

胡杨 CBF 基因克隆及冷胁迫下的表达分析

张冲, 夏新莉, 尹伟伦, 陈金焕

(北京林业大学林木育种国家工程实验室, 北京 100083;

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: CBF(C-repeat binding transcription factor/ dehydrate responsive element binding factor, DREB) 基因是植物 CBF 抗冷途径的枢纽, 主要调控下游大量抗冷基因的表达, 对增强植物的抗冷能力极为重要。通过以胡杨总 RNA 为模板, 分别克隆得到 PeCBF4a、PeCBF4b、PeCBF4c 和 PeCBF2 四个 CBF 基因。利用进化分析和序列分析发现四个 PeCBF 基因属于 DREB 亚家族 A1 组成员, PeCBF4a、PeCBF4b 与拟南芥中的 AtDREB1B、AtDREB1A 和 AtDREB1C 具有较高的同源性, PeCBF4c 和 PeCBF2 与拟南芥中的 AtDREB1E、AtDREB1F 具有很高的同源性。在冷胁迫表达分析发现, PeCBF4a、PeCBF4b、PeCBF4c 和 PeCBF2 都诱导冷胁迫表达, 参与调节植物抗冷机制。对胡杨 PeCBF 基因的序列分析和表达分析, 有助于胡杨抗逆性机制的进一步研究。

关键词: CBF 基因; 转录因子; 进化分析; 表达分析

Cloning and cold responsive expression analysis of CBF genes in *Populuseuphratica*

ZHANG Chong, XIA Xinli, Yin Weilun, CHEN Jinhuan

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: CBF(C-repeat binding transcription factor/ dehydrate responsive element binding factor, DREB) is a hub of cold tolerance pathways in plants. CBF can improve cold tolerance of plants by regulating numerous cold responsive genes downstream. In our study, we cloned four CBF genes (PeCBF4a, PeCBF4b, PeCBF4c and PeCBF2) using total RNA of *Populuseuphratica* as a template. Four PeCBF genes obtained belong to members of DREB subfamily A1 by phylogenetic analysis and sequence analysis. PeCBF4a and PeCBF4b have high homology with AtDREB1B, AtDREB1A and AtDREB1C in *Arabidopsis thaliana*. PeCBF4c and PeCBF2 have high homology with AtDREB1E and AtDREB1F. PeCBF4a, PeCBF4b, PeCBF4c and PeCBF2 were significantly induced in response to cold stress by expression analysis, suggesting that they participated in regulation of cold response mechanism. In conclusion, our results are helpful for further study in mechanism of stress resistance in *Populuseuphratica*.

Keywords: CBF gene;transcription factor;evolutionary analysis; expression analysis

0 引言

低温、盐碱、水涝等非生物逆境是影响植物生长发育的主要因素, 植物受到逆境胁迫时, 会通过多种途径来适应调节反应以降低或消除危害。CBF(C-repeat binding factor)是一类与逆境胁迫相关的转录因子, 含有一个 AP2/EREBP 结构域, 负责与 DRE(Dehydration-Responsive Element)/CRT(C-repeat) 元件的结合, 从而实现 DREB 转录因子对一系列干旱、高盐和低温应答基因的调控。CRT/DRE 元件位于受低温或干旱调控的 RD/COR(responsive to dehydration/cold-regulated)基因的启动子区, 通过与 CBF 转录因子结合参与非生物胁迫响应

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20110014120003)

作者简介: 张冲(1993-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 林木育种

通信联系人: 陈金焕(1981-), 副教授、硕导, 主要研究方向: 林木育种. E-mail: chenjh@bjfu.edu.cn

[1,2]。最新研究表明,在逆境胁迫条件下,信号传导过程中的关键基因,如 CBF 转录因子等能够调控许多功能基因的表达[2-4]。Stockinger 等[5](1997)用酵母单杂交的方法从拟南芥中分离得到了能与 CRT/DRE 结合的转录因子,命名为 CBF1,并通过酵母单杂交实验证明该基因的蛋白表达产物可以和具有 CRT/DRE 元件的基因结合。

在拟南芥中,DREB 分为 6 个亚家族(A1~A6),其中 A1 组 DREB1 类受低温诱导,而 A-2 组的 DREB2 类受干旱和高盐的诱导,A1 组的 *DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C* 在调控冷响应基因的表达起着重要作用,*DREB1D* 与 *DREB1A* 具有很高的同源性但不被冷诱导,另外 2 个基因 *DREB1F* 和 *DREB1E* 能够被高盐诱导而不受到冷诱导。拟南芥中与逆境相关的 DREB 转录因子可分为 DREB1/CBF 和 DREB2 两类,DREB1 也被认为是 CBF 家族[6],其中 CBF 类成员主要参与低温胁迫应答反应,DREB2 类成员则主要参与干旱胁迫应答反应[7]。在植物抗冷过程中通过 CBF 转录因子调控大量下游抗冷基因的表达来提高植物抗冷能力[8]。在拟南芥、番茄、水稻、桉树等多种植物研究中发现,CBF 对植物的抗冷能力具有调节作用[9-12]。

综上,CBF 基因参与调节多种非生物胁迫,其主要参与低温胁迫反应调节,发挥着重要的调节作用。胡杨是沙漠地区唯一可以建群的乔木树种,不但具有极强的耐旱和耐盐碱能力,还能够忍受 40℃ 以上以及零下 35℃ 以下的极端温度,被认为是研究木本植物非生物胁迫抗逆性的模式植物。本研究通过克隆 *PeCBF4a*、*PeCBF4b*、*PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 四个 CBF 基因,对其核苷酸序列进行分析,以及在冷胁迫下的表达分析,为进一步研究胡杨的抗冷机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

所用胡杨取自北京林业大学苗圃,两年生盆栽胡杨放入室内 2 个月后长出新叶取材,用于 *PeCBF* 克隆和序列分析。将材料放入 4℃ 培养箱处理 0、1、3、6、9 h 和 12h,取各个处理时间点的叶片 20 片左右液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 实验试剂

质粒小提试剂盒、反转录试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、RNA 提取试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司。本试验所用本试验所用 2×PCR Mix 购自北京擎科新业生物技术有限公司,PCR 引物合成及 DNA 测序工作由生工生物工程(北京)股份有限公司完成。

1.3 cDNA 制备

胡杨总 RNA 提取步骤按照天根生化科技(北京)有限公司的多糖多酚总 RNA 提取试剂盒说明书进行。第一链 cDNA 的合成参照 TIANScriptcDNA 第一链合成试剂盒说明书进行。

1.4 四个 *PeCBF* 基因的克隆

利用 DNAMA6.0 软件设计引物,*PeCBF4a* 上游引物: ATGGATGTTTTCTGTAGTTAT,下游引物: TTAAACAGAAAACTCCATA; *PeCBF4b* 上游引物: ATGCCCAATGACAGGCAA,下游引物: CTAATAACTCCATAACGACAAATC; *PeCBF4c* 上游引物: ATG

CCCAATGACAGGCAAGA, 下游引物: CTAATAACTCCATAACGACAA; *PeCBF2* 上游引物: ATGGTCATGGGAGGATCAAA, 下游引物: TTAATACTCCACAACGACCAA。PCR 反应体系为 25 μ L: 2 \times PCR Mix 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L; PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 12 $^{\circ}$ C 保存。之后通过配制 1% 的琼脂糖凝胶将 PCR 产物电泳分离, 然后用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段。

1.5 生物信息学分析

进化树构建是以序列的多重比较结果为基础, 采用 ClustalX 软件进行拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和棉花(*Triticum aestivum*)等物种多重比较后, 利用 MEGA6.0 软件构建系统进化树, 进化树采用 NJ(Neighbor-Joining)邻接算法, 将 Bootstrap 值设为默认值 1000 重复。

1.6 荧光定量 RT-PCR 分析

将 4 $^{\circ}$ C 冷处理的胡杨材料在不同时段 (0、1、3、6、9 和 12h) 分别取样, 提取样品 RNA 并合成 cDNA 第一链, 采用荧光定量 PCR 法检测目的基因不同时段表达情况。按照荧光定量 RT-PCR 引物设计原则在 3' 区设计特异引物, 分别是 *PeCBF4a*-F(5'-AAAGGAGTTCAACCAGGTGC-3') 和 *PeCBF4a*-R(5'-TCACAAACCCACTTACCCG-3'); *PeCBF4b*-F(5'-GAGGTGAGTTGATGAGGACG-3') 和 *PeCBF4b*-R(5'-TGAGGTGGTGGCAATAACA-3'); *PeCBF4c*-F(5'-TCTTTCTCCGATAGCAGCAC-3') 和 *PeCBF4c*-R(5'-TGTTACCATTCCTCTCCGA-3'); *PeCBF2*-F(5'-ATTCAAGGAGACTCGTCATCC-3') 和 *PeCBF2*-R(5'-CGCCAAAGCAGCTACATC-3'); 内参基因为 *PeActin* 基因, 上下游引物分别为 *Actin*-F (5'-GTCCTCTTCAGCCATCTC-3') 和 *Actin*-R (5'-TTCGGTCAGCAATACCAGG-3'), 标准品 cDNA 和待测样品均设置 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 *PeCBF* 基因克隆以及序列分析

将 PCR 扩增产物进行测序, *PeCBF4a*、*PeCBF4b*、*PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 四个 *CBF* 基因长度分别为 747、759、672 和 696bp, Genbank 登录号分别为 KC345750、KC345751、KC345752、KC345753。

利用 ProtParam 分析四个 *CBF* 基因的理化性质, 发现 *PeCBF4a* 基因编码的蛋白质分子量为 59.89kD, 理论等电点为 5.21; *PeCBF4b* 基因编码的蛋白质分子量为 60.33kD, 理论等电点为 5.21; *PeCBF4c* 基因编码的蛋白质分子量为 54.74kD, 理论等电点为 5.17; *PeCBF2* 基因编码的蛋白质分子量为 56.13kD, 理论等电点为 5.18。

2.2 2 四个 *PeCBF* 基因编码的氨基酸序列比对分析

将四个 *PeCBF* 基因的编码蛋白质在 NCBI 生物学网站进行蛋白质同源比对(BLASTp), 以及利用 DNAMAN6.0 软件进行胡杨 *PeCBF* 和烟草、拟南芥等物种 *CBF* 氨基酸序列的多重比较, 鉴定相应的四个蛋白具有的保守域。如图 1 和 2 所示, 四个 *PeCBF* 都具有 *CBF* 蛋白典型的结构域, 包含 1 个 AP2 结构域、2 个 *CBF* 特征基序, PKKR/PAGR 和 DSAWR 基序。

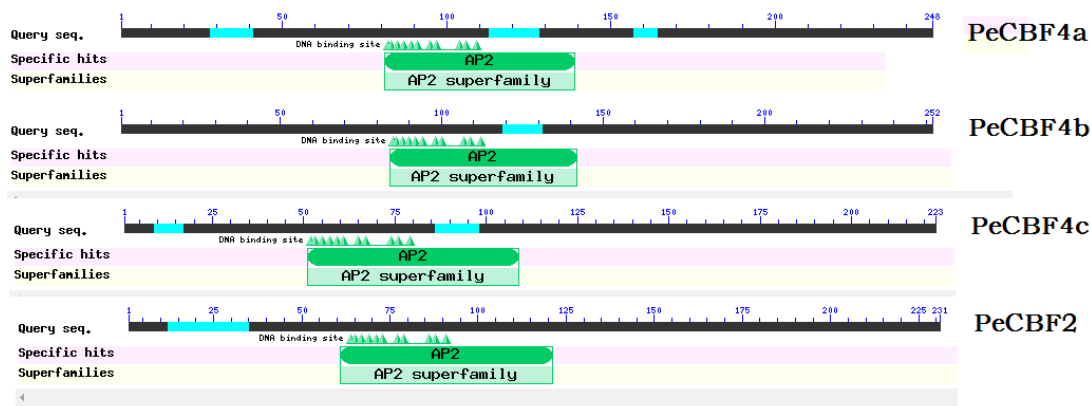


图 1 四个 *PeCBF* 中含有的保守结构域
Fig.1 Conserved domain in four *PeCBF*

120

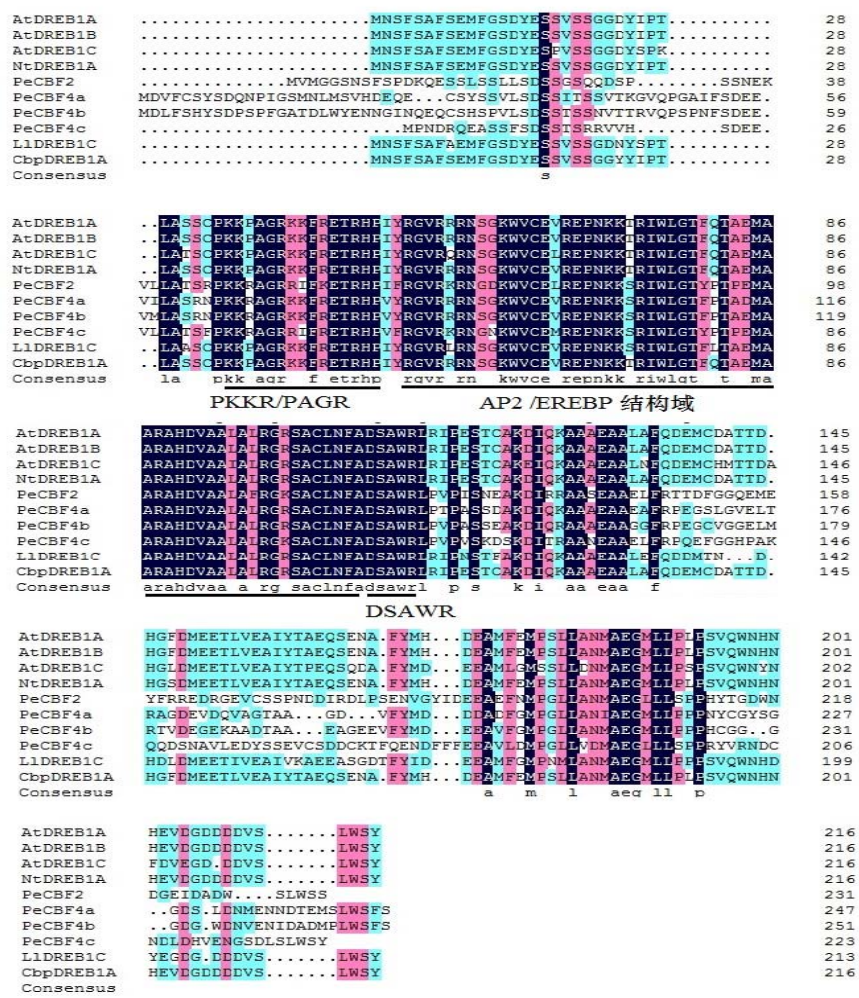


图 2 胡杨 *PeCBFs* 和其他物种 *CBF* 氨基酸序列的多重比较

Fig. 2 Multiple comparison of amino acid sequence of *PeCBFs* with *CBFs* from other species

注: 多重比较采用 DNAMAN6.0 软件进行; 图中为胡杨 *PeCBF4a*、*PeCBF4b*、*PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 氨基酸序列; 拟南芥 *AtDREB1B*、*AtDREB1A* 和 *AtDREB1C* 氨基酸序列; 烟草 *NtDREB1A* 氨基酸序列; 宽叶独行菜 *LlDREB1C* 氨基酸序列; 芥菜 *CbpDREB1A* 氨基酸序列; 划线部分为 AP2/EREBP 结构域、DSAWR 和 PKKR/PAGR 基序

125

2.3 信号肽的预测、跨膜结构以及亚细胞定位分析

利用 SignalIP4.0 在线软件对四个 PeCBF 蛋白进行信号肽预测。预测结果显示，PeCBF4a 的 C 值为 0.110，Y 值为 0.105，S 值为 0.109；PeCBF4b 的 C 值为 0.110，Y 值为 0.109，S 值为 0.115；PeCBF4c 的 C 值为 0.115，Y 值为 0.108，S 值为 0.148；PeCBF2 的 C 值为 0.111，Y 值为 0.110，S 值为 0.138(图 3)。这四个 PeCBF 蛋白不含有信号肽区域（分数大于 0.450 表示具有信号肽）。

通过在线软件 TMPred 预测四个 PeCBF 蛋白的跨膜结构，结果显示，PeCBF4a 的分数分别为 229、204；、PeCBF4b 的分数分别为 126、102；PeCBF4c 的分数分别为 0、0；PeCBF2 的分数分别为 37、0。PeCBF4a 和 PeCBF4b 蛋白可能存在 2 个跨膜结构域(图 4)，其中一个为由内向外的跨膜结构域，一个由外向内的跨膜结构域，PeCBF4c 蛋白可能不存在跨膜结构域，PeCBF2 蛋白可能存在一个由内向外的跨膜结构域(分数大于 500 为显著的跨膜结构域)。

利用在线分析工具 WoLF PSORT，对进行亚细胞可能定位进行预测分析。结果显示，PeCBF4a 、PeCBF4b 、PeCBF4c 和 PeCBF2 靶向细胞核（nuclear）这四个 PeCBFs 亚细胞定位都可能在细胞核。

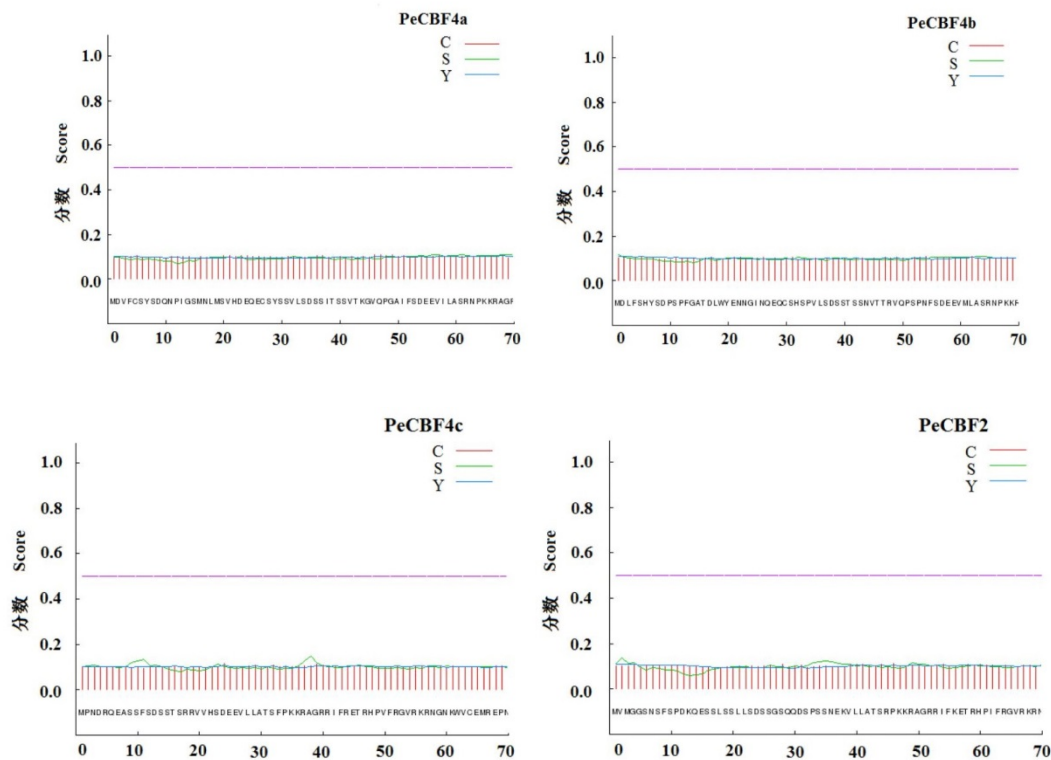


图 3 PeCBF4a 、PeCBF4b 、PeCBF4c 和 PeCBF2 蛋白信号肽的预测
Fig.3 Prediction of signal peptides inPeCBF4a、PeCBF4b、PeCBF4c and PeCBF2 proteins
注: C: 原始剪切位点分值; S: 信号肽分值; Y: 综合剪切位点分值

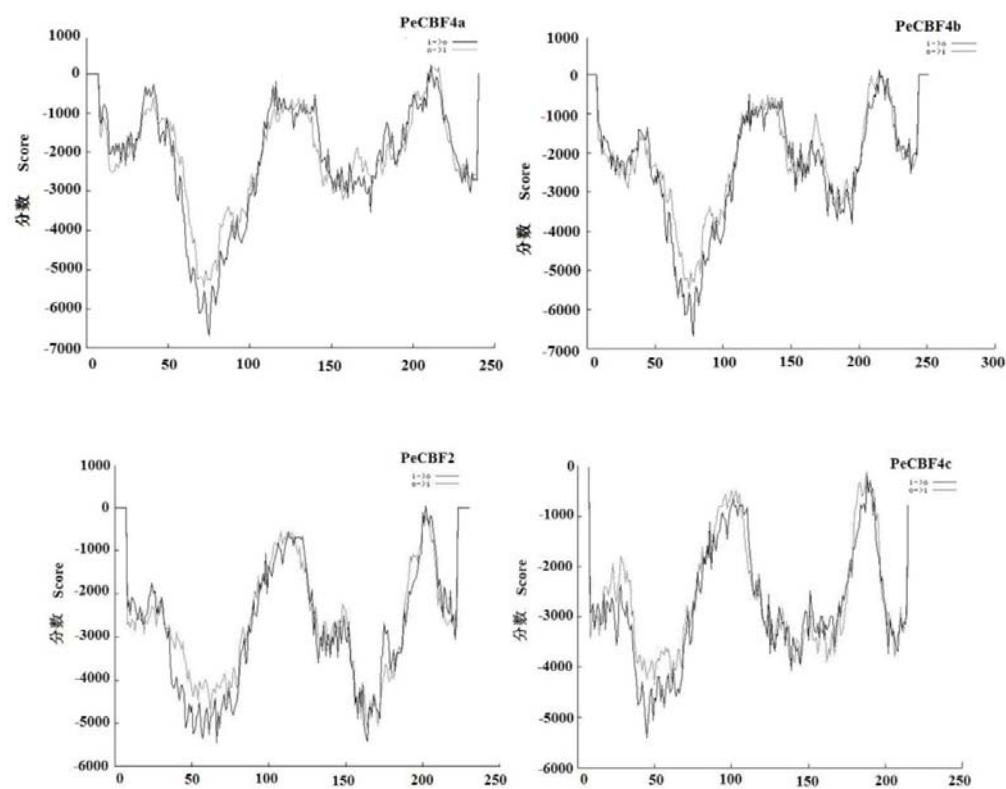


图 4 PeCBF4a 、 PeCBF4b 、 PeCBF4c 和 PeCBF2 蛋白跨膜结构域预测
Fig. 4 Prediction of transmembrane domain inPeCBF4a 、 PeCBF4b 、 PeCBF4c andPeCBF2proteins

2.4 四个胡杨 *PeCBF* 蛋白的系统进化分析

进化树分析表明，这四个 *PeCBF* 基因的属于 DREB 亚家族的 A1 组(图 5)。利用 DNAMAN6.0 和 MEGA6.0 软件，将四个 *PeCBF* 基因与水稻、拟南芥、玉米和棉花等物种的 DREB 基因进行序列比对和系统进化分析。结果表明，PeCBF4a、PeCBF4b 与拟南芥中的 AtDREB1B、AtDREB1A 和 AtDREB1C 具有较高的同源性并聚类在一起，PeCBF4c 和 PeCBF2 与拟南芥中的 AtDREB1E、AtDREB1F 具有很高的同源性。

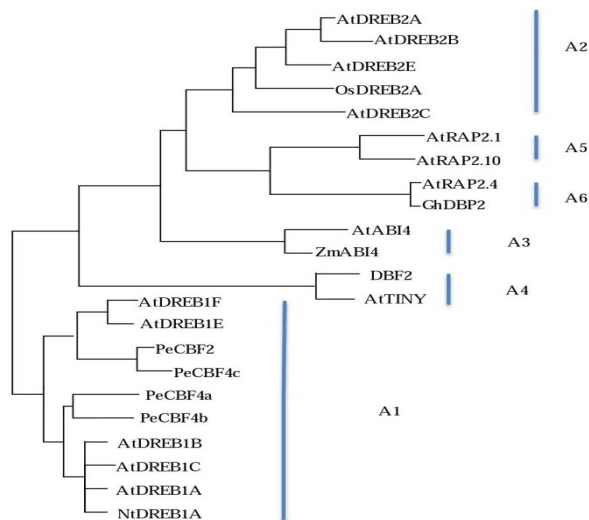


图 5 PeCBF4a、PeCBF4b、PeCBF4c 和 PeCBF2 与其他 DREB 的进化分析
Fig.5 Phylogenetic analysis of PeCBF4a、PeCBF4b、PeCBF4c and PeCBF2with other representative DREBs

2.5 胡杨 *PeCBF* 基因的冷诱导表达分析

通过定量 PCR 分析发现,在对照处理下,四个 *PeCBFs* 均不表达或表达极微弱,低温处理可以诱导四个 *PeCBFs* 的表达,并且表达量随时间推移而不断升高,*PeCBF4a* 和 *PeCBF4b* 处理 9 h 后可以检测到表达量达到最高值,*PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 处理 6 h 后表达量达到最高值,随后表达量开始逐渐降低。通过表达分析发现,通过表达分析发现 *PeCBF4a* 在低温胁迫下诱导最为强烈,表达量达到未处理下的 160 倍左右,*PeCBF2* 被低温诱导程度最弱,但依然达到未处理状态的 20 倍以上,说明四个 *PeCBFs* 均被低温胁迫强烈诱导,在胡杨冷胁迫反应中具有重要功能(图 6)。

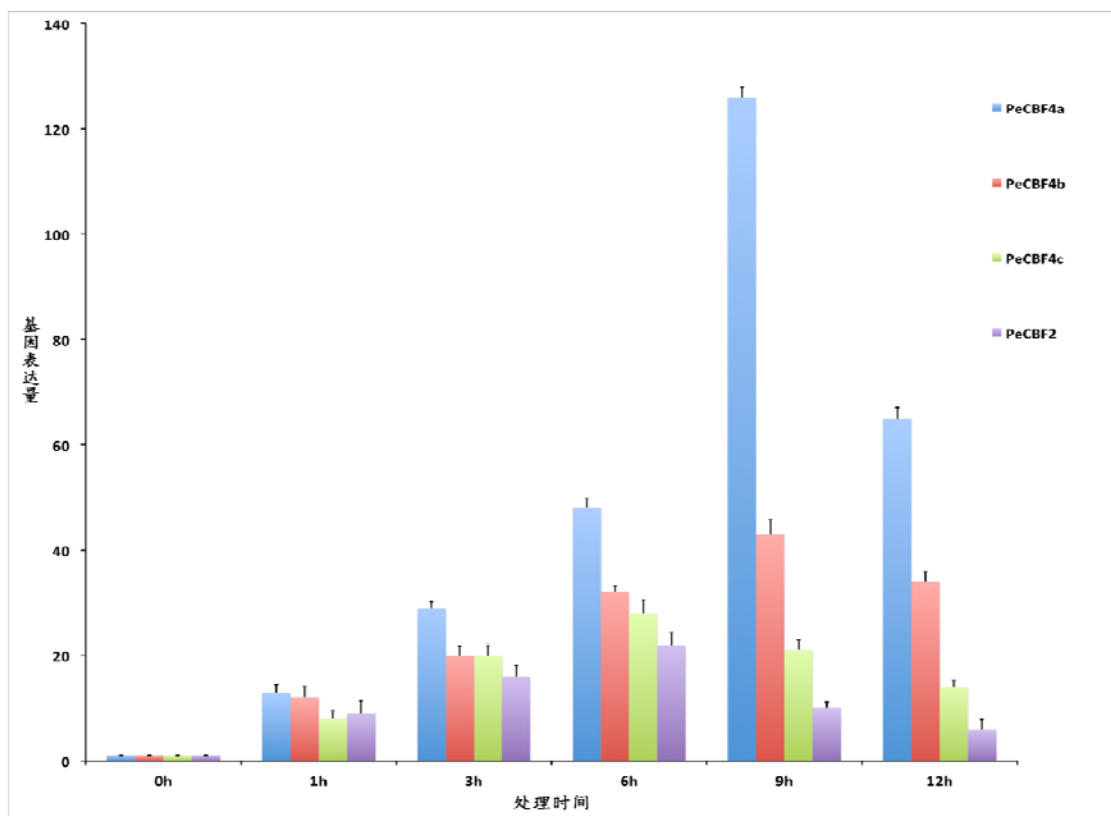


图 6 胡杨 *PeCBF* 基因在 4℃ 低温胁迫下表达量的变化

Fig. 6 The expression change of *PeCBFs* under 4℃ low temperature

3 讨论与结论

胡杨是沙漠中唯一能够成林的高大乔木,具有很强的抗逆能力,是研究木本植物的模式物种。本研究通过基因克隆得到四个 *PeCBF* 基因,分别命名为 *PeCBF4a*、*PeCBF4b*、*PeCBF4c* 和 *PeCBF2*。CBF 转录因子能与 CRT/DRE/LTR 顺式作用元件特异结合,并激活启动子中含有该调控元件的冷诱导基因的表达,从而调节寒冷信号传导和蛋白表达,增强植物抗寒性。通过氨基酸序列比较发现,这四个 *PeCBF* 基因具有同一个保守结构域,包含了一个 AP2 结构域,以及 DSAW 的保守序列和羧基末端的 LWSY 保守序列。这个保守结构域是 CBF 所特有的特征序列,说明 *PeCBF* 基因属于 DREB 亚家族 A1 组成员,而进化树分析也证明了这一点。研究发现四个 *PeCBF* 基因都不具有信号肽,同时 *PeCBF* 蛋白跨膜预测发现 *PeCBF4a* 和 *PeCBF4b* 蛋白可能存在 2 个跨膜结构域,而 *PeCBF4c* 蛋白可能不存在跨膜结构域,*PeCBF2*

蛋白可能存在于一个由内向外的跨膜结构域，四个 *PeCBF* 亚细胞定位都定位在细胞核中。在将拟南芥、玉米等多个物种的 *DREB* 基因与胡杨 *PeCBF* 进行进化分析，发现 *PeCBF* 基因属于 *DREB* 亚家族 A1 组成员，同时 *PeCBF4a* 和 *PeCBF4b* 与 *AtDREB1B*、*AtDREB1A* 和 *AtDREB1C* 具有较高同源性，*PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 与拟南芥中的 *AtDREB1E*、*AtDREB1F* 之间也具有很高的同源性，它们可能具有相同的基因功能。

低温胁迫下 *PeCBFs* 基因的表达，在 6 h 或 9h 后达到高峰，而低温 15 min 即可诱导 *AtCBF1~3* 基因的表达，2h 后达到表达高峰，随后下降，但在前 24h 均高于室温下植株中的表达量^[13]，说明 *CBF* 基因家族成员在不同种类植物中表达动力学特征不同。*PeCBF4a* 和 *PeCBF4b* 在冷胁迫下强烈表达，调节植物抗冷，而 *AtDREB1B*、*AtDREB1A* 和 *AtDREB1C* 在冷胁迫下强烈表达，发挥着重要的调节作用，说明 *PeCBF4a* 和 *PeCBF4b* 是调节植物抗冷的重要的转录因子。另外 *PeCBF4c* 和 *PeCBF2* 在冷胁迫下进行少量的表达，可能也参与调控冷响应基因。通过四个 *PeCBF* 的基因克隆和进化分析、表达分析，探索胡杨 *CBF* 基因的调控抗逆的机制，进一步有助于胡杨抗逆机制研究。

[参考文献] (References)

- [1]YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel *cis*-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. The Plant Cell, 1994, 6: 251–264.
- [2]LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an AP2/EREBPDNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and-low-temperature-responsive gene expression in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 1998, 10:1391–1406.
- [3]张丽丽, 李景富, 王傲雪.转录激活因子 CBF 基因在植物抗冷分子机制中的作用[J]. 园艺学报, 2008, 35 (5): 765-771.
- [4]MORRANS, EINI O, PYVOVARENKO T, PARENT B, LOPATO S.Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors[J]. Plant Biotechnology Journal.2011, 9(2): 230–249.
- [5]STOCKINGER E J, GILMORE S J, THOMAS 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(3): 1035–1040.
- [6]NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, SHINSHI H.Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice[J]. Plant Physiology, 2006, 140:411–432.
- [7]SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G,et al. DNA-binding specificity the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs,transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2002, 290(3): 998-1009.
- [8]FOWLER S, THOMAS M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J]. The Plant Cell, 2002, 14(8): 1675–1690.
- [9]ZHANG X, FOWLER S G, CHENG H, et al. Freezing-sensitive tomato as a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2004, 39(6): 905–919.
- [10]ITO Y, KATSURAKI K, MURAYAMA K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(1): 141–153.
- [11]ZHAO T J, SUN S, LIU Y,et al. Regulating the drought-responsive element (DRE) -mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in Brassica napus[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(16): 10752–10759.
- [12]N AVARRO M, MARQUE G, AYAX C, et al. Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes

under various cold conditions[J].Journal of Experimental Botany , 2009, 60(9): 2713–2724.

[13]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] . The Plant Journal, 1998, 16(4) : 433–442.