

小桐子转录因子CBF基因的克隆及酵母表达载体的构建

王海波^{1,2}, 王莎莎¹, 邹竹荣¹, 龚明^{1,*}

¹云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明650500; ²曲靖师范学院生物资源与环境科学学院, 云南曲靖655011

摘要: 高等植物不依赖ABA的低温信号转导途径中, 存在于细胞膜上的低温感受器通过ICE-CBF-COR级联响应将外界低温信号传导至胞内, CBF转录因子是承接上游ICE类转录激活因子与下游COR类低温响应基因的关键环节。本文利用前期获得的小桐子低温锻炼转录组数据, 克隆到了一条小桐子CBF基因的cDNA序列, 命名为*JcCBF1* (GenBank登录号KJ670147.1)。结果表明, 该cDNA序列全长1 034 bp, 完整开放阅读框729 bp, 编码242个氨基酸, 分子量为26.6 kDa, 理论等电点为9.38, 具有CBF家族典型的AP2基序, 同时构建了其酵母表达载体, 为小桐子CBF转基因功能验证奠定基础。

关键词: 小桐子; 转录因子; CBF; 不依赖ABA的低温信号转导; 基因克隆; 表达载体构建

Molecular Cloning and Yeast Expression Vector Construction of the Transcription Factor Encoding CBF from *Jatropha curcas*

WANG Hai-Bo^{1,2}, WANG Sha-Sha¹, ZOU Zhu-Rong¹, GONG Ming^{1,*}

¹School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy of Ministry of Education, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650500, China; ²College of Biological Resource and Environmental Science, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China

Abstract: Low temperature receptor present on the cell membrane can transfer environmental low temperature signal to inner of cells through cascade response of ICE-CBF-COR in ABA-independent cold signal transduction pathway. CBF transcription factor is a key step to connect the upstream of ICE activating transcription factor and downstream of COR low temperature responsive genes. A gene, named *JcCBF1* (GenBank accession KJ670147.1) was cloned based on the chilling hardening transcriptome of *Jatropha curcas*. The full-length cDNA of *JcCBF1* was 1 034 bp, containing a 729 bp open reading frame. The ORF encoded a 242 amino acid polypeptide with the molecular weight of 26.6 kDa and the pI value of 9.38. The *JcCBF1* protein encompasses conserved motif of AP2. Expression vectors of *Saccharomyces cerevisiae* were constructed, in order to lay the foundation for CBF transgenic verification in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; transcription factor; CBF; ABA-independent cold signal transduction pathway; gene cloning; expression vector construction

小桐子属大戟科(Euphorbiaceae)麻风树属(*Jatropha*)能源植物(林娟等2004; 何璐等2010)。原产热带美洲, 常作为优势种植物而形成纯群落, 在我国多省份都有野生种分布(曾觉民2006; 张明生等2005)。小桐子耐干旱贫瘠, 在干热河谷地区可作为水土保持树种用于荒山造林(潘志贤等2008)。全株具有乳汁, 含多种药用成分可用作化工、轻工原料。作为能源树种, 其种子含油量高、油质好, 可用作生物柴油的原料, 油饼中富含蛋白质, 脱毒后可用于动物饲料, 综合利用前景广阔(王海燕等2010; 吴国江等2006)。

转录因子CBF/DREB1介导的低温信号途径是目前研究的较为清楚的低温响应基因表达调控网络。CBF蛋白(C-repeat binding factor)属于AP2/EREBP家族DNA结合蛋白, 识别保守的5 bp核心基序CCGAC。该基序也是脱水响应元件(dehydra-

收稿 2015-04-14 修定 2015-06-08

资助 国家自然科学基金(31260064、31460059、31460179和31460182)和云南省教育厅科研基金重大专项项目(ZD2010004)。

* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com; Tel: 0871-65516516)。

tion-responsive element, DRE)的核心基序,常以单拷贝或多拷贝形式广泛存在于低温调节基因(cold-regulated, COR)的启动子区域。因此CBF又称为DREB (DRE binding factor) 1转录因子,在近年来植物非生物胁迫研究中受到了广泛的关注,成为最主要的研究热点(Zhou等2011)。从1997年Stockinger等(1997)利用酵母单杂交法首次克隆出拟南芥CBF1转录因子开始,到目前为止,已经有来自约100种不同植物的不同CBF家族成员被克隆并进行了功能验证及转基因研究,如拟南芥发现4个、番茄发现3个、桉树发现5个、甜樱桃发现3个、杨树中发现4个等,而在小桐子中关于CBF还没有报道。本研究利用我们实验室测序的小桐子低温锻炼转录组(Wang等2014)及数字基因表达谱(Wang等2013)数据,克隆到一条小桐子CBF基因的cDNA序列,并构建了其酵母表达载体,为小桐子CBF基因植物表达载体的构建、转基因研究及抗冷性机制的阐明奠定了基础。

材料与方法

1 实验材料及处理

供试小桐子(*Jatropha curcas* L.)种子取自云南省楚雄州元谋县。选取饱满的小桐子种子,用1.5% CuSO₄消毒20 min,无菌水漂洗5次,于26 °C的恒温培养箱中吸涨24 h (李忠光和龚明2010)。将吸涨的种子在无菌水中漂洗3次,播于垫有5层用无菌水湿润滤纸的白磁盘(24 cm×16 cm)中,于相对湿度(RH) 75%、26 °C/20 °C、16 h/8 h光周期的恒温培养箱中萌发5 d。将发芽的种子播于消毒的培养土中,并于同上的恒温培养箱中生长15 d至第2片真叶展开。取第2片真叶材料,液氮速冻后置于-80 °C冰箱中用于RNA的提取。

2 菌株与主要试剂

大肠杆菌DH5 α 与酵母菌INVSc1菌株(基因型为: MAT α *his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52* MAT α *his3d1 leu2 trp1-289 ura3-52*)由本实验室保存;总RNA提取试剂TransZol Up、DNase I、TransStart Taq DNA Polymerase、2×EasyTaq PCR SuperMix (+dye)、TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix、琼脂糖凝胶回收试剂盒EasyPure Quick Gel Extraction Kit、质粒小量提取试剂盒EasyPure Plasmid MiniPrep Kit、TA克隆载体pEASY-T1 Cloning

Kit、Trans 2K Plus II DNA Marker等均购自北京全式金生物技术有限公司;酵母表达载体pYES2购自Invitrogen公司(酵母表达载体pYES2.1/V5-His-TOPO在大肠杆菌中具有氨苄青霉素筛选标记,在酵母菌中为尿嘧啶缺陷型筛选标记,插入基因前后分别为GAL1启动子与CYC1终止子,在酵母细胞中培养时受到葡萄糖抑制及半乳糖激活);HindIII和XhoI限制性内切酶购自大连宝生物公司;引物合成和测序由深圳华大基因有限公司完成。

3 实验方法

3.1 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

取0.1 g小桐子叶片材料,利用TransZol Up试剂提取总RNA,并利用DNase I消化RNA中的基因组DNA,得到纯化的总RNA。以Anchored Oligo(dT)₁₈为逆转录引物,利用TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix合成第一链cDNA。

3.2 小桐子*JcCBF1*基因全长cDNA的克隆

通过NCBI检索得到拟南芥的CBF家族基因全长mRNA序列,以我们高通量测序得到的小桐子低温锻炼转录组测序的45 251条Unigenes为数据库,进行本地Blast,检索到与拟南芥CBF基因相似性最高的Unigenes序列CL4632.Contig1_JC-CK_1A。以此序列为基础设计全长扩增引物,并送深圳华大基因合成。引物序列为,上游F: 5' AGAGAAG-GTCTTGTTGTTGTG 3';下游R: 5' TAATAATCGTA-ATCGTCATC 3'。

以3.1节反转录cDNA为模板,使用热启动双封闭DNA聚合酶TransStart Taq DNA Polymerase进行PCR扩增,扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 20 min。扩增完成后使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,回收目的基因条带(1 034 bp)。将目的基因片段与克隆载体pEASY-T1连接,命名为pEASY-T1-*JcCBF1*,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,涂LB抗性平板(LB-Amp⁺+IPTG+X-gal),过夜生长,挑取白斑克隆,以基因全长引物进行菌落PCR验证,送深圳华大基因公司以通用引物M13进行双向测序。测序正确并确定没有点突变,挑取阳性克隆菌落,摇菌并提取克隆质粒pEASY-T1-*JcCBF1*。

3.3 小桐子*JcCBF1*基因的生物信息学分析

将测序正确的cDNA序列利用BioEdit软件翻译成氨基酸序列。利用在线工具ProtParam计算蛋

白质的理论分子量、等电点等基本参数。利用Spidey软件进行克隆cDNA序列与基因序列(小桐子基因组数据库<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)比对以确定基因内含子与外显子的结构。利用NCBI CDD工具进行结构域与功能元件的鉴定。经过转录组Blast检索到的小桐子CBF序列,利用ClustalX进行序列相似性比对,然后用MEGA 4.0软件通过邻接法构建系统进化树,并采用泊松法进行检验。利用PlantCARE软件进行启动子顺式作用元件的分析。利用Phyre2进行蛋白质三维结构的同源建模,并利用VMD软件显示其三维空间结构。

3.4 小桐子*JcCBF1*基因酵母表达载体的构建

利用HindIII与XhoI双酶切质粒pEASY-T1-*JcCBF1*与酵母表达载体pYES2,切胶回收*JcCBF1*片段与pYES2的大片段, T4 DNA连接酶22 °C连接5 h,命名为pYES2-*JcCBF1*,转化大肠杆菌DH5 α 感受

态细胞,涂LB-Amp⁺平板,过夜生长,挑取克隆以基因全长引物进行菌落PCR验证,经过验证的阳性克隆送深圳华大基因测序,确定没有点突变,提取重组酵母表达质粒pYES2-*JcCBF1*, LiAc法转化酿酒酵母野生型菌株INVSc1,命名为INVSc1-pYES2-*JcCBF1*,并进行酵母菌落PCR验证以确定阳性克隆。

实验结果

1 小桐子*JcCBF1*基因全长cDNA的克隆

以3.1节反转录cDNA为模板,利用基因全长引物,扩增*JcCBF1*基因cDNA全长序列。结果显示,扩增得到约1.1 kb的条带(图1-A),与预期大小一致。将目的条带切胶回收后与T/A克隆载体pEASY-T1连接,命名为pEASY-T1-*JcCBF1*,并转化大肠杆菌DH5 α ,菌落PCR验证阳性克隆(图1-B)。对测序正确没有点突变的阳性克隆,挑取单菌落摇菌,提取重组质粒pEASY-T1-*JcCBF1*(图1-C)。

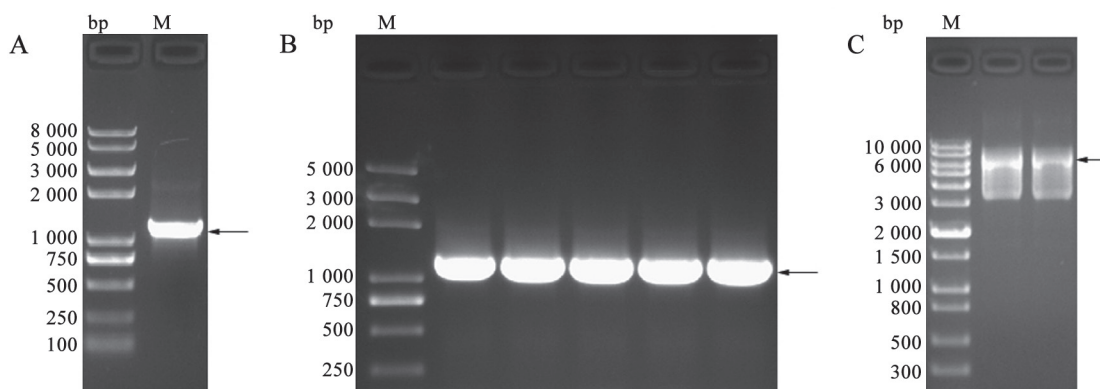


图1 小桐子*JcCBF1*基因cDNA克隆的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of cDNA amplification for *JcCBF1* in *J. curcas*

A: PCR扩增; B: 菌落PCR验证; C: 重组质粒pEASY-T1-*JcCBF1*。

2 小桐子*JcCBF1*基因的生物信息学分析

经过克隆测序的*JcCBF1*基因的cDNA序列全长为1 034 bp,包含完整的开放阅读框729 bp,编码242个氨基酸(图2)。经过ProtParam分析,该基因编码的蛋白质分子量为26.6 kDa,理论等电点为9.38。Spidey软件分析显示小桐子*JcCBF1*基因不含内含子,这与拟南芥的报道一致(Stockinger等1997)。

利用NCBI数据库检索得到拟南芥中目前发现的4个CBF基因mRNA序列,分别为ABV-27084.1、ABV27116.1、ABV27152.1和ABV-

27182.1。利用以上序列对我们实验室测序的小桐子低温锻炼转录组数据进行本地Blast检索,得到相似性序列。排除没有开放阅读框(ORF)的序列与推导氨基酸序列中没有AP2基序(CBF转录因子共有的DNA结合基序)的序列,共得到9条小桐子CBF基因Unigenes序列,其基本信息列于表1。由表1可知,所有鉴定的9条Unigenes序列都包含一个CBF家族蛋白典型AP2基序,且长度均为约60个氨基酸残基,属于AP2/ERF转录因子家族。

通过邻接法构建小桐子CBF家族蛋白进化树

```

1   CAACAATTTTCTTTCTATTTAGCATAAACCAGCAATCTGCTCAACATGTAACATACCCTAAAATATCAAGCCACCCCATACAAAAGCCTT
91  CGAGACCTAGGTAAAAAATAAAATAAAATGAAATGGCACCAAAACCAAAACTATACAATCGGACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAA
181 CACACTAACCCAAAATTTTTATCAAGAGAAGGTCTTGTGTGTGTTATCCCATTCAGTTCTTATCATATCCCTTTCTTTCTCATACC
271 CAACAATTTTTTTTATAAAAGAAAATTTTCGTTCTTTCTTTCATCTTCTTAATCCATTTTTCCATTTTCTAGTCTTTCTTGGTTGTTGA
361 TTGTTTCATACATGAAGATTTTCTGTTAATCAAGCTGATTTGGTTTTGATTGGGTTTTTTTTCTTTTCATTCTTTCTCACAATCCACCT
451 TTCTTTTCGTTCTTTCTTCAATAATCTATGAGGAGAGGAAGAGCCCGCTGACATCCGCTGCGGCTGCAGATGCTAAACAAGCCGTG
      M R R G R A A V T S A A A A D A K Q A V
541 GAAACCAACGGATCTGCACCACAAAAATCCTAAACGGAAAGAGAACCAGATATAGAGGAGTTTCGTAAGAACCATGGGGCAGATTTGCT
      E T N G S A P Q K I L N G R E P R Y R G V R K R P W G R F A
631 GCGGAGATTAGAGATCCATGGAAGAAGACGAGAGTTTGGCTTGGTACTTTTGTCTGCAGAAGACGCTGCACGTGCTTACGACAAGCGG
      A E I R D P W K K T R V W L G T F D S A E D A A R A Y D K A
721 GCTCGTACGCTTCGTTGACGAAAGCTAAAACCAATTTCTATCTACTTCTAATTTATCTCCTTTACCTATCAAAAACCCGCCGAC
      A R T L R G P K A K T N F P I S T S N L S P F T Y Q N P P D
811 CCGTTCATGGATCACCAGATTTATTCATCAATGCATTTCAAGAGCATCATGTAATCCTCAAGACCTACGCTAGCAGTTTGTAGTAGT
      P F M D H R I Y S S N A F Q E H H V N P Q R P T S S S L S S
901 ACCGTCGAGTCTTCAGCGTCCCGGCCACCAACGACGGTGTACCACCAATATCAACAACAAAATCAGGTGTTTATTAGCGACGGTA
      T V E S F S G P R P P T T V L P P I S T T K S G V L L A T V
991 ACGAGAGGTCACAAGAGACACCATCCTCGACCCCGCGGTGGTCCGGAAGATTGTCACAGCGATTGTGATTATCCTCTTCAGTAGTT
      T R G H K R H H P R T P P V V P E D C H S D C D S S S S V V
1081 GACGATGGAGATATTGCATCATCGTCTTCTATACAGGAAGCCGTTACCCTGATCTGAATTTTCCACCGTTGGATCAGTTGACTTT
      D D G D I A S S S S L Y R K P L P F D L N F P P L D Q V D F
1171 CCAATTGATGATCCTCAGTGTACTGCTCTATGCCTTTGATGATTATGATGATGACGATTACGATTATTAATGATAAAAAAATTAATTT
      P I D D L Q C T A L C L *
1261 TTTTAAACATTATTGTGCGGATCAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGA

```

图2 小桐子*JcCBF1*基因的cDNA与推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *JcCBF1* cDNA in *J. curcas*
起始与终止密码子用下划线标注。

表1 小桐子CBF家族Unigene序列

Table 1 Unigene sequences of CBF family in *J. curcas*

Unigenes序列	序列长度/bp	开放阅读框起止范围/bp	氨基酸数目/个	AP2基序范围/aa
CL4632.Contig1_JC-CK_1A	1 306	98~826 (729)	242	37~97 (61)
CL4632.Contig2_JC-CK_1A	1 297	89~817 (729)	242	37~97 (61)
CL4632.Contig3_JC-CK_1A	1 291	98~811 (714)	237	37~96 (60)
CL4632.Contig4_JC-CK_1A	1 281	89~802 (714)	237	37~96 (60)
Unigene9000_JC-CK_1A	747	47~688 (642)	213	42~102 (61)
Unigene1945_JC-CK_1A	1 202	41~1 117 (1 077)	358	162~221 (60)
Unigene10086_JC-CK_1A	845	94~831 (738)	245	57~117 (61)
Unigene4737_JC-CK_1A	1 592	310~1 434 (1 125)	374	76~134 (59)
Unigene7722_JC-CK_1A	1 059	115~1 056 (942)	313	111~169 (59)

并标注其AP2基序的分布。从图3中可以看出, 9条序列分属于5个类型, CL4632.Contig1_JC-CK_1A与CL4632.Contig2_JC-CK_1A氨基酸序列长度相同, 仅存在两个氨基酸差异, 且AP2基序位置及序列相同, 推测两者应该属于同一个小桐子CBF转录

因子蛋白, 而CL4632.Contig3_JC-CK_1A与CL4632.Contig4_JC-CK_1A也存在同样的情况, 属于小桐子的另一个CBF转录因子蛋白。而其他的5种小桐子CBF转录因子蛋白在序列上没有很高的同源性, AP2基序分布也不一致, 但其AP2基序序列

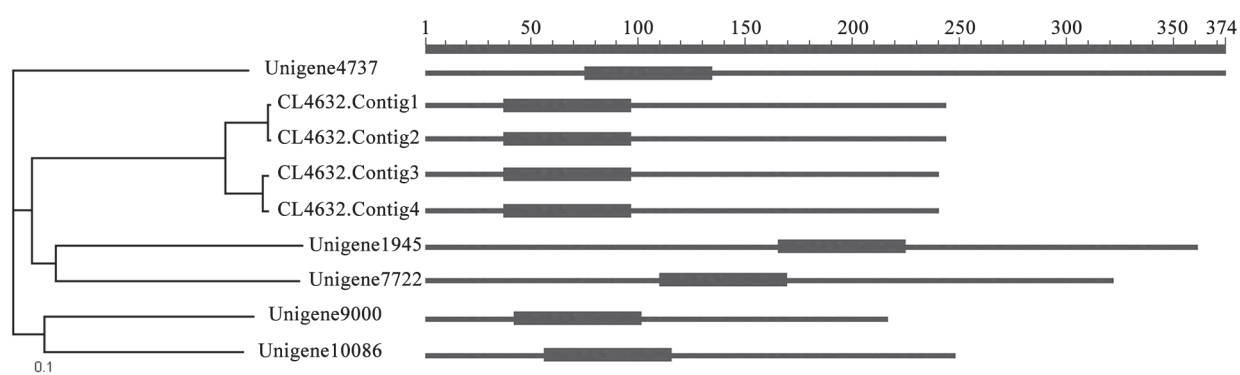


图3 小桐子CBF家族进化分析及AP2基序分布

Fig.3 AP2 motif distribution and phylogenetic analysis of CBF family in *J. curcas*

黑色长方形表示AP2基序的位置与长度。

同源性却很高。另外, 根据目前已经克隆和鉴定的其他高等植物CBF家族蛋白的序列长度都分布在200~250个氨基酸残基, 如拟南芥已经鉴定的CBF1~4氨基酸数目分别为213、216、216和224。结合与拟南芥CBF的序列相似性分析结果, 推测我们鉴定到的9条小桐子CBF转录因子中, CL4632.Contig1_JC-CK_1A与CL4632.Contig2_JC-CK_1A、CL4632.Contig3_JC-CK_1A与CL4632.Contig4_JC-CK_1A、Unigene9000_JC-CK_1A、Unigene10086_JC-CK_1A应该属于小桐子CBF家族成员。而另外的3条Unigenes序列虽然包含AP2基序, 但可能属于其他家族的蛋白。

通过序列相似性分析表明, 鉴定的9条小桐子CBF Unigenes序列除AP2基序区域外没有序列同源性, 将鉴定的9条小桐子CBF Unigenes序列与拟南芥的4条CBF序列的AP2基序区域氨基酸序列进行多序列比对。由图4可以发现, AP2基序区域都

由3条反平行的 β 折叠与1条 α 螺旋构成, 参与调控基因的上游启动子区结合, 3条 β 折叠氨基酸残基数目分别为4、8、8, 而1条 α 螺旋氨基酸残基数目为16, 且该数目在不同物种中相对保守。在 β 折叠1中, 第Val¹、Arg²及Arg⁴位氨基酸残基相对保守; 在 β 折叠2中, 第Glu⁵与Arg⁷位氨基酸残基相对保守; β 折叠3中, 第Arg²、Trp⁴、Leu⁵、Gly⁶、Thr⁷位氨基酸残基相对保守; 而在 α 螺旋中, 第Ala⁴、Ala⁵、Ala⁷、Asp⁹、Ala¹¹、Ala¹²位氨基酸残基相对保守。Stockinger等(1997)报道, CBF AP2基序的第2条 β 折叠的Val³、Glu⁵及Glu⁸起着识别特异DNA顺式作用元件的作用, 且Glu⁸的保守性较差, 所起作用小于Val³。但多序列比对发现, 在我们鉴定的CL4632.Contig1_JC-CK_1A、CL4632.Contig2_JC-CK_1A、CL4632.Contig3_JC-CK_1A及CL4632.Contig4_JC-CK_1A中Val³位置被Ala³替换, 两者同样属于非极性氨基酸, 但Glu⁵的保守性最强, 在识

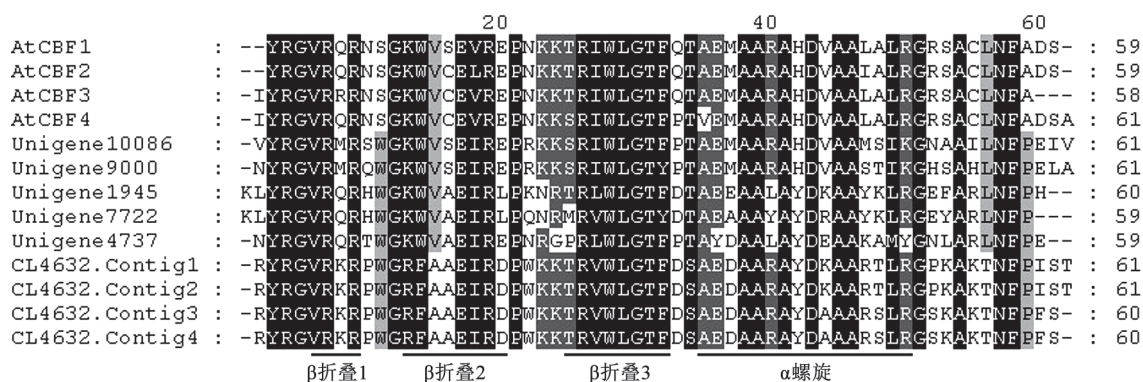


图4 小桐子CBF AP2基序氨基酸序列与拟南芥的多重序列比对

Fig.4 Sequence alignment comparison of CBF AP2 motif in *J. curcas* with *Arabidopsis*

别顺式作用元件中起更重要的作用。

利用克隆的小桐子 *JcCBF1* 基因 cDNA 序列, 对小桐子基因组数据库进行序列相似性检索, 得到该基因编码框上游 2 000 bp 的启动子序列, 并结合下游 729 bp 的编码框序列进行该基因的启动子序列分析。结果(图5)显示, 该序列具有真核生物典型启动子结构特征, 在翻译起始密码子上游不

同位置上分别存在着多达 19 个 TATA-box、10 个 CAAT-box、基因核心启动子序列 CACATG (用 A4 表示) 以及启动子重复序列 ACAATT (分别用 B1 和 B2 表示)。此外, 还含有众多应答胁迫与激素信号元件(图5-A), 如响应 MYC 的调控元件 CATGTG (用 A1 表示)、响应 MYB 的调控元件 PyAACT/GC (分别用 C1、C2、C3、C4 和 C5 表示)、响应 CBF 上



图5 小桐子 *JcCBF1* 基因启动子序列分析

Fig.5 Promoter analysis of *JcCBF1* gene in *J. curcas*

A: 小桐子 *JcCBF1* 基因上游启动子调控元件序列; B: 小桐子 *JcCBF1* 基因上游启动子调控元件结构分布。

游转录激活因子ICE的结合位点CAATTG与CA-CATG (用A2和A3表示), 说明小桐子*JcCBF1*基因可能参与多种逆境胁迫与激素的应答(图5-B)。

利用Phyre 2.0服务器构建了小桐子CBF1蛋白AP2基序三维空间结构。由图6-A可以看出, 其包含典型的AP2基序结构模型, 经过 β 折叠- β 折叠- β 折叠- α 螺旋二级结构顺序排列, 3条反向平行的 β 折叠构成主要的DNA结合区域, α 螺旋在外侧维持其空间结构, 其中第2条 β 折叠的52位Glu残基起主要的DNA结合作用。AP2基序主要结合在DNA的大

沟中, 并且该基序的3条反向平行 β 折叠的走向基本与DNA分子的中轴平行(图6-B)。CBF转录因子主要通过AP2基序与低温、干旱诱导基因启动子中的CRT (TGGCCGAC)/DRE (TACCGACAT)顺式作用元件结合, 从而激活基因的转录, 其核心碱基序列为CCGAC。推测位于AP2基序第2条 β 折叠2中部的Glu⁵²残基侧链酸性羧基-COO⁻基团与该DNA序列的中心碱基G的-NH₄⁺通过盐键结合, 从而启动COR基因的转录。

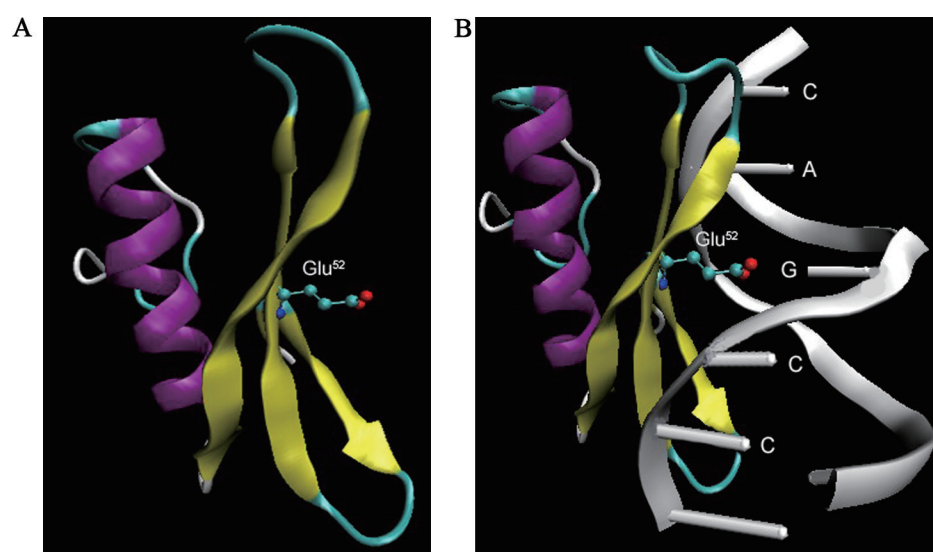


图6 小桐子*JcCBF1*基因AP2基序空间结构及与DNA结合模式

Fig.6 3D structure of AP2 motif and DNA binding model of *JcCBF1* in *J. cucas*

A: AP2基序结构图; B: AP2基序与DNA序列结合模式, 其中CCGAC表示CBF转录因子与低温、干旱诱导基因启动子结合的核心碱基序列。

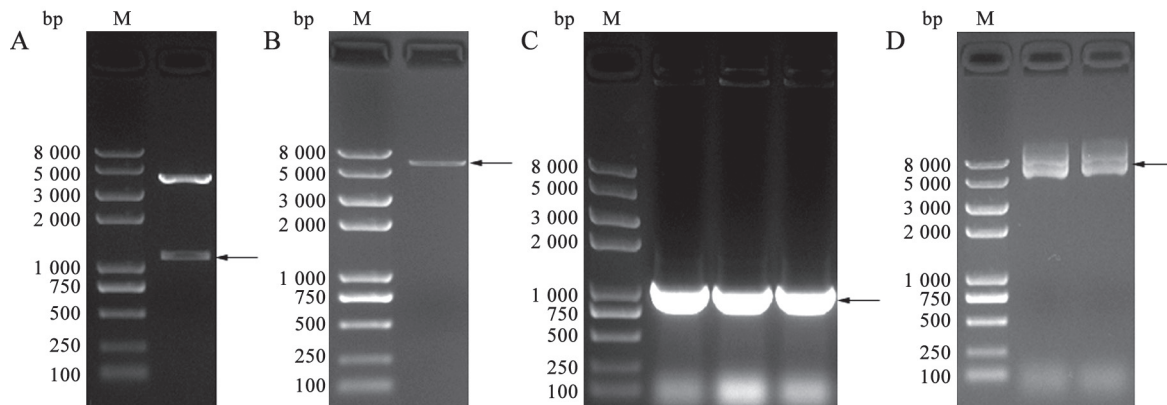
3 小桐子*JcCBF1*基因酵母表达载体的构建

将pEASY-T1-*JcCBF1*重组克隆质粒与酵母表达空质粒pYES2利用HindIII与XhoI双酶切, 切胶回收目的基因片段与pYES2载体片段, 并通过T4 DNA连接酶连接, 得到重组酵母表达质粒pYES2-*JcCBF1* (图7-A和B), 转化DH5 α 感受态细胞, 用基因全长引物进行菌落PCR验证, 得到了预期的分子量条带(图7-C), 送深圳华大基因测序确定没有点突变, 说明重组酵母表达质粒pYES2-*JcCBF1*已经构建成功。提取重组酵母表达质粒pYES2-*JcCBF1* (图7-D), 转化酿酒酵母INVScl1, 利用基因全长引物进行酵母菌落PCR检测显示该重组质粒已经成功转化酵母(图8), 为后续植物表达载体的构

建与抗逆性功能研究奠定了基础。

讨 论

植物不依赖ABA的低温信号转导途径主要集中在CBF基因调控的抗冷机制, 以拟南芥为研究对象, 其分子调控模式已经大致阐明。CBF类转录因子是感受上游传递的低温信号, 并将信号向下游传递的重要调控分子。拟南芥CBF转录因子家族包括4个成员, 即CBF1 (Stockinger等1997)、CBF2、CBF3 (Gilmour等1998)和CBF4 (Haake等2002), 属于DNA结合蛋白AP2/ERF家族, 都含有AP2 DNA基序 (Stockinger等1997)。CBF1与CBF2同源性81%、CBF1与CBF3同源性84%、CBF1与

图7 pYES2-*JcCBF1*重组质粒的构建Fig.7 Recombinant plasmid construction of pYES2-*JcCBF1*

A: *Hind*III与*Xho*I双酶切目的基因片段; B: *Hind*III与*Xho*I双酶切pYES2; C: 重组质粒转化DH5 α 后菌落PCR验证; D: 提取的重组质粒pYES2-*JcCBF1*。

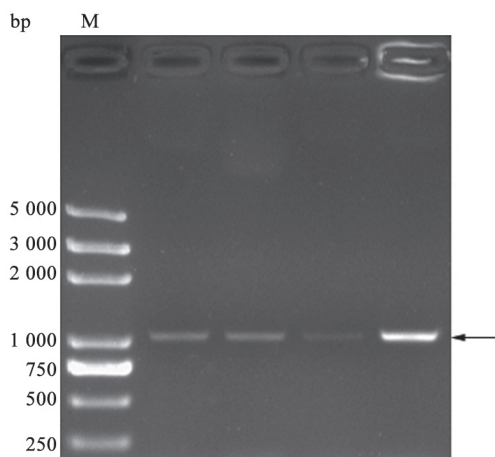


图8 转pYES2-*JcCBF1*重组酵母INVSc1的PCR验证
Fig.8 PCR identification of the pYES2-*JcCBF1* recombinant INVSc1

*CBF4*同源性64%，但4种*CBF*氨基酸序列中组成AP2基序的氨基酸的序列相似性达到了91%~94% (Haake等2002)。来自拟南芥、油菜、小麦、黑麦和番茄的*CBF*蛋白还含有两段保守多肽序列，即PKK/RPAGR_xKF_xETRHP序列，位于AP2基序上游，可能与*CBF*的运输有关；DSAWR序列位于AP2基序下游，其功能未知(Jaglo-Ottosen等2001)。经DNA序列分析表明，*CBF1*、*CBF2*及*CBF3*基因的读码框中均不含内含子，启动子中都有核心序列CANNTG (被bHLH蛋白基序结合)与一个重复序列ACAATTANNACAATTT，且位置基本相同，这意味着极有可能是核心启动子序列(Gilmour等

1998)。另外，启动子中还含有其他核心转录激活因子结合位点，如ICE盒(ICEr1，核心序列：TTCA-CACGTGACTC；ICEr2，核心序列：TCTAGA；ICEr3，核心序列：HACACGT；ICEr4，核心序列：HCCACGT) (H指A/C/T) (Induction of *CBF* expression region1 and 2)、MYBRS及MYCRS等。

*CBF*基因本身是低温诱导的，即*CBF*的表达受到上游调控。其中ICE是主要的*CBF*转录激活因子。作为*CBF*正调控因子，ICE属于MYBR/MYCR类家族，都含有bHLH (basic helix-loop-helix) DNA结合基序，是直接结合*CBF*启动子中ICE盒并调控*CBF*表达的上游信号(Ruelland等2009)。另外*CBF*的表达还受到ZAT12 (锌指结构蛋白，负调控因子) (Vogel等2005)、STRS (负调控) (Kant等2007)、FVE (负调控) (Kim等2004)、FIERY2 (负调控) (Xiong等2002)、LOS4 (正调控) (Gong等2002)以及同家族蛋白如拟南芥*CBF2* (负调控) (Novillo等2004)等因子的调控。Yamaguchi-Shinozaki等(1992)采用示差筛选法，鉴定出*CBF*转录因子作用的下游COR (cold response)基因的启动子中存在的9 bp (TACCGACAT)干旱应答DRE元件。同时，Baker等(1994)从拟南芥低温应答基因COR15A的启动子中鉴定到与DRE极为相似CRT元件(TG-GCCGAC)，CRT/DRE元件位于COR基因启动子中，植物低温诱导后，*CBF*基因表达产物的AP2基序与CRT/DRE元件结合，激活COR基因表达，从而激活一系列抗冷相关代谢途径蛋白的表达。

*CBF*的表达受到多种外界信号与细胞内的转录激活因子调节,且不同的*CBF*其表达动力学也完全不同。在拟南芥中,低温锻炼15 min即可诱导*CBF1~3*的大量表达,2 h达到表达的高峰,之后开始下降,但表达量始终大于常温对照植株(Gilmour等1998)。另外,*CBF*基因的表达还因所在器官或生长阶段的不同而有所差异。Zhao等(2009)对番茄的不同器官进行*CBF*表达峰值的研究发现,番茄*CBF1*在幼苗期受到低温胁迫后,在2 h时出现*CBF1*的表达高峰期,而绿熟期的果实在受到低温胁迫后,在2与16 h各出现一个表达高峰。葡萄的*CBF1~3*在低温条件下,新生组织中较老组织中表达量高(Xiao等2006)。部分研究还报道,*CBF*基因的表达还受到植物生物钟(Fowler等2005)、光照条件(Kim等2002)以及水杨酸(张俊环等2014)等的影响。本研究中,我们克隆的小桐子*CBF*家族*Jc-CBF1*基因,根据DEG分析结果显示,在12 °C低温锻炼条件下,其表达量随着低温时间的延长表现出先升高后降低的变化趋势,且低温锻炼12 h时就达到了表达高峰,之后逐渐下降(Wang等2014),这也与许多文献报道的*CBF*基因表达高峰出现在12 h内的结论相一致(Gilmour等1998)。

参考文献

何璐,虞泓,范源洪,沙毓沧,袁理春(2010). 麻疯树(*Jatropha curcas* L.)植物学研究进展. 长江流域资源与环境, 19 (Z1): 120~127

李忠光,龚明(2010). 不同化学消毒剂对小桐子种子萌发和幼苗生长的影响. 种子, 30 (2): 4~7, 12

林娟,周选围,唐克轩,陈放(2004). 麻疯树植物资源研究概况. 热带亚热带植物学报, 12 (3): 285~290

潘志贤,纪中华,方海东,杨艳鲜,廖承飞(2008). 金沙江干热河谷退化旱坡地小桐子造林关键技术. 云南农业科技, (4): 41~42

王海燕,文明富,刘石生,王文泉(2010). 麻疯树生物学研究进展及其开发利用. 热带作物学报, 31 (4): 670~675

吴国江,刘杰,娄治平,康乐(2006). 能源植物的研究现状及发展建议. 中国科学院院刊, 21 (1): 53~57

张俊环,王玉柱,孙浩元,杨丽,姜凤超(2014). 外源水杨酸对低温下杏花抗氧化酶和*CBF*转录因子表达的影响. 植物生理学报, 50 (2): 171~177

张明生,樊卫国,尹杰,李金强,袁启凤,杨永华(2005). 麻疯树资源概况及其开发利用. 贵州农业科学, 33 (6): 97~98

曾觉民(2006). 可大力发展的生物质能源植物——膏桐. 云南林业, 27 (2): 21~22

Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant Mol Biol, 24 (5): 701~713

Fowler SG, Cook D, Thomashow MF (2005). Low temperature induction of *Arabidopsis CBF1*, 2, and 3 is a gated by the circadian clock. Plant Physiol, 137 (3): 961~969

Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ (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 (4): 433~442

Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 99 (17): 11507~11512

Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Michael F (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 130 (10): 639~648

Jaglo-Ottosen KR, Klef S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway a conserved in *Brassica napus* and other plant species. Plant Physiol, 127 (3): 910~917

Kant P, Kant S, Gordon M, Shaked R, Barak S (2007). *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1* and *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2*, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. Plant Physiol, 145 (3): 81~830

Kim HJ, Hyun Y, Park JY, Park MJ, Park MK, Kim MD, Kim HJ, Lee MH, Moon J, Lee I et al (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. Nat Genet, 36 (2): 167~171

Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J (2002). Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (*C/DRE*) in *Arabidopsis thaliana*. Plant, 29 (6): 693~704

Novillo F, Jose M, Alonso, Joseph R, Ecke, Salinas J (2004). *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *BF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Biol, 101 (11): 3885~3900

Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. Adv Bot Res, 49: 35~125

Stockinger ET, Gilmour ST, Thomashow MF (1997). *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. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (3): 1035~1040

Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF (2005). Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. Plant J, 41 (2): 195~211

Wang HB, Zou ZR, Wang SS, Gong M (2013). Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L.. PLoS ONE, 12: e82817

Wang HB, Zou ZR, Wang SS, Gong M (2014). Deep sequencing-based transcriptome analysis of the oil-bearing plant *Physic Nut (Jatropha curcas L.)* under cold stress. Plant Omics, 7 (3):

- 178~187
- 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 (7): 1410~1421
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhu JK (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (16): 10899~19904
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, 33 (3): 217~224
- Zhao D, Shen L, Fan B, Yu M, Zheng Y, Lv S, Sheng J (2009). Ethylene and cold participate in the regulation of *LeCBF1* gene expression in post harvest tomato fruits. *FEBS Lett*, 583 (20): 3329~3334
- Zhou MQ, Shen C, Wu LH, Tang KX, Lin J (2011). CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants. *Crit Rev Biotechnol*, 31 (2): 186~192