

## 黄瓜中 *CBF1* 基因的克隆及其表达分析

李丹, 蒋欣梅\*, 于锡宏\*

东北农业大学园艺学院蔬菜生理与设施园艺研究室, 哈尔滨 150030

**摘要:** 以黄瓜中 RNA 为模板, RT-PCR 扩增出 *CBF1* 基因 cDNA 序列的部分片段。测序表明此基因与黄瓜 *CBF1* 基因的同源性达 99.44%。RT-PCR 方法检测结果显示, *CBF1* 基因在低温和盐胁迫下的黄瓜中表达, 而在干旱和 ABA 胁迫下则不表达。

**关键词:** 黄瓜; *CBF1*; RT-PCR; 基因表达

## Cloning and Expression Analysis of *CBF1* from Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

LI Dan, JIANG Xin-Mei\*, YU Xi-Hong\*

Vegetable Physiology and Installation Horticulture Laboratory, College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** The *CBF1* gene were obtained by RT-PCR from cucumber (*Cucumis sativus*). The sequence showed high homology (99.44%) to the published sequences of *CBF1*. The expression patterns of the *CBF1* gene in response to low temperature, drought, ABA and NaCl stresses at different time points were further investigated by using RT-PCR. The results showed that *CBF1* gene could express under low temperature and NaCl treatment in cucumber. However, it could not express under drought and ABA treatment.

**Key words:** cucumber (*Cucumis sativus*); *CBF1*; RT-PCR; gene expression

黄瓜属于典型的冷敏型植物,其所有组织以及果实都对低温敏感,通常温度在10~12℃以下时其生理活动失调,生长减缓或停止发育,5℃以下则难以适应(山东农业大学2000)。近几年来,人们用分子生物学技术提高植物抗寒能力的研究进展迅速,特别是一类能调节许多抗寒相关基因*COR* (cold responsive)的转录激活因子CBF (CRT/DRE-binding factor)的研究甚多(Stockinger等1997; Liu等1998)。*CBF*转录因子是AP2/EREBP类转录因子,它们特异地结合到含有CRT/DRE元件的*COR*基因启动并激活*COR*基因的表达,进而提高植物的抗寒性。组成型表达*CBF*基因导致拟南芥上多个含有CRT/DRE元件的*COR*基因表达,且不需冷诱导就可以提高拟南芥整株的抗寒性(Liu等1998; Kasuga等1999),*CBF*基因在提高抗寒性中的功能也促进了分离鉴定其他植物中*CBF*类似基因的研究。除了拟南芥以外,人们已从油菜、小麦、黑麦(Jgalo等2001)、水稻(Chen等2003)、番茄(Zhang等2004)、烟草、草莓(王占斌等2008)、葡萄(Xiao等2006)和樱桃(赵纯和归燕2009)等植物中分离出*CBF*类似基因并证明其有与CBF相似的功能。越

来越多的研究表明,拟南芥*CBF*冷响应途径高度保守地存在于高等植物中。据此,本文以黄瓜为试材,克隆黄瓜*CBF1*基因,并研究其在低温、盐胁迫、外源喷施ABA和干旱条件下的表达,以补充黄瓜*CBF*基因家族的研究,并为今后研究黄瓜中的低温信号转导途径提供参考。

### 材料与方法

试验材料为我们实验室保存的黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种‘Y081’,随机选取三叶一心期的黄瓜幼苗置于4℃的培养箱中,8h后取0.1g嫩叶,按Trizol试剂方法(Invitrogen公司)提取总RNA,并用于*CBF1*基因片段克隆。低温胁迫处理时,将幼苗转移到4℃的培养箱中处理0、2、4、8、12、24h后取叶片混匀提取总RNA。干旱处理时,将幼苗

收稿 2009-11-16 修定 2010-02-10

资助 黑龙江省教育厅项目(11531019)、哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目(2007RFLXN004)、东北农业大学创新团队课题(CXT002-2-3)、黑龙江省教育厅寒地蔬菜生物学重点实验室。

\* 通讯作者(E-mail: yxh100@sohu.com/jxm0917@163.com; Tel: 0451-55190300)。

从土中取出,根系除去土壤洗净后用滤纸吸干表面水分,放在滤纸上凉干0、4、8、12、24 h,取叶片混匀提取总RNA; ABA处理时,向生长幼苗的营养钵中浇灌  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 溶液,每营养钵施用 50 mL,于处理后0、4、8、12、24 h取叶片混匀提取总RNA; 盐处理时,向生长植株的营养钵中浇灌  $250 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 溶液,每营养钵施用 50 mL,于处理后0、4、8、12、24 h取叶片混匀提取总RNA。每处理 10 株。

根据GenBank中登录的黄瓜 *CBF1* 基因编码区的cDNA序列(GenBank登录号DQ776899),采用 Primer 5.0 软件设计引物,正向引物为: 5' AACTTGCGAATTACGTTGC 3',反向引物为: 5' TATCGAATATTAGTAACTCCAAAGC 3',委托北京华大基因科技公司合成。按照 Easy Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒(Trans 公司)反转录合成cDNA。PCR 反应体系为: 4  $\mu\text{L}$  模板、5  $\mu\text{L}$   $10\times$ Taq 缓冲液、4  $\mu\text{L}$   $2.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP、正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶,加水至 50  $\mu\text{L}$ ,以 *Actin* 基因为内标基因。扩增引物(PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段回收后与载体连接,转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,委托北京华大基因科技公司测定DNA序列。

## 结果与讨论

### 1 黄瓜 *CBF1* 基因的克隆与序列比对

以黄瓜总RNA为模板,进行RT-PCR扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到预期大小的长为710 bp左右的 *CBF1* 片段(图1),回收产物,经克隆、测序,结果表明:此片段为716 bp,将序列在DNAMAN 5.0中进行多序列比对,结果(图2)表明其与黄瓜 *CBF1* 全长基因(GenBank 登录号DQ776899)的同源性高达99.44%,与拟南芥、白菜和大麦 *CBF1* 基因的同源性分别为95.52% (GenBank 登录号NM\_118681)、75.74% (GenBank 登录号DQ402470)、51.61% (GenBank 登录号AF418204),说明扩增出的基因片段是 *CBF1* 基因的编码区。

### 2 *CBF1* 基因表达模式分析

低温对 *CBF1* 基因表达有影响。如图3所示,

未经冷处理的幼苗在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷诱导 2 h 后其 *CBF1* 基因开始表达, 8 h 达到最高峰, 随后开始下降。这种表达特征与包括拟南芥在内的多种植物 *CBF* 基因的(Jgalo 等 2001)相似, 这说明 *CBF1* 参与黄瓜的冷应答过程, 可能在黄瓜的冷调节过程中起一定的作用。此外, *CBF* 基因多为低温诱导基因, 如拟南芥中 *CBF1*、*CBF2*、*CBF3* 基因在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 15 min 后强烈表达(Stockinger 等 1997; Gilmour 等 1998)。黄瓜 *CBF1* 的表达也受低温诱导,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 后可检测到转录产物, 随着时间的延长, 转录产物逐渐增加, 8 h 达到最高, 之后逐渐下降, 24 h 时转录产物最低。

干旱、ABA 及盐处理对 *CBF1* 基因表达也有影响。如图 4~6 所示, 在干旱和 ABA 处理下均未测到 *CBF1* 的表达, 说明黄瓜的 *CBF1* 基因可能属于冷特异诱导基因。一般认为, 外源 ABA 进入植物体后, 可引起一系列物质代谢与能量代谢的改变, 从而使植物产生对低温的适应能力(郭确和潘瑞炽 1984)。植物体内许多冷诱导基因受 ABA 的调控, 如外源 ABA 比低温驯化更能使冷诱导基因 *RAB18* 表达(吴楚和王政权 2000), 本结果显示在喷施外源 ABA 条件下, *CBF1* 基因并不表达, 说明 *CBF1* 基因可能是通过 ABA 非依赖途径而参与冷应答过程的。盐胁迫 8 和 12 h 时可测到 *CBF1* 的转录, 随后消失。

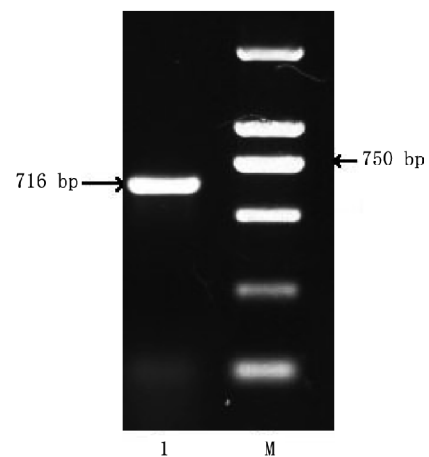


图1 黄瓜 *CBF1* 基因的 RT-PCR 产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of RT-PCR products of *CBF1* gene in cucumber

1: 目的基因; M: DNA 分子量标准 DL2000。

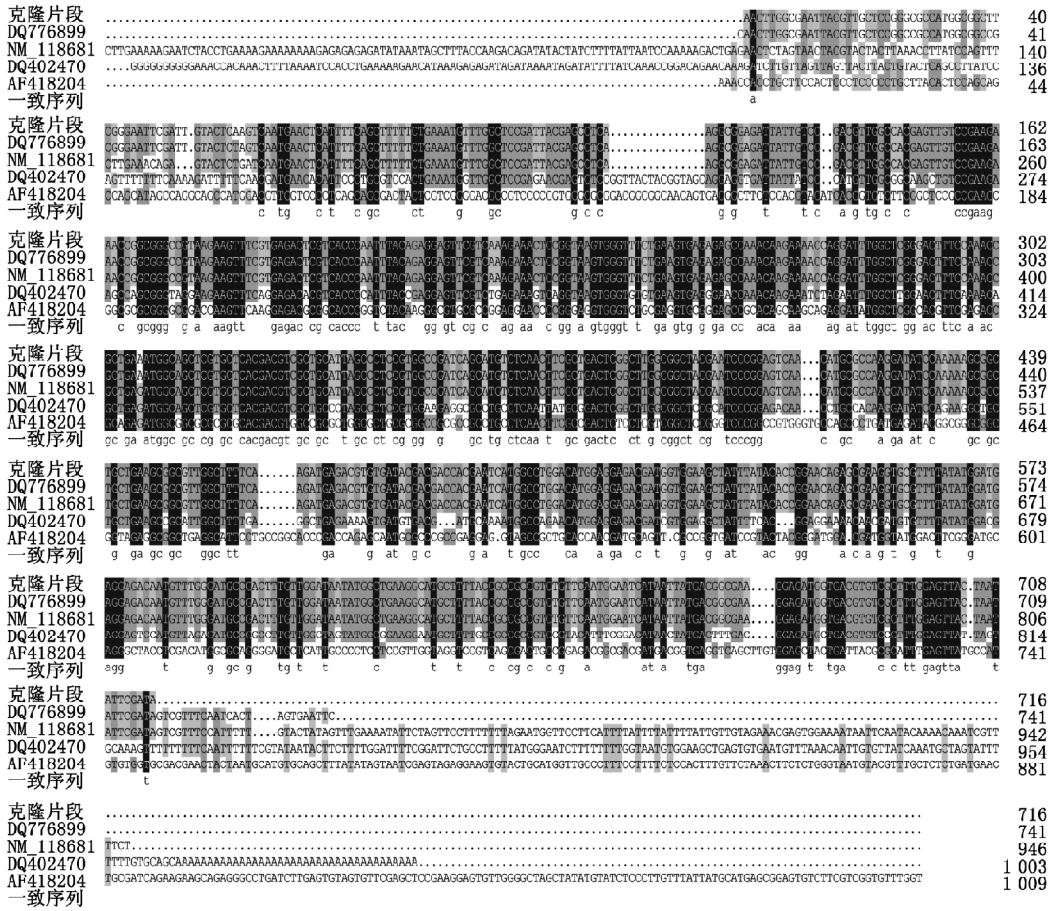


图2 黄瓜 *CBF* 基因克隆片段与其他植物 *CBF1* 基因序列的同源性比较

Fig.2 Homology comparison of *CBF1* sequences in cucumber and other plants

GenBank 登录号分别为黄瓜(DQ776899)、拟南芥(NM\_118681)、白菜(DQ402470)、大麦(AF418204)。

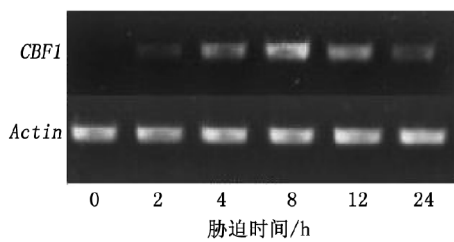


图3 低温胁迫下 *CBF1* 基因的表达  
Fig.3 Expression of *CBF1* under low temperature stress

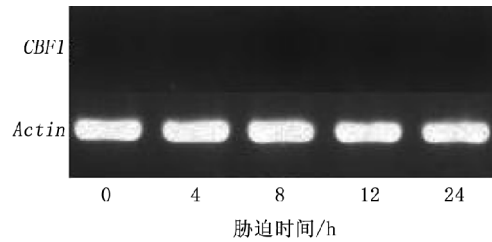


图5 ABA处理时的 *CBF1* 基因表达  
Fig.5 Expression of *CBF1* under ABA treatment

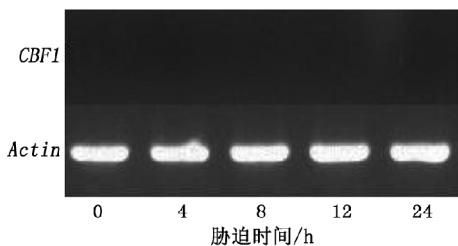


图4 干旱胁迫下 *CBF1* 基因的表达  
Fig.4 Expression of *CBF1* under drought stress

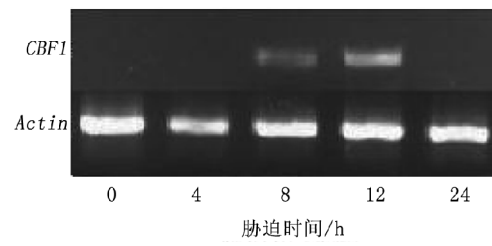


图6 盐胁迫下 *CBF1* 基因的表达  
Fig.6 Expression of *CBF1* under NaCl stress

## 参考文献

- 郭确, 潘瑞炽(1984). ABA对水稻幼苗抗冷性的影响. 植物生理学报, 10 (4): 295~303
- 山东农业大学主编(2000). 蔬菜栽培学总论. 北京: 中国农业出版社, 206~210
- 王占斌, 黄哲, 郑苗苗(2008). 抗冻诱导因子 *CBF* 基因及其在木本植物的抗寒应用. 林业科技开发, 22 (5): 9~13
- 吴楚, 王政权(2000). 脱落酸及其类似物与植物抗寒性之间的关系. 植物生理学通讯, 36 (6): 562~567
- 赵纯, 归燕(2009). *CBF* 转录因子在植物抗冷育种中的应用. 农业科技通讯, 6: 92~94
- Chen JQ, Dong Y, Wang YJ, Liu Q, Zhang JS, Chen YS (2003). An AP2/EREBP-type transcription-factor gene from rice is cold-inducible and encodes a nuclear-localized protein. *Theor Appl Genet*, 107: 972~979
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*, 16: 433~442
- Jgalo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhnag X, Hakae V, Zhnag JZ, Deits T, Thomashow MF (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol*, 127: 910~917
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, 17: 287~291
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). The transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391~1406
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035~1040
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 29: 1410~1421
- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional *CBF* cold response pathway, but a *CBF* regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J*, 39: 905~919