

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.031

麻疯树 *JcCBF3* 基因的克隆及其抗寒功能初探

严 君, 孙 焕, 王雪华, 魏 炜

(四川大学生命科学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 从麻疯树中克隆到一个 CBF3 基因, 命名为 *JcCBF3*, ORF 全长 678bp, 编码 225 个氨基酸; 氨基酸序列同源性比对结果显示 *JcCBF3* 与其他物种 CBF 序列具有较高的同源性, 与木薯和橡胶树的相似度最高, 达到 79% 和 74%。RT-qPCR 结果表明低温胁迫 12h 后 *JcCBF3* 基因的表达量达到峰值, 为对照的 62 倍。将 *JcCBF3* 构建到植物过表达载体 pBI121 上并成功转化烟草。低温处理下转基因烟草幼苗的游离脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性的增幅均大于野生型烟草, 并且 *JcCBF3* 基因的过表达增强了含有 CRT/DRE 元件的下游抗性基因的表达。

关键词: 麻疯树; *JcCBF3*; RT-qPCR; 转基因烟草; 抗寒性

中图分类号: Q94 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2016)06-1369-06

Cloning of *JcCBF3* gene in *Jatropha curcas* and its functional analysis of cold tolerance

YAN-Jun, SUN-Huan, WANG Xue-Hua, WEI-Wei

(Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: A CBF3 gene was isolated from *Jatropha curcas* named *JcCBF3*. The full length of open reading frame(ORF) was 678 bp, encoding 225 amino acids. The amino acids sequences also had highly homologous with CBF genes of other plants, reached 79% with *Manihot esculenta*, and 74% with *Hevea brasiliensis* respectively. RT-qPCR results revealed that after 12 hours, the transcriptional level of *JcCBF3* raised maximum 62 folds than the control. *JcCBF3* was constructed into plant expression vector pBI121 and obtained the transgenic tobacco plants. At the low temperature treatment, free proline and superoxide dismutase in transgenic tobacco were higher than those of normal tobacco plant. Overexpression of *JcCBF3* in transgenic tobacco plants enhanced the expression of downstream genes containing CRT/ DRE elements.

Keywords: *Jatropha curcas*; *JcCBF3*; RT-qPCR; transgenic tobacco; cold resistance

1 引言

植物在自然环境中会遭遇许多非生物胁迫因子, 如低温、干旱、盐碱以及外源 ABA, 导致植物生

长发育和作物产量受到限制。近年来, 人们已分离到许多抗寒相关基因^[1,2], 但将这些基因分别转入植物中却很难从根本上改善植物的抗寒性, 因为植物抗寒性机制具有一定的复杂性, 并不是只受单个

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(31071448); 四川省应用基础项目(2014JY0051)

作者简介: 严君 (1989-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质化学及基因工程。E-mail: Yanjun890905@163.com

通讯作者: 魏炜。E-mail: wwwfbxw@163.com

基因的调控和影响,只有成簇抗性相关基因的转录激活才能使植物的抗寒性得到有效提高,因此克隆并鉴定调控抗寒功能基因表达的转录因子成为这一领域的研究热点^[3]. CBF(C-repeat binding factor)转录因子的发现为植物抗寒性研究提供了一条新途径,CBF 转录因子属于 AP2/ERF 家族,只含有一个 AP2/ERF 结构域,主要通过识别 CRT/DRE(cold-repeat or dehydration responsive element)元件来激活启动子中含有该元件的抗寒基因的表达,从而调控植物对低温胁迫的响应^[4]. 1997年,Stockinger 等人通过酵母单杂交的方法首次在低温驯化后的拟南芥中克隆到 CBF1 转录因子^[5]. 之后研究者相继从水稻、玉米、棉花等物种中分离到 CBF 类转录因子且它们在植物中的过量表达可以提高植物的抗寒性^[6,7].

麻疯树(*Jatropha curcas*. L),属大戟科,多汁灌木,是一种多用途树种,不仅在退耕还林,保持水土上有重要意义,也是环保的能源物质,其种子的含油量高达 60%以上,是世界公认的最有可能在未来替代石油能源的、极具开发潜力的树种. 麻疯树起源于热带,喜温耐旱,不耐寒,无法生长于高纬度、高海拔地区,麻疯树较弱的抗寒性给其推广应用带来很大的局限性^[8],因此如何提高麻疯树的抗寒性是亟待解决的问题. 该文以麻疯树为材料,克隆到麻疯树 CBF 类转录因子 *JcCBF3* 基因的完整开放阅读框,并分析了该基因在低温胁迫下的转录表达谱,同时研究了其对转基因烟草抗寒性的影响及对下游相关基因的调控作用等. 这一研究为该基因的抗寒功能研究做出铺垫,为利用植物基因工程手段在分子水平上提高麻疯树抗寒性提供线索和物质基础.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 植物材料 麻疯树种子采于四川省西昌地区;本生烟草无菌组培苗由实验室提供.

2.1.2 试剂盒与试剂 Pfu 聚合酶、Taq 聚合酶、Top Green qPCR Super Mix 购于北京全式金生物技术公司;反转录试剂盒(PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser)、限制性内切酶、T4 连接酶购于 TaKaRa 中国大连公司;植物 RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、植物基因组提取试剂盒、质粒提取试剂购于北京天根生化科技公司;脯氨酸测试盒、SOD 测定试剂盒购于南京建成

生物工程研究所. 其余所有化学药品为进口或国产分析纯试剂.

2.1.3 菌株和载体 大肠杆菌菌株 DH5 α 菌株、农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pBI121 由实验室保存;克隆载体 pEasy-T1 购于 TaKaRa 中国大连公司.

2.2 方法

2.2.1 麻疯树的栽培 选取优良的大约 0.6g 左右的麻疯树种子于温室中萌发 1~2w,将萌发的小苗转移至花钵中继续培育大约两个月,待其长出 3~4 片真叶后取材待用.

2.2.2 麻疯树 *JcCBF3* 基因的克隆 根据麻疯树基因组数据库(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)搜索到的 CBF3 基因序列设计特异引物并加上 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点(划线处)和保护碱基(*JcCBF3S*: 5'-GCTCTAGAATGGATTTTCTCTCT-TGCTACTCCG -3'和 *JcCBF3A*: 5'-CCCCGGGTTATATGGAAAACTCCATAATGGC -3'),按照试剂盒说明书提取麻疯树幼嫩叶片的 DNA 和 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,以麻疯树叶片的基因组 DNA 和 cDNA 为模板,进行 *JcCBF3* 的克隆. PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 5min,35 个循环(95 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 1min),72 $^{\circ}$ C 8min. 按照胶回收试剂盒回收 PCR 和 RT-PCR 产物,连接至克隆载体 pEasy-T1,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选阳性克隆,送上海生工公司测序.

2.2.3 *JcCBF3* 基因序列的生物信息学分析 使用 NCBI 中的 BLASTX(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对 *JcCBF3* 序列进行比对分析,寻找其它物种中的类似蛋白,使用 DNAMAN 软件将不同物种中的 CBF 类基因进行氨基酸序列同源性分析. 参照文献资料预测并标记 *JcCBF3* 氨基酸序列的核心结构和功能区域等标志性元件.

2.2.4 *JcCBF3* 基因的 RT-qPCR 表达分析 按照试剂盒说明书提取低温胁迫条件下(4 $^{\circ}$ C)处理 0、2、8、12、24、48h 的麻疯树叶片的 RNA 并进行反转录,以 cDNA 为模版,RT-qPCR 检测 *JcCBF3* 低温处理不同时间段的相对表达量.

使用 Top Green qPCR Super Mix 并按照说明书在 Bio-Rad iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR 实验. PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 30s,39 个循环(95 $^{\circ}$ C 10s,56 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 10s),溶解曲线从 65 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C,升温程序为 0.5 $^{\circ}$ C/s,结果计算使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法,设计三个样品重复. 以 18SrRNA 作为

内参基因. 引物序列见表 1:

2.2.5 植物表达载体的构建及转基因烟草的获得

将 *JcCBF3* 基因置于 CaMV35S 强启动子后, 插入植物表达载体 pBI121 中, 构建 pBI121-*JcCBF3* 表达载体. 利用农杆菌介导的叶盘法转化野生型烟草^[9]. 通过 pBI121 载体中的 Kan 抗性筛选及 PCR 鉴定获得转基因植株 T0 代.

2.2.6 转基因烟草中 *JcCBF3* 基因及下游抗性基因的 RT-qPCR 分析

利用 RT-qPCR 检测野生型和转基因型烟草植株中 *JcCBF3* 基因及其下游基因 *NtERD10B*(登录号: AB049336) 和 *NtERD10C*(登录号: AB049337) 在转录水平上的变化, 内参基因为烟草 *NtActin* 基因(登录号: JQ256516.1). 反应程序为: 95℃ 4min, 39 个循环(95℃ 20s, 55℃ 20s, 72℃ 20s), 溶解曲线从 65℃~95℃, 升温程序为 0.5℃/S, 结果计算使用 2^{-ΔΔCT} 方法, 设计三个样品重复. 引物序列见表 1.

表 1 RT-qPCR 分析所用引物

Table1 Primers used for RT-qPCR

引物名	引物序列(5'→3')
qPCR <i>JcCBF3</i> -S	GATTCTCCAGTGTCCGATAGTTGC
qPCR <i>JcCBF3</i> -A	TCTTTCTGCCAGCCCGTTTC
qPCRN <i>tERD10B</i> -S	GGCAATCCCATTCGTCA
qPCRN <i>tERD10B</i> -A	TCTCCTTCATCCCTTTCTT
qPCRN <i>tERD10C</i> -S	CGTGGTTTGTGTTGATTT
qPCRN <i>tERD10C</i> -A	CCTCTGTTTTCCTCGTATT
qPCR18S-S	AGGAATGACGGAAGGGCA
qPCR18S-A	GTGCGGCCAGAATCTAAG
qPCRN <i>tActin</i> -S	GACAATGGAACAGGAATGGTCAAGGC
qPCRN <i>tActin</i> -A	CCAGTTGCTGACAATTCATGCTC

2.2.7 转基因烟草低温胁迫下游离脯氨酸含量和 SOD 活性分析

选取长势一致的野生型烟草及 T2 代转基因型烟草(具有 6~7 片真叶的幼苗)移至光照培养箱中进行低温胁迫(4℃)处理. 处理前和处理后采摘叶片并精确称重 0.2g, 置于 2mL EP 管(含有钢珠)中于液氮中速冻, -80℃ 保存待用. 按照脯氨酸试剂盒、SOD 测定试剂盒说明书测定野生型烟草和转基因型烟草的游离脯氨酸含量和 SOD 活力. 数据使用 Excel 作图.

3 结果与分析

3.1 麻疯树 *JcCBF3* 基因的克隆及生物信息学分析

以麻疯树叶片的 cDNA 和基因组 DNA 为模

板扩增出约 700bp 的片段, 与预期的目标条带大小一致(图 1). 测序结果表明成功克隆到 *JcCBF3* 基因的完整开放阅读框, 长 678bp, 无内含子, G+C 含量为 49.9%, 编码 225 个氨基酸(图 2). 预测蛋白质的分子量为 24.82 kD, 等电点为 5.26. 将 *JcCBF3* 基因的氨基酸序列与其它植物中的 CBF 类基因的氨基酸序列进行同源比对, 结果显示麻疯树中 *JcCBF3* 基因与木薯、橡胶树、蓖麻、核桃、拟南芥等植物中的 CBF 基因有较高的同源性, 与木薯 *MeDREB1*(AFA50331.1) 的相似性达 79%, 与橡胶树 *HbCBF1*(AAY43213.1) 的相似性达 74%, 与蓖麻的 *RcDREB1A*(XP002510847.1) 的相似性达 71%, 与胡桃 *JrCBF*(AFV93473) 的相似性达 64% 等(图 3).

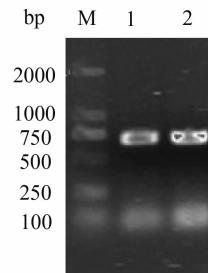


图 1 *JcCBF3* 基因的克隆

Fig.1 Cloning of *JcCBF3* gene

M: AL2000 DNA Marker; 1: 以 cDNA 为模板的 PCR 产物; 2: 以基因组 DNA 为模板的 PCR 产物

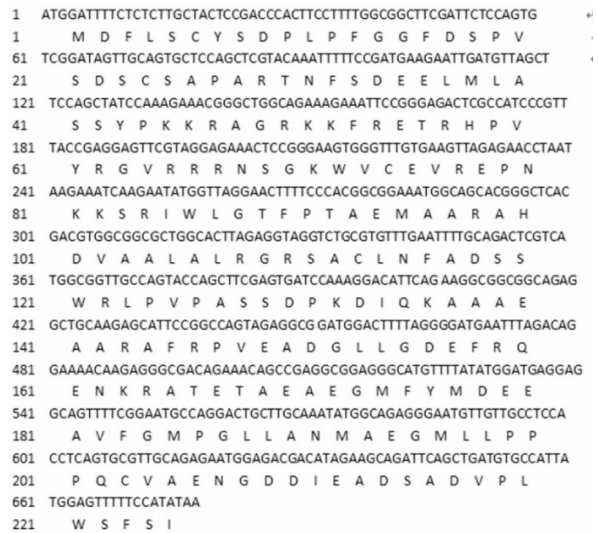


图 2 *JcCBF3* 的核苷酸与氨基酸对照

Fig.2 Reciprocal diagram between DNA and amino acid of *JcCBF3*

参考相关文献分析 *JcCBF3* 氨基酸序列的保守元件及特征氨基酸序列^[10], 发现其具备典型的 AP2 结构域(AP2 转录因子超家族特征区域), 其中第 14

位缬氨酸(V)和第 19 位谷氨酸(E)在 CBF 家族中相对保守. 在 AP2-DNA 结合域的上游的一段多肽(PKKRAGRKKFR)是 CBF 类转录因子所特有的序列,其可能在蛋白发挥功能时起到核定位信号的作用,除此之外该序列还具有其它保守元件(图 3).

应用 DNAMAN 软件进行同源性分析. 黑色示 100%同源性,方框标记的是 CBF 类转录因子

特征保守序列元件,下划线部分为乙烯应答元件结合因子 AP2(APETELA2 DNA-binding domain). 物种缩写及 GenBanK 的序列号分别为:AtCBF2, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* CBF2 (AAD15976); MeDREB1, 木薯 *Manihot esculenta* DREB1 (AFA50331.1); RcDREB1A, 蓖麻 *Ricinus communis* DREB1A (XP002510847.1);

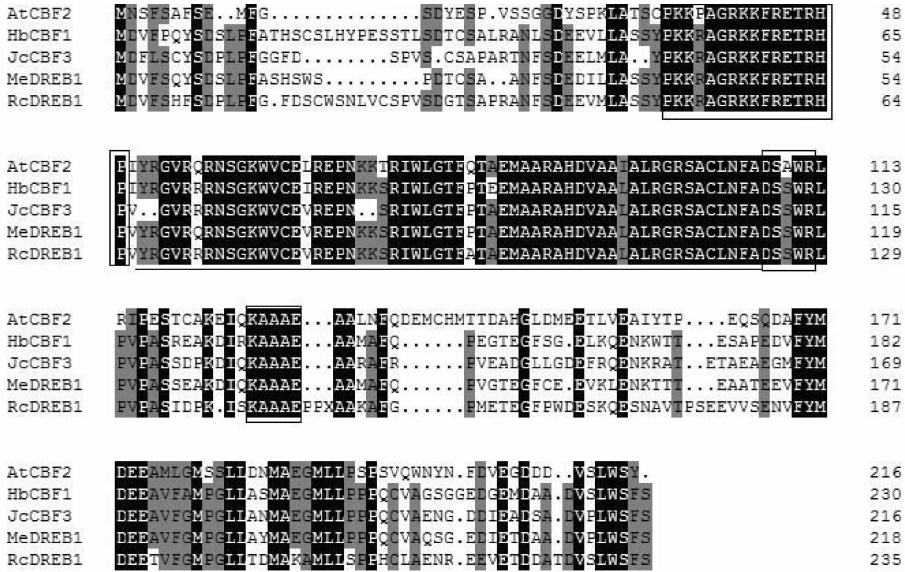


图 3 *JcCBF3* 基因氨基酸序列与其它植物中 CBF 类氨基酸序列的比较

Fig. 3 Comparison and alignment of the *JcCBF3* deduced amino acid sequence and those of its homologous gene

3.2 *JcCBF3* 基因受低温胁迫的表达谱分析

RT-qPCR 检测结果显示, *JcCBF3* 基因在 0h 有较低的表达量,低温胁迫 2h 后表达量开始大量积累,到 12h 后表达量达到峰值,是对照的 62 倍左右,随着时间延长表达量逐渐降低(图 4). 说明 *JcCBF3* 转录因子在低温胁迫下,在转录水平上有一定的上调表达,是一个受低温诱导表达的基因,可能参与麻疯树低温胁迫应答过程.

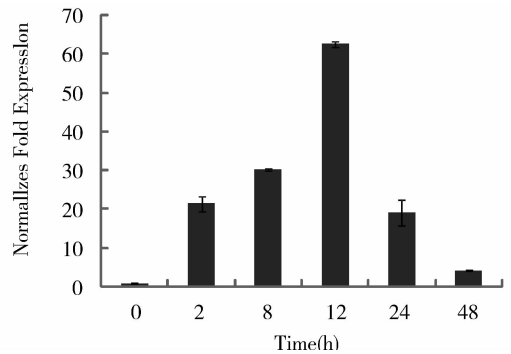


图 4 *JcCBF3* 对低温胁迫的转录应答

Fig. 4 Transcriptional response of *JcCBF3* to chilling

3.3 转基因烟草的分子鉴定及下游基因的表达分析

通过农杆菌介导转化的方法获得转基因烟草植株,经卡那霉素筛选和 PCR 检测,得到转 *JcCBF3* 基因阳性烟草植株 T0,同样对部分 T1 代的转基因烟草进行 PCR 检测也可以扩增得到目的条带(图 5),说明 *JcCBF3* 不仅已经导入 T0 代烟草中并能稳定遗传.

以野生型烟草作为对照,在正常生长状态下对转基因烟草的下游抗性基因表达情况进行 RT-qPCR 检测. 结果表明 *JcCBF3* 基因的过量表达可

以诱导含有 CRT/DRE 元件的 *NtERD10B* 和 *NtERD10C* 基因大量表达,而对照中 *JcCBF3* 基因无表达, *NtERD10B* 和 *NtERD10C* 的表达量也很低(图 6). 因此推测 *JcCBF3* 基因可能具有诱导含有 CRT/DRE 元件的下游抗性基因表达的能力.

3.4 转基因烟草的抗寒性分析

4℃低温胁迫处理 8h 后,转基因型烟草与野生型烟草的游离脯氨酸含量和 SOD 酶活性较处理

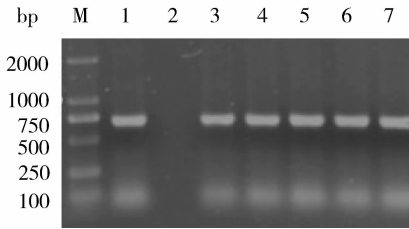


图5 转 *JcCBF3* 基因烟草 T1 代植株的 PCR 检测
Fig. 5 PCR analysis of *JcCBF3* transgenic tobacco T1 plants

M: AL2000 DNA Marker; 1: *pBI121-JcCBF3* 质粒; 2: 野生型烟草; 3~7: 转基因植株

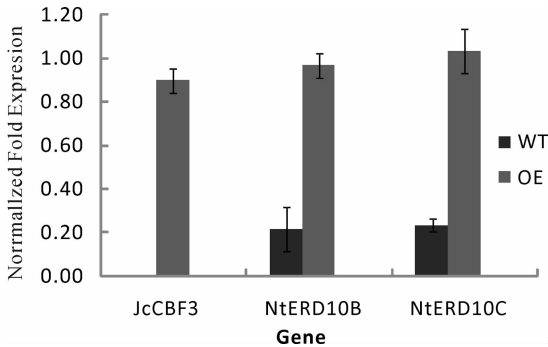


图6 *JcCBF3*、*NtERD10B*、*NtERD10C* 基因在烟草中的相对表达量

WT: 野生型烟草; OE: 转基因型烟草; * * : $P < 0.01$
Fig. 6 The relative expression of *JcCBF3*, *NtERD10B*, *NtERD10C* gene in tobacco

WT: wild type tobacco; OE: transgenic type tobacco; * * : $P < 0.01$

前均有上升,但在转基因烟草中的上升幅度明显要大于在野生型烟草中.低温胁迫后转基因型烟草游离脯氨酸含量和 SOD 酶活性分别是野生型烟草中的 1.79 倍和 1.97 倍(图 7),说明低温胁迫后,*JcCBF3* 基因对转基因烟草游离脯氨酸含量和 SOD 活性有明显影响,提高了转基因烟草的抗寒性.

4 讨论

植物 CBF 类转录因子在植物对低温胁迫的应答过程中发挥着重要的作用^[11].

JcCBF3 基因在低温诱导下的表达模式呈先升后降的趋势,符合大多数植物 CBF 类转录因子的表达模式特点,随后 *JcCBF3* 基因的表达量下降可能是因为植物细胞受低温胁迫后破坏了膜系统而使细胞活性降低,也可能因为受到其它负调控基因的抑制^[12].

NtERD10B 和 *NtERD10C* 基因为 COR/RD 基因(寒冷调节/脱水应答基因),启动子中含有 CRT/DRE 元件^[13]. *JcCBF3* 作为 CBF 转录因子识别 *NtERD10B* 和 *NtERD10C* 基因的 CRT/

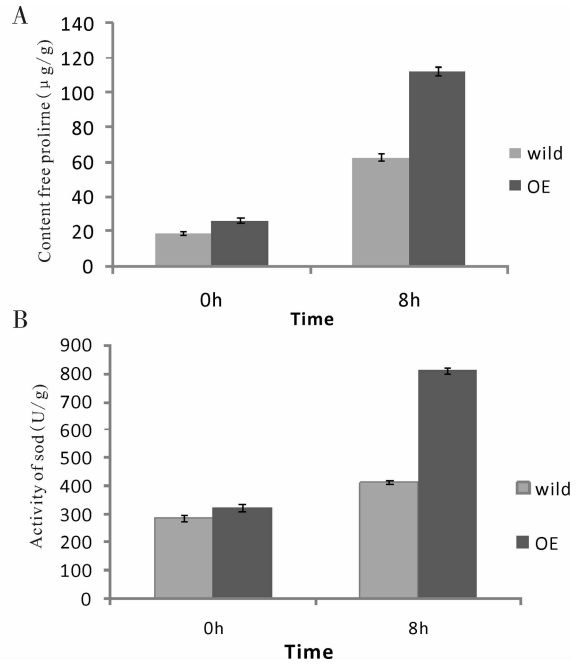


图7 野生型和转基因型烟草的抗寒分析

A: 低游离脯氨酸的含量变化; B: SOD 活力变化; Wild: 野生型烟草; OE: 转基因型烟草

Fig. 7 Effects of cold stress on wild-type and transgenic tobacco plants.

A: Effects of cold stress on amounts of free proline; B: Effects of cold stress on activity of SOD. WT: wild-type tobacco, OE: transgenic tobacco.

DRE 元件,诱导这两个基因表达 LEA 蛋白,该蛋白具有高度的亲水性,可以保护植物细胞免受水分胁迫的伤害,含有丰富的 LEA 蛋白是转基因烟草抗寒性提高的原因之一,因此间接说明 *JcCBF3* 基因可以提高转基因植株的抗寒性.

大量研究发现过量表达一些 CBF 类转录因子可以提高转基因植物对低温胁迫的抗性,同时伴随着生理生化指标的变化^[14-15]. 脯氨酸是重要的渗透调节物质,是一种亲水性氨基酸,能缓解因低温脱水造成的渗透胁迫,维持细胞膜和蛋白质正常功能和活性^[16]. 另外,低温胁迫会诱导细胞内迅速产生大量活性氧,活性氧累积会导致细胞膜透性增大、细胞液外渗,甚至诱发细胞凋亡,SOD 作为活性氧清除酶可避免细胞免受氧化胁迫,因此脯氨酸含量和 SOD 酶活性与植物抗寒性是呈正相关的^[17]. *JcCBF3* 基因的过量表达提高了烟草的游离脯氨酸含量和 SOD 活性,说明转基因烟草的抗寒性得到增强.

值得一提的是麻疯树没有耐寒品种,从低温胁迫下的表达谱来看可能是因为麻疯树中 *JcCBF3* 基因对低温胁迫的反应相对较慢(12h 才达到峰值),无法迅速应对骤变的气温以调控下游基因发挥功能;也可能因为麻疯树的低温胁迫应答机制较

复杂,其它一些未知因素限制了 *JcCBF3* 基因激活下游抗寒基因的表达,所以 *JcCBF3* 基因在麻疯树低温胁迫应答机制中的具体调控作用还有待进一步探索,其可作为基因工程育种的一个备选基因,在选育抗寒性强的麻疯树品种上具有重要意义。

参考文献:

- [1] Artus N N, Uemura M, Steponkus P L, *et al.* Constitutive expression of the cold regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing to tolerance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(23): 13404.
- [2] Ouellet F, Vazquez-Tello A, Sarhan F. The wheat WCS120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species[J]. FEBS Letters, 1998, 423(3): 324.
- [3] 林茂, 闫海霞, 睦顺照, 等. 植物 CBF 转录因子及其在基因工程中的应用[J]. 广西农业科学, 2008, 39(1): 21.
- [4] Kanaya E, Nakajima N, Morikawa K. Characterization of the transcriptional activator CBF1 from *Arabidopsis thaliana*. Evidence for cold denaturation in regions outside of the DNA binding domain[J]. J Biol Chem, 1999, 274(23): 16068.
- [5] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(3): 1035.
- [6] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, *et al.* Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(1): 141.
- [7] Qin F, Sakuma Y, Li J, *et al.* Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold responsive gene expression in *Zea mays* L [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(8): 1042.
- [8] 李荣峰, 兰翠玲, 曾小飏. 广西麻疯树资源及其开发利用前景研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 2111.
- [9] Clough S, Bent A. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 1998, 16(6): 735.
- [10] Wang L, Gao J, Qin X, *et al.* *JcCBF2* gene from *Jatropha curcas* improves freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* during the early stage of stress [J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(5): 937.
- [11] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(3): 998.
- [12] 董铮, 戴阳朔, 李魏, 等. 水稻中耐低温胁迫的转录因子研究进展[J]. 湖南农业科学, 2013, (7): 16.
- [13] 杨莎. 低温胁迫下甜椒 CBF3 基因的表达和功能研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2011.
- [14] Hsieh T H, Lee J T, Charng Y Y, *et al.* Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress [J]. Plant Physiol, 2002, 130(2): 618.
- [15] Hsieh T H, Lee J, Yang P T, *et al.* Heterology expression of the *Arabidopsis* c-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato[J]. Plant Physiol, 2002, 129(3): 1086.
- [16] 吴广霞, 唐献龙, 杨德光, 等. 植物低温胁迫生理研究进展[J]. 作物杂志, 2008, 3: 17-19.
- [17] 赵天宏, 孙加伟, 付宇. 逆境胁迫下植物活性氧代谢及外源调控机理的研究进展[J]. 作物杂志, 2008, 3: 10.