

# 菜用大豆 CBF 信号转导途径相关基因的克隆与功能分析

张古文\*, 龚亚明, 胡齐赞, 徐盛春

(浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021)

克隆菜用大豆耐寒信号转导途径相关基因 *GmCBF* (*Glycine max CBF*), 并对其序列特征进行分析, 为研究菜用大豆耐寒性的分子机制增加理论基础, 也为进一步以 CBF 信号转导途径相关因子作为改良靶标提供理论依据。

以菜用大豆耐寒品种‘沪宁 95-1’为材料, 4 °C 诱导 8 h 的叶片 cDNA 为模板, 参照已发表的大豆 *CBF* 基因(AF370735)设计特异引物, 采用 RACE-PCR 技术进行基因克隆。采用 DNAMAN 4.0 软件对所得序列编码的氨基酸进行分析, 采用 BLAST 程序对其核苷酸和氨基酸序列进行同源性比较, 利用 ClustalX 1.8 软件进行多重序列比对, 利用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树, 二级结构用 Bioinformatics & Biological computing 分析, 三级结构用 SWISS-MODEL 分析。以 25 °C 12 h、4 °C 0.5 h、4 °C 2 h、4 °C 4 h、4 °C 8 h、4 °C 8 h 后再 25 °C 12 h 等 6 种处理后的叶片总 RNA 为模板, 利用半定量 RT-PCR 方法验证 *GmCBF* 基因表达是否受低温诱导。酵母单杂交方法鉴定其转录激活活性。

结果表明, *GmCBF* 基因 cDNA 全长 1 150 bp, 含有 705 bp 的完整开放阅读框, 编码 234 个氨基酸残基, 起始密码子 ATG 的-3 位为 A, 符合 Kozak 规律, 符合有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。编码的蛋白具有典型的 AP2 结构域, 并具有 DNA 结合区, 分子量约为 94.60 kD, 等电点为 4.84。

将该基因与大豆 *CBF1*、野生大豆 *DREB1*、番薯 *DREB1*、海棠 *CBF1*、桉树 *CBF1*、甘蓝型油菜 *DREB1B*、花生 *DREB1* 等基因进行多序列比对并构建系统进化树, 结果表明该基因核苷酸序列与大豆 *CBF1* 基因的同源性最高, 为 98%, 与花生 *DREB1* 基因的同源性最低, 为 74%; 氨基酸序列与大豆 *CBF1* 基因的同源性最高, 为 98%, 与桉树 *CBF1* 基因的同源性最低, 为 55%。

*GmCBF* 蛋白由 80 个  $\alpha$  螺旋, 8 个  $\beta$  转角组成, 被 32 个延伸链和 92 个自由卷曲连接, 与大豆 *CBF1* 蛋白及野生大豆 *DREB1* 蛋白较相似, 表明三者有较近的亲缘关系。 $\alpha$  螺旋为其主要结构, 表明该蛋白不是球蛋白。三级结构分析没有发现数据库中有和 *GmCBF* 蛋白同源的三维结构图。

25 °C 时没有扩增到条带, 4 °C 诱导 0.5 h 后 *GmCBF* 基因开始表达, 诱导 4 h 达到高峰, 随后又逐渐减弱, 4 °C 诱导 8 h 后再用 25 °C 处理 12 h, 未检测到表达。该结果证明 *GmCBF* 基因与低温诱导过程相关, 属于 *CBF* 基因家族。*GmCBF* 基因可以与 DRE 元件结合, 激活下游报告基因 *LacZ* 的表达, 但其不能结合突变的 DRE 元件, 进一步证实其属于转录因子。

**关键词:** 菜用大豆; *CBF* 基因; 克隆; 功能分析

**中图分类号:** S 643.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) S-2598-01

**收稿日期:** 2011-08-26

**基金项目:** 浙江省科技计划面上科研项目 (2009C32094); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2011C22011)

\* E-mail: zhangguwen@126.com; Tel: 0571-86416055