵初开期上升, 盛花期快速下降, 衰败期大幅度上升达到峰值. 秋末冬初气温开始下降, 蜡梅花芽处于萌动期, *CpGAL* 的表达量升高, 其目的在于启动相关调控网络来防御低温, 增强花器官的抗寒性. 露瓣期和初开期, *CpGAL* 基因表达水平随着花朵储存棉子糖家族寡糖及其它营养物质而增加. 进入盛花期, 消耗大量各类营养物质, 棉子糖家族寡糖也被分解, α -半乳糖苷酶积累水平下降. 在衰败期 *CpGAL* 基因转录产物达到最大. Karkaurt 等研究外源乙烯对西瓜催熟的影响时发现, 外源乙烯可以提高西瓜体内 α -半乳糖苷酶活性, 进而促进西瓜成熟^[9]. 而植物体内的乙烯是否也可提高 α -半乳糖苷酶活性进而促进花的衰败, 有待进一步研究.

6-BA 处理蜡梅切花后, 发现 *CpGAL* 基因转录水平明显降低, 花期有所延长, 提高了切花观赏价值.

4 结 论

从蜡梅 cDNA 文库随机挑选单克隆子双向测序得到蜡梅 α -半乳糖苷酶基因, 该序列包含一个 1 239 bp 的最大 ORF. *CpGAL* 编码的蛋白大小为 46 kD. 该蛋白具有酶学特性, 最适 pH 值为 6.0, 最适反应温度为 40 °C, 是一种酸性 α -半乳糖苷酶.

α -半乳糖苷酶参与了蜡梅的生长发育过程. 从转录水平分析, *CpGAL* 的表达具有组织特异性, 与单花开放衰败相关.

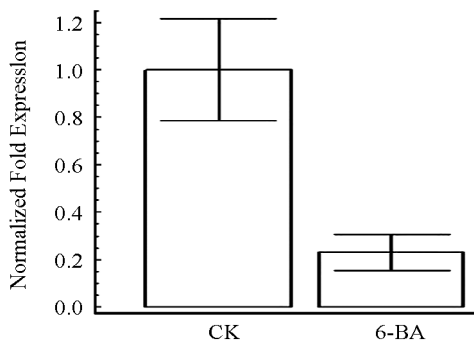


图 12 *CpGAL* 在 6-BA 处理下的表达

参考文献:

- [1] KELLER F, PHARR D M. Metabolism of Carbohydrates in Sinks and Sources; Galactosyl-Sucrose Oligosaccharides [M]. In: Photoassimilate Distribution in Plants Andcrops (Zamski E and Schaffer, AA), New York: Marcel Dekker, 1996: 115—184.
- [2] SMART E L, PHARR D M. Characterization of α -Galactosidase from Cucumber Leaves [J]. Plant Physiol, 1980(66): 731—734.
- [3] THOMAS P, ANDREAS R. Biochemistry and Physiology of Raffinose Family Oligosaccharides and Galactosyl Cyclitols in Seeds [J]. Seed Sci Res, 2001, 11(3): 185—197.
- [4] CHROST B, KRUPINSKA K. Genes with Homologies to Known Alpha-Galactosidases Are Expressed During Senescence of Barley Leaves [J]. Physiol Plantarum, 2000, 110(1): 111—119.
- [5] CHROST B, DANIEL A, KRUPINSKA K. Regulation of α -Galactosidase Gene Expression in Primary Foliage Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.) During Dark-Induced Senescence [J]. Planta, 2004, 218(5): 886—889.
- [6] LEE R H, LIN M C, CHEN S C. A Novel Alkaline Alpha-Galactosidase Gene is Involved in Rice Leaf Senescence [J]. Plant Mol Biol, 2004, 55(2): 281—295.
- [7] MARRACCINI P, ROGERS W J, CAILLET V, et al. Biochemical and Molecular Characterization of Alpha-D-Galactosidase from Coffee Beans [J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43(10—11): 909—920.
- [8] SOH C P, ALI Z M, LAZAN H. Characterisation of an Alpha-Galactosidase with Potential Relevance to Ripening Related Texture Changes [J]. Phytochemistry, 2006, 67(3): 242—254.
- [9] KARAKURT Y, HUBER D J. Cell Wall-Degrading Enzymes and Pectin Solubility and Depolymerization in Immature and Ripe Watermelon (*Citrullus lanatus*) Fruit in Response to Exogenous Ethylene [J]. Physiol Plantarum, 2002, 116(3): 398—405.
- [10] JAGADEESH B H, PRABHA T N, SRINIVASAN K. Activities of Glycosidases During Fruit Development and Ripening of Tomato (*Lycopersicum esculantum* L.): Implication in Fruit Ripening [J]. Plant Sci, 2004, 166(6): 1451—1459.
- [11] PENNYCOOKE J C, JONES M L, STUSHNOFF C. Down-Regulating Alpha-Galactosidase Enhances Freezing Tolerance in Transgenic Petunia [J]. Plant Physiol, 2003, 133(2): 901—909.
- [12] EVERS D, GHISLAIN M, HOFFMANN L, et al. A Late Blight Resistant Potato Plant Over Expresses a Gene Coding for Alpha-Galactosidase Upon Infection by Phytophthora Infestans [J]. Biol Plantarum, 2006, 50(2): 265—271.
- [13] 睦顺照, 李琳莉, 祝钦洸, 等. 蜡梅凝集素基因克隆及其对蚜虫、蛱蛄抗性分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 358—368.
- [14] 睦顺照. 蜡梅开花过程基因表达的 ESTs 分析与凝集素基因功能的初步鉴定 [D]. 重庆: 西南大学园艺园林学院, 2006.
- [15] 何 婧, 李 刚, 夏 磊, 等. 不同预处理液对蜡梅切花保鲜效果的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2010, S2: 30—36.
- [16] BRADFORD M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Anal Biochem, 1976(72): 248—254.
- [17] 李苏红, 朱旻鹏, 李拖平. 重组水稻 α -半乳糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(21): 304—307.
- [18] LIVA K K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expressiondata Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402—408.
- [19] DEL RIO L A, PASTORI G M, PALMA J M, et al. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence [J]. Plant Physiol, 1998, 116(4): 1195—1200.
- [20] PHARR D M, SOX H N. Changes in Carbohydrate and Enzyme Levels During the Sink to Source Transition of Leaves of

Cucumis sativus L., a Stachyose Translocator [J]. Plant Science Letters, 1984, 35(3): 187—193.

[21] GAUDREAULT P R, WEBB J A. Alkaline α -Galactosidase Activity and Galactose Metabolism in the Family Cucurbitaceae [J]. Plant Science, 1986, 45(2): 71—75.

[22] 孙晶晶. 蜡梅 α -半乳糖苷酶基因功能的初步鉴定 [D]. 重庆: 西南大学园艺园林学院, 2009.

Cloning and Transcriptional Expression Analysis of α -Galactosidase Gene from *Chimonanthus praecox*

SUN Jing-jing^{1,2}, LIU Ya-juan^{1,2}, QIN Qin^{1,2},
SUI Shun-zhao¹, LI Ming-yang¹

1. School of Horticulture and Landscape, Southwest University/Chongqing Engineering Research Center for Floriculture/
Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;
2. Chongqing Energy College, Chongqing 400041, China

Abstract: The objective of the study was to clone the α -galactosidase gene from *Chimonanthus praecox* and express it in the prokaryotic system and analyze the transcriptional expression of α -galactosidase. The experiment provides a reference for the research of the molecular mechanism of low temperature adaptation of *C. praecox*. The gene expression vector pET28a-*CpGAL* was constructed by the gene fragment cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a(+), which was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Then, fusion protein was induced to express and purified. The SYBR Green I Real-time qRT-PCR was employed to analyze the expression differences of *CpGAL* in different developmental stages of *C. praecox*.

Key words: *Chimonanthus praecox*; α -galactosidase; cloning; prokaryotic expression; real-time fluorescence quantitative PCR

责任编辑 欧 宾

