

大豆 *GmPM13* 基因的克隆及原核表达

王 羽,李红丽,王俊皓,李海燕,崔喜艳

(吉林农业大学 生命科学学院,吉林 长春 130118)

摘 要:通过对大豆(*Glycine max*)油体钙蛋白(caleosin)基因 *GmPM13* 的克隆及原核表达,为今后利用基因工程方法检测转 *GmPM13* 基因提供抗体。运用 RT-PCR 技术克隆得到大豆油体钙蛋白 *GmPM13* 基因,构建原核表达载体,命名为 pET-28a-pm13。并转化到 Ecdi 和 Rosetta 中,经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后,SDS-PAGE 分析 GmPM13 蛋白的表达情况。大豆 *GmPM13* 基因全长 cDNA 序列为 738 bp,包括一个 720 bp 的开放阅读框,编码 239 个氨基酸,油体钙蛋白的分子量为 27.1 kDa,诱导表达产物的大小与预计蛋白大小相符。在 28℃,1.5 mol·L⁻¹ IPTG 浓度下,诱导 12 h 蛋白的表达量最高,占总蛋白的 39.25%。

关键词:大豆; *GmPM13* 基因; 基因克隆; 原核表达

中图分类号:S565.1;Q785 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2018.02.0185

Cloning and Prokaryotic Expression of *GmPM13* Gene from *Glycine max*

WANG Yu,LI Hong-li,WANG Jun-hao,LI Hai-yan,CUI Xi-yan

(School of Life Science,Jilin Agricultural University,Changchun 130118,China)

Abstract: Through the cloning and prokaryotic expression of caleosin gene *GmPM13* in soybean could provid the antibody for the detection of *GmPM13* gene by genetic engineering in the future. *GmPM13* gene of soybean caleosin was cloned by RT-PCR technology, and the prokaryotic expression vector was constructed which was named *GmPM13*. It was transformed into *E. coli* Rosetta with IPTG induction, the expression of GmPM13 protein was analyzed by SDS-PAGE. The full-length cDNA sequence of *GmPM13* gene was 738 bp with a 720 bp ORF(open reading frame), encoding 239 amino acids. The molecular mass of the protein was 27.1 kDa, and the size of the induced product was consistent with the expected protein size. The induced protein content reached the highest level at 28℃, 1.5 mol·L⁻¹ IPTG concentration, after induced 12 h, accounting for 39.25% in the total bacterial proteins.

Keywords: *Glycine max*; *GmPM13* gene; Gene cloning; Prokaryotic expression

大豆是世界上重要的油料作物之一,含有丰富的油脂和蛋白质,是工业上重要的功能性原料^[1]。在大豆中有一类亚细胞器—油体,它是大豆储存脂类物质的场所。因其含有许多对人体有益的脂溶性生物活性物质、多不饱和脂肪酸及特殊的结构和功能性组分,使得大豆油体在食品、医疗美容方面有着广泛的应用^[2]。这也是大豆能成为世界上最重要的油料作物的主要原因。

大豆油体的直径为 0.2~0.5 μm,内部是液体的三酰甘油酯,外面包裹着由磷脂和蛋白组成的半单位膜。其中磷脂层表面镶嵌着许多特殊的小分子碱性蛋白质,称为大豆油体结合蛋白(oil body banding protein, OBBP),这些结合蛋白包括油体膜

蛋白(oleosin)、油体钙蛋白(caleosin)和固醇蛋白(steroleosin),目前,国内外对于大豆 oleosin 基因研究较多,分为 3 个区域,即含有 50~70 个氨基酸残基两亲性的 N-末端、70 个氨基酸残基左右的中央疏水区 and 长度可变两亲性 C-末端^[3-4]。caleosin 只在拟南芥^[5-7]、芝麻^[8-9]、小麦^[10-11]、油菜^[12-13]、水稻^[4]等中被发现,推测其功能是在种子发芽过程中为种子提供能量和稳定油体构象,并且参与膜融合和脂肪体融合等过程^[14],此外丁勇等^[15]从甘蓝型油菜中克隆了编码 28.1 kD 油体钙蛋白(caleosin)的基因 *BnClol*,发现油菜中 caleosin 蛋白是由多基因家族编码,并推测 caleosin 蛋白与单层磷脂层和油体锚定结合、对增加种子油体的稳定性起着重要

收稿日期:2017-10-19
基金项目:国家自然科学基金(31171459);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目基金(JJKH20170307KJ);吉林省自然科学基金(20180101026JC)。
第一作者简介:王羽(1993-),女,硕士,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:448659230@qq.com。
通讯作者:崔喜艳(1971-),女,博士,教授,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:cuixiyan2005@163.com。

的作用。魏征等^[16]研究了水稻中该油体钙蛋白基因家族的概貌,推测可能在水稻抗干旱胁迫的过程中起作用的基因,但是 caleosin 在大豆中具体的功能尚未清晰。所以本试验通过克隆大豆基因中油体钙蛋白 *GmPM13* 基因,构建原核表达系统,以期后续制备大豆 caleosin 抗体蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料为吉育 72 大豆种子,由吉林省农业科学院大豆研究中心提供。

1.1.2 菌种和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta 及原核表达载体 pET-28a 为吉林农业大学生命科学学院作物营养与调控研究室保存。

1.1.3 试剂和酶 pMD18-T、*Ex-Taq* 酶、 T_4 DNA 连接酶、DNA 相对分子质量标准、低分子量标准蛋白及限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 均购于大连宝生物工程有限公司, IPTG 购于 Promega 公司,凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 AxyGEN 公司产品, Trizol 为 TaKaRa 公司产品,反转录试剂盒为 Gene-Copoeia 公司产品。

1.1.4 引物设计 根据 NCBI GenBank 中已经发表的 *Glycine max* Ca^{2+} -binding EF hand protein (*GmPM13* 基因) (GenBank: AF004809.1) mRNA 全长序列,应用软件 Primer 5.0 在基因的非编码区设计一对上下游引物 S1 和 A1 (S1: 5'-GAGAGTGAGTAATCGAG-AAAG-3' 和 A1: 5'-ATCAATCCCAGACCACGAGTT-3'), 扩增出目的片段后,重新设计 5'端带酶切位点和保护碱基的上下游引物 S2'和 A2' (S2: 5'-CCG-GAATTCATGGCTGCAGAGATGGAGAGG-3'; A2: 5'-CCCAAGCTTTCAACTCATCTTGGCATCACT-3') 上游引物酶切位点为 *EcoR* I、下游引物酶切位点 *Hind* III,斜体部分为保护碱基、下划线部分为酶切位点。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 大豆总 RNA 的提取 称取干燥的大豆种子 1 g,置于液氮中,迅速研磨成粉末状,放入 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,加入 1 mL Trizol 充分混匀,静置后加 200 μ L 氯仿离心,取上层水相,静置后加入 500 μ L 异丙醇,离心后弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,离心后弃上清,干燥沉淀后用 DEPC 溶解沉淀,获得大豆种子总 RNA, -80℃ 保存总 RNA^[17-19]。

1.2.2 大豆 cDNA 的合成 取 2.5 μ L 大豆种子总

RNA,加入 Random Primer、Oligo (dT) 各 1 μ L,用 ddH₂O 补足至 13 μ L,60℃ 10 min,冰浴 5 min;在上述产物中加入 5 μ L Reaction Buffer, d NTP、RNase Inhibitor、M-MLVRTase 各 1 μ L,用 ddH₂O 补足至 25 μ L,42℃ 60 min,85℃ 5 min,得到大豆 cDNA 在 -20℃ 冰柜中保存,用于后续 PCR 扩增试验^[20]。

1.2.3 大豆 *GmPM13* 基因的克隆 以反转录得到的 cDNA 为模板,用 *Ex-Taq* 酶对 *GmPM13* 基因进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ L,反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,45℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。用 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,利用凝胶回收试剂盒回收目的片段,并与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,随机挑取单克隆进行 PCR 和双酶切鉴定,送至上海生工生物工程股份有限公司测序。测序成功后重新设计上、下游引物 S2 和 A2 进行扩增,引物分别带 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,扩增产物与 pMD18-T 载体连接,用于原核表达载体的构建。测序成功的阳性菌株命名为 pMD18T-*pm13*。

1.2.4 原核表达载体 pET-28a-*pm13* 的构建 分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pMD18T-*pm13* 质粒和原核表达载体 pET-28a,凝胶回收得到目的片段和载体大片段, T_4 连接酶 16℃ 连接过夜,转化 *E. coli* Rosetta 感受态细胞,在含有 Kan 抗性的 LB 固体培养基上挑取重组质粒,进行 PCR 和双酶切验证,送至上海生工生物工程股份有限公司测序^[21]。将重组的表达载体命名为 pET-28a-*pm13*。

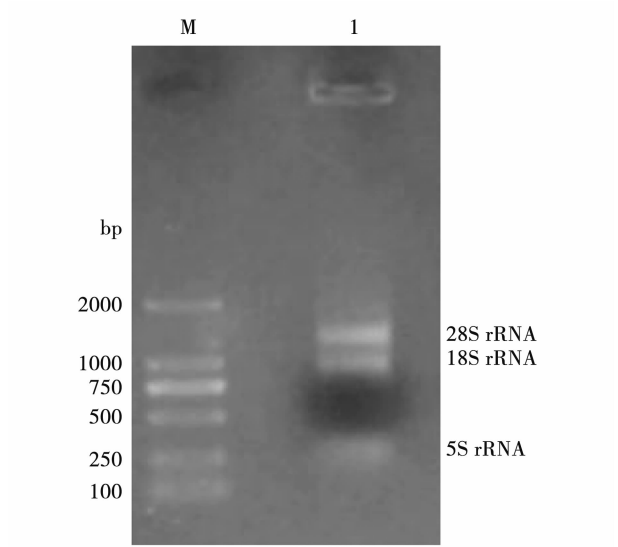
1.2.5 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳 将含有重组质粒 pET-28a-*pm13* 的大肠杆菌 Rosetta 单菌落接种于 5 mL 含有 Kan 的 LB 液体培养基中,180 $r \cdot min^{-1}$,37℃ 振荡培养过夜,次日以 1:100 的比例将菌液接种到含有抗生素 LB 液体培养基中,每隔 1 h 取菌液在波长 600 nm 测 OD 值,当 OD 值达到 0.8 时停止振荡;将菌液分装到 4 个三角瓶中,加入 IPTG 使其终浓度为 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$,分别用 16,20,28,37℃ 进行诱导,确定最适合的诱导温度,并在此温度下确定诱导最适的 IPTG 浓度和时间。将菌液分装到三角瓶中,加入 IPTG 使其终浓度分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 $mmol \cdot L^{-1}$,每隔 2 h 取样一次直至 16 h 停止取样,同时以 pET-28a 的大肠杆菌为阴性对照,未诱导重组质粒为阳性对照;将收集的菌体 4℃、12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,将沉淀重悬于 100 μ L PBS 和 100

μL 上样缓冲液,沸水浴 5 min,准备上样^[22]。

2 结果与分析

2.1 大豆种子总 RNA 的提取

用 NANO DROP 2000 测定大豆种子总 RNA 的浓度和 OD 值,浓度为 $2\,978.5\,\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 2.06。用 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳进行测定,可见 3 条清晰的带(如图 1),证明 RNA 完整性较好,纯度较高,可用于反转录及 PCR 扩增等后续试验。



M:DL2000 Marker; 1: 总 RNA。
M:DL2000 Marker; 1: Total RNA.

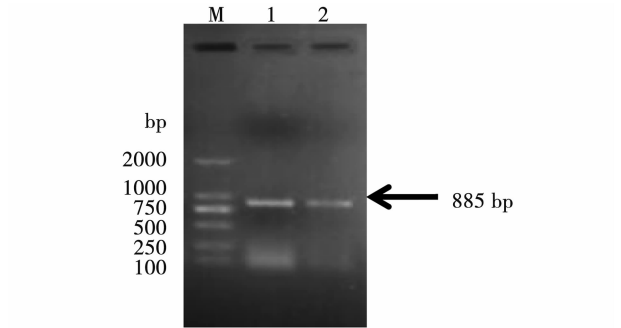
图 1 电泳检测大豆种子总 RNA

Fig. 1 Determination of total RNA in soybean seeds by electrophoresis

2.2 大豆 *GmPM13* 基因的克隆与分析

2.2.1 大豆 *GmPM13* 基因的克隆 将总 RNA 反转录得到 cDNA,并以此为模板对大豆 *GmPM13* 基因进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳获得一条 885 bp 的 DNA 条带(图 2),将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 载体连接,转化后提取质粒,并进行 PCR 和双酶切验证(图 3)。验证成功后送至上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果表明成功克隆 *GmPM13* 基因(图 4)。

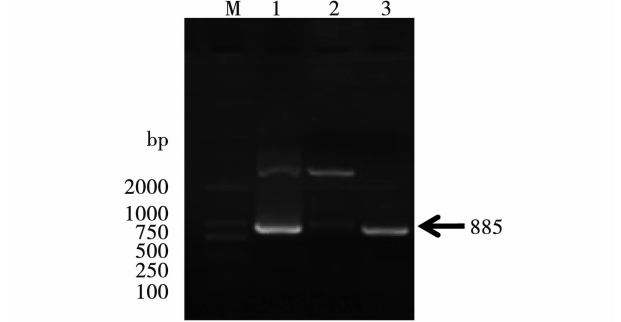
2.2.2 大豆 *GmPM13* 基因的生物信息学分析 用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)对大豆 *GmPM13* 基因进行序列分析,结果可知:*GmPM13* 基因编码的氨基酸序列氨基酸数是 738 个,相对分子质量为 60 907.59,理论等电点是 5.15,它编码的氨基酸主要是丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和苏氨酸 4 种氨基酸。根据 SignalP4.1 server 对预测的氨基酸序列进行分析,验证其是否具有信号肽及其位置,经分析得知,mean S-score = 0.45 ,表示没有信号肽。



M:DL2000 Marker;1 和 2:均为 PCR 产物。
M:DL2000 Marker;1 和 2:PCR products.

图 2 PCR 扩增 *GmPM13* 基因

Fig. 2 PCR amplification of *GmPM13* gene



M:DL2000 Marker;1:质粒;2:双酶切产物;3:质粒 PCR。
M:DL2000 Marker;1:Plasmid;2:Enzyme digested production;
3:Plasmid PCR.

图 3 双酶切及 PCR 鉴定 pMD18-T-*GmPM13* 重组质粒

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*GmPM13* by double enzyme digestion and PCR

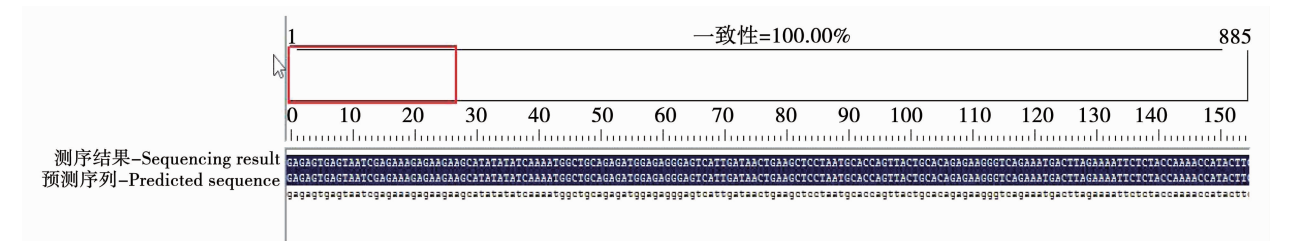


图 4 序列比对结果

Fig. 4 The results of sequence alignment

通过 phytozome 网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 分析该基因位置,并检测是否有同源基因,结果表明 *GmPM13* 基因分布在第 10 号染色体上,没有同源基因。

使用 DNAMAN 软件对克隆所得到的大豆

GmPM13 基因与 NCBI 数据库中的 6 种植物的 17 种油体钙蛋白基因进行同源性比对,开放阅读框内核苷酸相似性最高的为芝麻 (*Brassica napus*) caleosin 基因,相似度为 68% (图 5)。

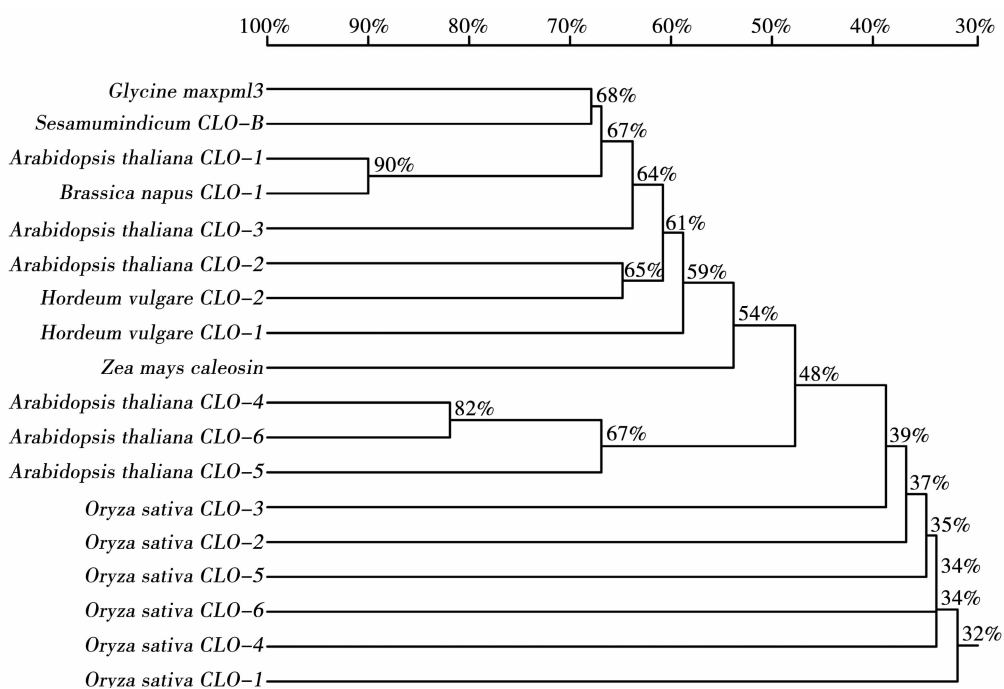


图 5 测序结果与不同植物 *caleosin* 基因编码框同源进化分析

Fig. 5 Sequencing results and homologous phylogenetic tree of *caleosin* gene in different plants

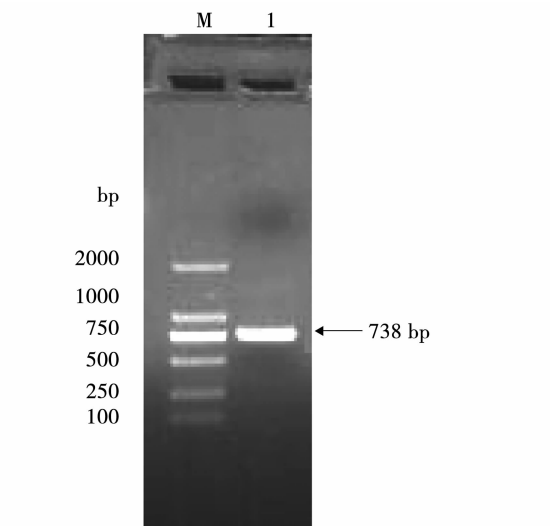
2.3 原核表达载体的构建

设计带有酶切位点的引物,重新进行 PCR 扩增,获得一条 735 bp 的 DNA 条带(图 6),将 DNA 片段回收。将回收的目的基因 *GmPM13* 和载体 pET-28a 分别进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,回收目的片段后两者 16℃ 连接过夜,利用热激转化法(42℃)转化 *E. coli* Rosetta 感受态细胞,Kan 抗性筛选后挑取单菌落进行 PCR(图 7)和双酶切验证(图 8)。结果表明表达载体 pET-28a-*pm13* 构建成功,重组质粒用于融合蛋白的诱导表达。

2.4 融合蛋白 SDS-PAGE 电泳检测

将处理好的样品沸水浴 5 min,用 15% 的分离胶 SDS-PAGE 进行电泳检测。在固定的 IPTG 浓度和时间下进行诱导表达,28℃ 时表达量是最高的,相对百分含量高达 24.73% (图 9)。在 28℃ 时随着诱导时间的增加,*GmPM13* 基因的表达水平增加,在诱导 12 h 的时候,表达量是最高的,蛋白相对百分含量高达 28.85% (图 10);用不同 IPTG 浓度诱导,*GmPM13* 基因的表达水平增加,当诱导剂浓度为

1.5 mmol·L⁻¹ 诱导 12 h 时,蛋白的表达水平是最高的,蛋白相对百分含量高达 39.25% (图 11)。

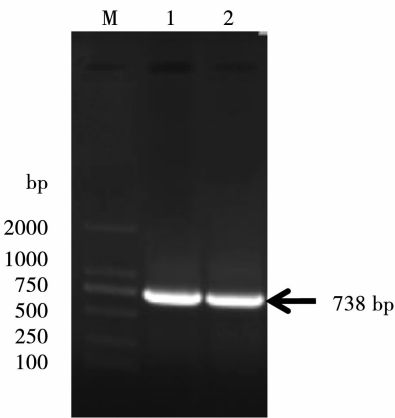


M:DL2000 Marker;1:PCR 产物。

M:DL2000 Marker;1:PCR products.

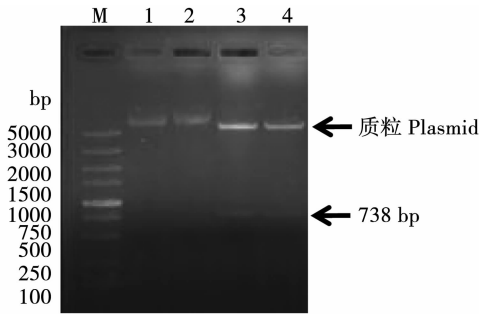
图 6 *GmPM13* 基因 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of *GmPM13* gene by PCR



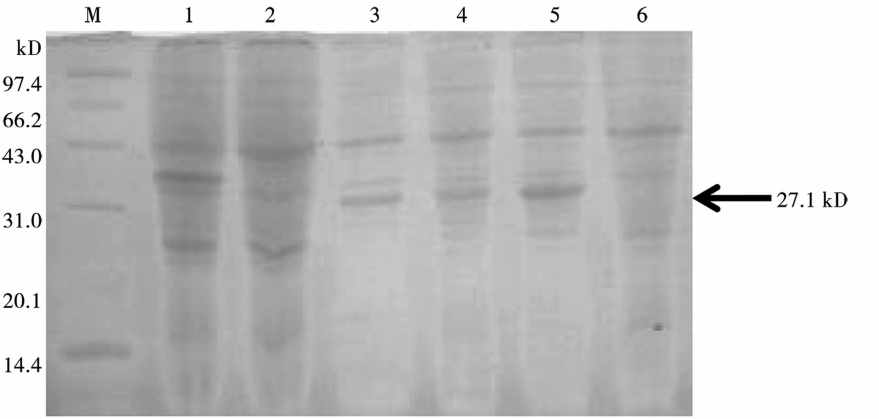
M;DL2000 Marker;1 和 2:重组质粒。
M;DL2000 Marker;1 和 2:PCR recombinant plasmid.

图 7 pMD18-T-*GmPM13* 重组质粒 PCR 鉴定
Fig. 7 pMD18-T-*GmPM13* recombinant plasmid was identified by PCR



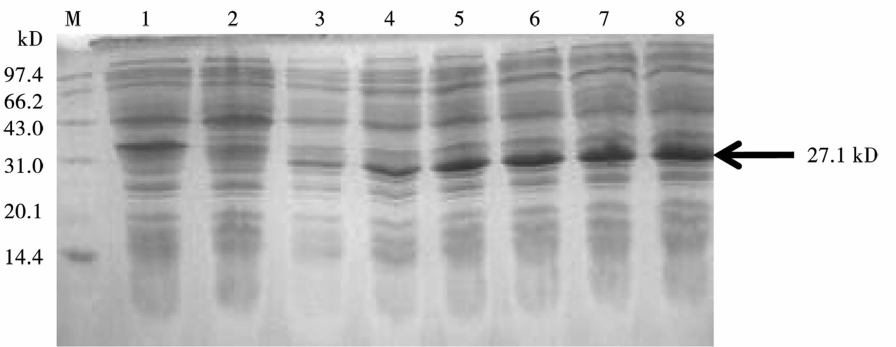
M;DL5000 Marker;1 和 2:重组质粒;3 和 4:重组质粒双酶切。
M;DL5000 Marker;1 和 2:Recombinant plasmid;3 和 4:Recombinant plasmid enzyme digestion.

图 8 pMD18-T-*GmPM13* 重组质粒双酶切鉴定
Fig. 8 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*GmPM13* by double enzyme digestion



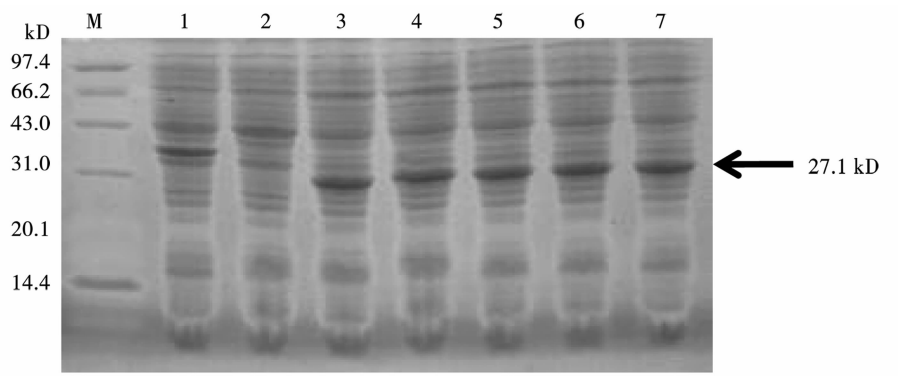
M:低分子量蛋白 Marker;1 ~6:空载体、未诱导、16℃、20℃、28℃、37℃。
M:Low molecular weight protein Marker; 1-6:pET-28a, 0mM IPTG, 16℃, 20℃, 28℃, 37℃.

图 9 不同温度诱导表达 *GmPM13* 蛋白
Fig. 9 The expression of *GmPM13* protein at different temperatures



M:低分子量蛋白 Marker;1 ~8:空载体、未诱导、4、6、8、10、12、14 h。
M:Low molecular weight protein Marker ;1-8:pET-28a、0 mM IPTG、6、8、10、12、14 h.

图 10 不同时间诱导表达 *GmPM13* 蛋白
Fig. 10 The expression of *GmPM13* protein at different time



M:低分子量蛋白 Marker;1~7:空载体、未诱导、0.5,1,1.5,2.0 和 2.5 mmol·L⁻¹ IPTG。
M: Low molecular weight protein Marker;1-7: pET-28a、0,0.5,1,1.5,2.0 and 2.5 mmol·L⁻¹ IPTG.

图 11 不同浓度 IPTG 诱导表达 GmPM13 蛋白

Fig. 11 The expression of GmPM13 protein at different concentrations

3 结论与讨论

钙离子结合蛋白因其具有 EF - 手型保守域被归类为钙离子调节蛋白,它在植物发展过程及应激反应中扮演着非常重要的角色^[23]。在目前的研究中,研究者推测 caleosin 可能参与钙离子调控的信号转导途径^[24],在增加种子油体的稳定性上起着至关重要的作用^[5],并且与单层磷脂层和油体锚定结合存在着必然的联系。

1996 年,Frandsen G 等^[10]在水稻中分离得到 caleosin 基因,这是植物中第一个被鉴定的油体钙蛋白基因,为日后油体钙蛋白的研究奠定了基础。2010 年,Feng 等^[11]在小麦中发现了 TaCab1 EF - 手型钙离子结合蛋白,并通过一系列试验验证该基因是一个感病相关基因,参与菌丝侵入或者寄主抗性途径的识别。2011 年,魏征等^[17]发现了水稻油体钙蛋白家族,对其成员进行了鉴定,并确定水稻油体钙蛋白基因结构与染色体的分布情况,通过一系列的试验发现水稻油体钙蛋白基因家族与干旱胁迫息息相关。可见植物油体钙蛋白基因具有一定的研究价值,但对大豆油体钙蛋白基因的研究在国内外还未见报道。

本研究克隆得到大豆油体钙蛋白基因 *GmPM13* 的全长序列,构建了重组质粒 pET-28a-*pm13*,并在原核生物中进行诱导表达。研究表明,影响重组质粒表达的因素包括:生长时间、生长温度和 IPTG 的浓度。本试验设置了不同的 IPTG 浓度梯度、温度梯度和时间梯度探究表达的最适条件,以 1 mmol·L⁻¹ IPTG 浓度为基准,摸索诱导的最适温度;再以摸索到的最适温度为基准,摸索最合适的 IPTG 浓度和时间,结果表明在 28℃,1.5 mmol·L⁻¹ IPTG 浓度下

诱导 12 h 达到最大表达量。
本研究对大豆油体钙蛋白基因进行克隆、构建原核表达载体,并进行了原核表达体系的优化,目的是为进一步纯化大豆 caleosin 抗体蛋白,为今后利用基因工程方法检测转 *GMPM13* 基因提供抗体,也为创制大豆新材料提供新思路。

参考文献

[1] 沈玥. 油料作物酰基脂类代谢基因和转录因子及油体钙蛋白的基因组学分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016. (Shen Y. Genome-wide investigation of acyl-lipid metanolism and claeosins in oil crops [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.)
[2] 吴隆坤,肖志刚. 大豆油体的研究进展及其在食品中的应用[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2015(3):369-372. (Wu L K, Xiao Z G. Advances in soybean oil body and its application in food[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2015(3):369-372.)
[3] 胡琪,郭诗文,吕莹. 油脂体组成、结构及油脂体蛋白研究进展[J]. 食品科学,2015,36(11):230-235. (Hu Q, Guo S W, Lyu Y. Review of research on components, structure and proteins of oil body[J]. Food Science, 2015,36(11):230-235.)
[4] 丁勇,徐春雷,甘莉. 植物油体及其相关蛋白的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2008,27(4):558-563. (Ding Y, Xu C L, Gan L. Research progress of vegetable oil body and its related proteins[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008,27(4):558-563.)
[5] Næsted H, Frandsen G I, Guang-Y J, et al. Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies[J]. Plant Molecular Biology, 2000,44(4):463-476.
[6] Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. An Arabidopsis gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration [J]. Plant & Cell Physiology, 2000,41(7):898-903.
[7] Shen Y, Xie J, Liu R D, et al. Genomic analysis and expression

investigation of caleosin gene family in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(4): 365-371.

[8] Chen J C, Tsai C C, Tzen J T. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1999, 40 (10): 1079-1086.

[9] Lin L J, Tai S S, Peng C C, et al. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies [J]. *Plant Physiology*, 2002,128 (4):1200-1211.

[10] Frandsen G, Müller-Uri F, Nielsen M, et al. Novel plant Ca²⁺-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (1): 343-348.

[11] Feng H, Wang X, Sun Y, et al. Cloning and characterization of a calcium binding EF-hand protein gene TaCab1 from wheat and its expression in response to *Puccinia striiformis* f. sp. tritici and abiotic stresses [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(6):3857-3866.

[12] Keddie J S, Hübner G, Slocombe S P, et al. Cloning and characterisation of an oleosin gene from *Brassica napus* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992,19(3):443-453.

[13] Murphy D J, Cummins I, Kang A S. Synthesis of the major oil-body membrane protein in developing rapeseed (*Brassica napus*) embryos. Integration with storage-lipid and storage-protein synthesis and implications for the mechanism of oil-body formation [J]. *The Biochemical Journal*, 1989, 258(1): 285-293.

[14] Murphy D J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms [J]. *Progress in Lipid Research*, 2001,40(5):325-438.

[15] 丁勇, 陈庆波, 徐春雷. 油菜油体钙蛋白基因 *BnClol* 的克隆和表达 [J]. *作物学报*, 2008, 34(11):1921-1928. (Ding Y, Chen Q B, Xu C L. Cloning and expression of *BnClol* gene from *Brassica napus* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34 (11): 1921-1928.)

[16] 魏征, 马红, 葛晓春. 水稻油体钙蛋白家族的进化及对干旱胁迫的响应性分析 [J]. *科学通报*, 2011, 56(20):1612-1621. (Wei Z, Ma H, Ge X C. Phylogenetic analysis and drought-responsive expression of the rice caleosin gene family [J]. *Science China Press*, 2011, 56(20):1612-1621.)

[17] 孙海波, 王智慧, 刘学群. 一种适用于油菜、大豆、花生、芝麻四种油料作物种子的 RNA 提取方法 [J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(4):353-358. (Sun H B, Wang Z H, Liu X Q. Modified RNA extract method for seeds of rapeseed, soybean, peanut and sesame [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2012, 34(4): 353-358.)

[18] 杜何为, 黄敏, 何凯. 水稻、玉米、小麦成熟种子总 RNA 的快速提取 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(9):2091-2094. (Du H W, Huang M, He K. A method of rapid isolation of total RNA from mature seeds in rice, maize, and wheat [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(9):2091-2094.)

[19] 韩琳. 大豆 *rbcs* 基因启动子的遗传转化及功能分析 [D]. 长春:吉林农业大学, 2013. (Han L. Genetic transformation and functional analysis of *rbcs* promoter of soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.)

[20] 佟珊珊. 根特异性启动子表达 *AAP1-Bar* 双价基因在玉米新材料创制中的应用研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2014. (Tong S S. The applied research of *AAP1-Bar* bivalent genes expression by root-specific promoters in creation of new maize material [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.)

[21] 崔喜艳, 董雅致, 刘晓庆. 栽培大豆 Rubisco 小亚基基因 (*rbcs*) 全长 cDNA 的克隆及原核表达 [J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(3):329-333. (Cui X Y, Dong Y Z, Liu X Q. Cloning and prokaryotic expression of full-length cDNA of Rubisco small subunit gene (*rbcs*) in *Glycine max* [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, 36(3):329-333.)

[22] 陈光朗, 董万春, 韩娇. 拟南芥 AtXCD1 蛋白的原核表达研究 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(14):4197-4198, 4223. (Chen G L, Dong W C, Han J. Prokaryotic expression of *Arabidopsis* AtXCD1 fusion proteins [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(14):4197-4198, 4223.)

[23] Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21 (1): 14-17.

[24] Hernandez-Pinzon I, Patel K, Murphy D J, et al. The *Brassica napus*, calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum and lipid body-associated isoforms [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2001, 39(7):615-622.