

扁桃 *CBF1* 转录因子的克隆及原核表达分析

张亮¹, 李疆², 代培红¹, 罗淑萍¹, 李鹏², 彭弯弯¹

(¹新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052; ²新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 为了探明 *CBF* 转录因子在扁桃中的抗寒分子机理, 以新疆栽培扁桃‘矮丰’叶片为材料, 通过 PCR 技术从扁桃基因组 DNA 中获得 *CBF1* 转录因子, 命名为 *AF-PdCBF1*, GenBank 登录号为 KM245570。序列分析表明, 该基因开放阅读框为 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 推测蛋白质分子量为 27.405 kD, 并且该蛋白没有信号肽。进化树分析表明, *AF-PdCBF1* 与甜樱桃和中国梅的亲缘关系最近。将该基因片段连接到原核表达载体 pET-32a(+) 中, 构建融合表达质粒 pET-*PdCBF1*, 转化到 *E. coli* Rosetta (DE3) 中进行表达。SDS-PAGE 电泳检测结果表明, 表达蛋白与预期大小一致, 分子量大小约为 47.8 kD。对重组蛋白的诱导条件进行优化后结果表明, 重组蛋白 pET-*PdCBF1* 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L、诱导 4 h 时, 其表达量最佳。试验结果可为进一步纯化和鉴定目的蛋白及研究其功能奠定基础。

关键词: 扁桃; *CBF1* 转录因子; 原核表达

Cloning and Prokaryotic Expression of Almond *CBF1* Transcription Factor

ZHANG Liang¹, LI Jiang², DAI Pei-hong¹, LUO Shu-ping¹, LI Peng², PENG Wan-wan¹

(¹College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052;

²College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

Abstract: In order to identify the role of *CBF* transcription factors in plant resistance of almond. The *CBF1* homologue gene named *AF-PdCBF1* (Genbank Accession No. KM245570) was isolated from the leaf of almond ‘Aifeng’ (*Prunus dulcis*) in Xinjiang with the technology and method of PCR. Sequence analysis revealed that the open reading frame was 729 bp in full-length and encoded a protein of 242 amino acids, and its relative molecular mass was approximately 27.405 kD, and *AF-PdCBF1* had no signal peptide. The homology tree showed that *AF-PdCBF1* with *Prunus avium* and *Prunus mume* had recently genetic relationship. The recombinant prokaryotic expression vector pET-*PdCBF1* was constructed by inserting the DNA fragment into the prokaryotic expression vector pET-32a(+), and then transformed into *E. coli* Rosetta (DE3). The SDS-PAGE displayed that the expressed proteins consisted with the size of expected protein and then 47.8 kD protein was obtained. The optimal expression condition was set 0.2 mmol/L IPTG, induced temperature at 28 °C, and induced time for 4 hours. The results provided a foundation for further purifying and identifying target protein and studying the function of *AF-PdCBF1*.

Key words: almond; *CBF1* transcription factor; prokaryotic expression

扁桃(*Prunus dulcis* Mill.)又名巴旦杏, 落叶乔木, 属蔷薇科李亚科桃属扁桃亚属植物, 世界四大坚果之一。扁桃起源于中亚细亚, 世界上约共有 53 个种, 其中具有经济意义和栽培价值的只有普通扁桃

种或栽培种^[1]。新疆扁桃的栽培分布区主要位于喀什地区的莎车县和英吉沙县。生产中大部分的扁桃品种都是通过实生繁殖选育而来, 其具有种仁较小、出仁率偏低、双仁率高、抗逆性差、花期易遭低温

收稿日期: 2014-10-23 修回日期: 2015-01-03 网络出版日期: 2015-04-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150410.1613.010.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31360473, 31260186); 新疆维吾尔自治区十二五重大科技专项(201130102-1); 新疆维吾尔自治区果树学重点学科基金

第一作者研究方向为分子生物学。E-mail: pacol12@sina.com

通信作者: 李疆, 研究方向为果树种质资源。E-mail: lijianxj@163.com

罗淑萍, 研究方向为分子生物学及植物种质资源。E-mail: luoshuping2008@163.com

冻害而减产等特点^[2]。因此,选育出抗寒性较强的优良品种对扁桃今后实现产业化发展具有重要意义。

CBF (C-repeat binding transcription factor/dehydrate responsive element binding factor) 转录因子是植物抗冷途径的枢纽^[3]。*CBF* 表达的蛋白含有 1 个保守的 AP2 结合域,是转录因子 AP2 家族中的 1 个亚家族,其在植物抵御低温、干旱和高盐等非生物胁迫环境中具有重要作用^[4]。氨基酸序列分析发现,*CBF* 转录因子上游含有 1 个保守的核定位信号区 (NLS, nuclear localization signal): PKK/RP-AGR_xKF_xETRHP,及下游含有的 DSAW 序列和羧基末端的 LWSY 保守序列,被称为是 *CBF* 转录因子的特征序列^[5]。*CBF* 转录因子介导的低温调节转导途径在不同植物之间有高度的保守性,自 E. J. Stockinger 等^[6]在拟南芥中首次发现 *CBF* 基因以来,人们已从樱桃^[7]、桦树^[8]、杨树^[9]、桉树^[10-12]、葡萄^[13]、柑橘^[14]、苹果^[15] 等木本植物中分离出参与低温调节的 *CBF* 基因。*CBF* 转录因子在植物冷驯化过程中起到至关重要的作用^[16-17]。K. R. Joglo 等^[18]将 *AtCBF1* 基因转入拟南芥中,转基因拟南芥提高了对低温的耐受性。甄伟等^[19]将 *AtCBF1* 基因转入烟草中,转基因烟草也提高了对低温的耐受性。C. Benedict 等^[9]将 *AtCBF1* 基因转入杨树后使其对低温的耐受性有了明显提高。由此可见,*CBF* 转录因子在植物品种改良中具有重要的应用价值。矮丰是新疆扁桃主栽品种之一,本研究对其 *CBF* 转录因子进行克隆及原核表达分析,以探明 *CBF* 转录因子在扁桃抗寒机制中发挥的功能以及为优良扁桃品种的选育奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验于 2013-2014 年在新疆农业大学分子生物学和农业生物技术重点实验室进行,供试材料为采自新疆莎车县二林场的新疆扁桃栽培品种矮丰一年生休眠枝条,经实验室水培发出嫩叶后置于 4 °C 低温胁迫处理 24 h,将嫩叶取下在液氮中处理后立即存放于超低温冰箱备用。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 公布的 *PdCBF1* 基因 (登录号: AFL48190) 设计特异引物 PdCBF1-F: CGCTAATGAACAGGTTCTTCTCTCA; PdCBF1-R: CAAAGTGAGCAGCCAAGGAACC。根

据 *CBF1* 编码框和原核表达载体 pET-32a(+) 多克隆酶切位点设计 1 对特异引物 CBF1y-F: CGCGGATCCATGAACAGGTTCTTCTCTCATTT; CBF1y-R: CCGCTCGAGTTAATTGGAGAACTCCACAATT。在上下游引物的 5' 端分别添加 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点及保护碱基(下划线部分为酶切位点,斜体部分为保护碱基)。

1.2.2 扁桃基因组 DNA 提取及 *AF-PdCBF1* 的克隆 使用改良的 CTAB 法提取扁桃基因组 DNA^[20-24],以 DNA 为模板使用引物 PdCBF1-F/R 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。参照天根凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,回收产物连接到 pMD 19-T 载体 (TaKaRa 生物公司),转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,菌液 PCR 检测后送往上海生工生物技术有限公司测序。将测序结果分析正确的克隆菌株提取质粒,以质粒为模板使用引物 CBF1y-F/R 进行 PCR 扩增,经过 TA 克隆并检测正确的阳性菌株送往上海生工生物技术有限公司测序。重组载体命名为 pMD-*PdCBF1*。

1.2.3 *AF-PdCBF1* 基因序列分析 使用 BLASTn 在线软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *AF-PdCBF1* 进行同源序列比对;使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *AF-PdCBF1* 编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量等理化性质;使用 BioEdit 软件对 *AF-PdCBF1* 与其他植物氨基酸序列进行同源性分析;利用 MEGA 5.0 软件对不同植物 CBF 蛋白做系统发育分析;使用 SignalP 4.1 Server 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对扁桃 *AF-PdCBF1* 蛋白进行信号肽分析。

1.2.4 原核表达载体 pET-*PdCBF1* 的构建 使用 *Bam*H I、*Xho* I 限制性内切酶 (TaKaRa 生物公司) 分别双酶切 pMD-*PdCBF1* 重组质粒 DNA 和 pET-32a(+) 原核表达载体,分别回收目的片段,T₄ DNA 连接酶 (TaKaRa 生物公司) 连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,使用氨苄青霉素 (Amp) 抗性平板筛选重组质粒,对经过 PCR 及双酶切检测后正确的质粒进行测序鉴定。重组表达载体命名为 pET-*PdCBF1*。

1.2.5 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达分析 将重组表达质粒 pET-*PdCBF1* 转化 Rosetta (DE3) (全式金生物公司) 感受态细胞,挑取单菌落接种于 800 μ L 液体 LB 培养基 (含有 100 μ g/mL Amp) 中,

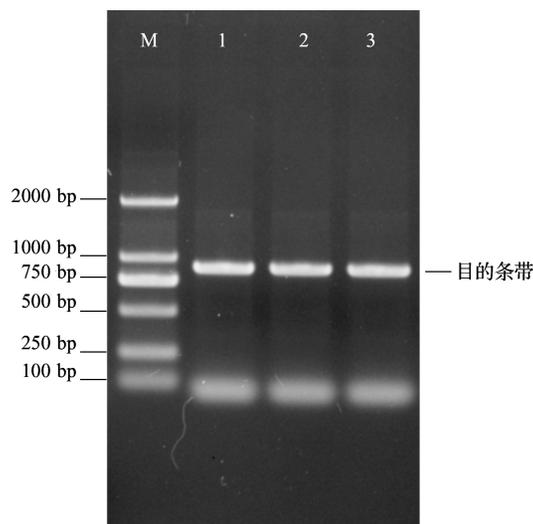
37 °C 振荡培养过夜。次日,将培养好的重组质粒菌液按照 1:100 的比例接到新的 LB 培养基(含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp)中,37 °C 振荡培养至 $\text{OD}_{600} \approx 0.4$,分别做不同诱导时间与不同 IPTG 浓度的诱导表达。不同诱导时间:取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,加入 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)在 28 °C 进行诱导表达。使 pET-32a(+)转化菌分别诱导 0 h、6 h,重组蛋白分别诱导 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h。不同 IPTG 浓度:取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,pET-32a(+)转化菌分别加入 0 mmol/L、1 mmol/L 的 IPTG 作为对照,重组蛋白分别加入不同浓度 IPTG(0 mmol/L、0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L)在 28 °C 诱导 3 h。收集菌体,加入 50 μL 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液和 50 μL ddH₂O 裂解菌体,100 °C 沸水煮沸 10 min,待冷却后取 5 μL 样品上样,进行 SDS-PAGE(4% 浓缩胶和 12% 分离胶)电泳分析。凝胶使用考马斯亮蓝 R-250 染色并使用脱色液脱色至背景清晰。

2 结果与分析

2.1 扁桃 *AF-PdCBF1* 的克隆及序列分析

以新疆栽培扁桃矮丰叶片总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到与预期大小一致的条带(图 1)。将该片段连接到 pMD 19-T 克隆载体后测序,结果表明其长度为 890 bp,该基因的开放阅读框(ORF)为 729 bp,命名为 *AF-PdCBF1*。该基因编码 242 个氨基酸,分子量为 27.405 kD。氨基酸序列 BLAST 比对结果表明,*AF-PdCBF1* 与其他的 CBF 类转录因子具有很高的同源性,其中与甜樱桃(BAC20184)和中国梅(ADF43035)的氨基酸序列相似度最高,为 85%。

不同植物 CBF 基因氨基酸序列同源比对分析表明,*AF-PdCBF1* 基因的编码区含有保守的 AP2/ERF 结构域以及由 T. K. Nakano 等^[25]确定的 CMIII-1 到 CMIII-4 的保守序列,这些保守序列包含推定的核定位信号及 AP2/ERF 结构域侧边的 DSAW 特征序列(CMIII-3)(图 2)。这些短肽序列在不同物种的进化中都具有高度保守性。系统进化树分析表明,*AF-PdCBF1* 与甜樱桃 *PaDREB1* 的亲缘关系最近,与中国梅 *PmCBF* 也有很近的亲缘关系(图 3)。通过 Signal P 4.0 Server 软件预测 *AF-PdCBF1* 蛋白信号肽,分析结果表明 *AF-PdCBF1* 蛋白不存在信号肽。



M: DNA 2000 分子量标准;1~3: *AF-PdCBF1*

M: DNA 2000 Marker, 1-3: *AF-PdCBF1*

图 1 扁桃 *AF-PdCBF1* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR amplification of *AF-PdCBF1* gene

2.2 原核表达载体的构建及重组子的鉴定

提取 pMD-*PdCBF1* 和 pET-32a(+)质粒,使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别双酶切,胶回收目的基因片段和表达载体,用 T₄ DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,构建融合表达质粒 pET-*PdCBF1*。

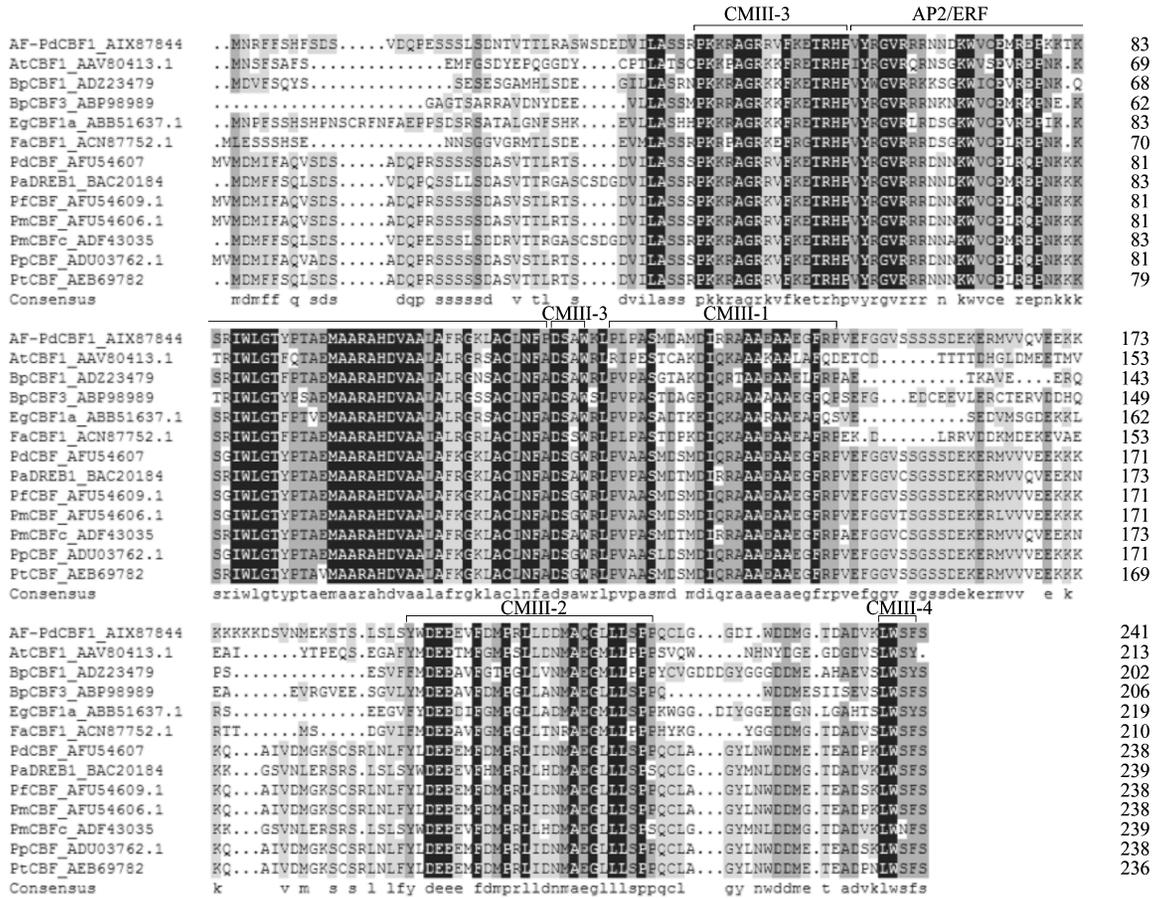
使用引物 CBF1y-F1/R1 对重组质粒 pET-*PdCBF1* 进行 PCR 检测,可扩增出 750 bp 左右的目的片段(图 4),使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pET-*PdCBF1*,可切出 750 bp 左右片段(图 4),初步证明 pET-*PdCBF1* 重组质粒构建正确。为了进一步证明重组质粒的正确性,将初步验证正确的重组质粒进行序列测定。测序结果表明,插入的基因片段与目的序列一致,酶切位点插入正确,未出现碱基改变、缺失或移码等问题。表明已获得正确的 *AF-PdCBF1* 的原核表达重组质粒。

2.3 SDS-PAGE 电泳分析

将重组质粒 pET-*PdCBF1* 转化 Rosetta(ED3)感受态细胞,培养二次活化菌液 OD_{600} 值约为 0.4 时,在 28 °C 进行不同条件诱导后,收集总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示,插入外源基因的重组质粒 pET-*PdCBF1* 经 IPTG 诱导后,在预期的蛋白分子量 47 kD 左右有 1 条蛋白条带,而未诱导及诱导的转化空载体均未出现这条蛋白带。表明重组质粒 pET-*PdCBF1* 在大肠杆菌中诱导表达了 *AF-PdCBF1* 蛋白。从 SDS-PAGE 电泳结果可以看出,IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 时,通过不同时间(0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h)的诱导,表达的蛋白量在逐渐

的增加,诱导 4~6 h 后表达的蛋白量基本不变,推测已达到最大表达量(图 5 A)。通过不同浓度 IPTG (0 mmol/L、0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L)的诱导发现,在浓度到达 0.2 mmol/L 后随浓度增加总蛋白表达

量也基本不再增加(图 5 B)。由此可见,诱导剂的不同浓度及诱导时间对重组蛋白的表达都会有一定的影响。经过诱导条件的优化后,重组蛋白 pET-PdCBF1 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L、诱导 4 h 时,达到最佳表达量。



AF-PdCBF1 (AIX87844): 扁桃 (*Prunus dulcis*); AtCBF1 (AAV80413.1): 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*); BpCBF1 (ADZ23479): 白桦 (*Betula platyphylla*); BpCBF3 (ABP98989): 垂枝桦 (*Betula pendula*); EgCBF1a (ABB51637.1): 桉树 (*Eucalyptus gunnii*); FaCBF1 (ACN87752.1): 草莓 (*Fragaria x ananassa*); PdCBF (AFU54607): 山桃 (*Prunus davidiana*); PaDREB1 (BAC20184): 甜樱桃 (*Prunus avium*); PjCBF (AFU54609.1): 新疆桃 (*Prunus ferganensis*); PmCBF (AFU54606.1): 光核桃 (*Prunus mira*); PmCBFc (ADF43035): 中国梅 (*Prunus mume*); PpCBF (ADU03762.1): 桃 (*Prunus persica*); PtCBF (AEB69782): 野扁桃 (*Prunus tenella*)

图 2 不同植物 CBF 氨基酸序列同源比对

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of CBF from different plants

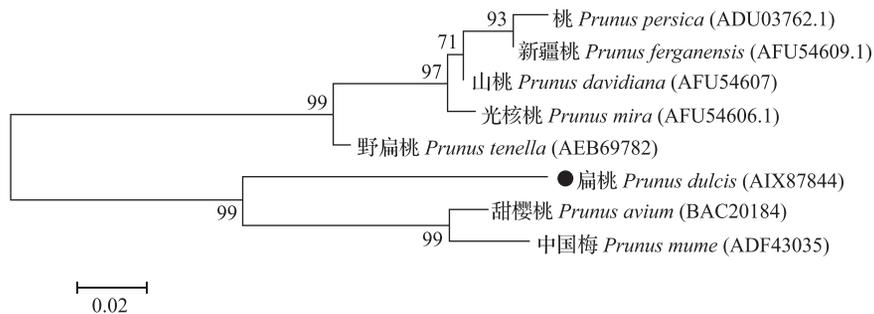
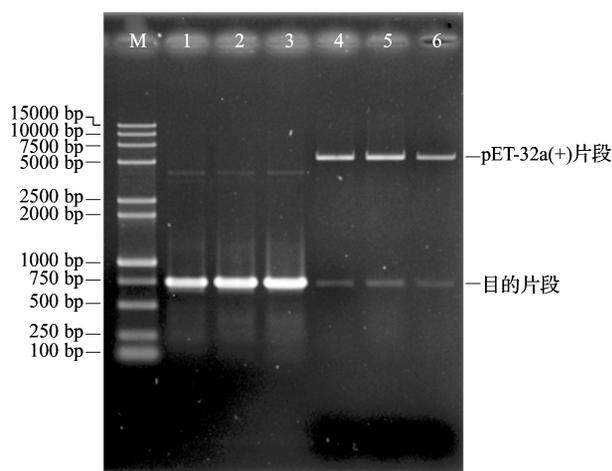


图 3 不同植物 CBF 氨基酸序列系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino sequences of plants CBF protein



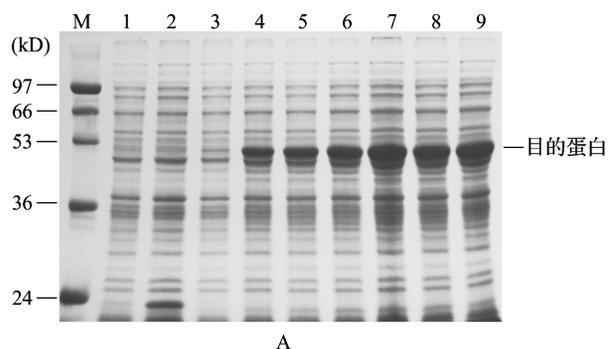
M: DNA 分子量标准;1~3 泳道:重组质粒 pET-PdCBF1 PCR 验证结果;4~6 泳道:重组质粒 pET-PdCBF1 双酶切验证结果

M: DNA ladder, 1-3 lanes: PCR analysis of pET-PdCBF1, 4-6 lanes: Restriction enzyme digestion analysis of pET-PdCBF1

图4 重组质粒 pET-PdCBF1 的 PCR 及双酶切验证结果
Fig. 4 Restriction enzyme digestion and PCR analysis of pET-PdCBF1 recombinant plasmid

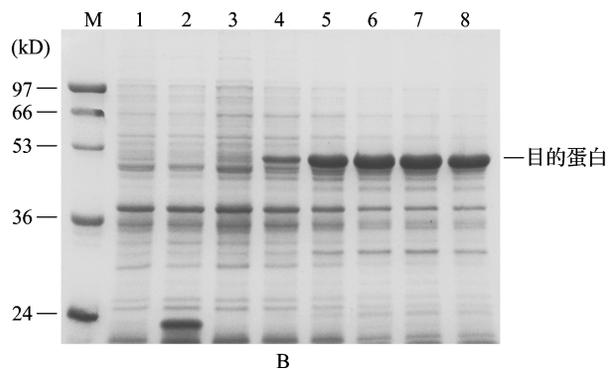
3 讨论

对于多年生果树而言,温度信号可以调节休眠状态及冷驯化,是其冬季生存的决定因素。而 CBF 转录因子家族介导的低温信号是最好的研究机制之一^[26]。本试验利用 PCR 技术,从矮丰扁桃分离得到了 AF-PdCBF1 转录因子。序列分析表明,该基因有一个约 60 个氨基酸组成的 AP2 结合域,且在 AP2 结构域上下游分别含有被认为是 CBF 转录因子特征序列的两段短肽序列 (PKK/RPAGR_xKFxETRHP 和 DSAW)^[5],说明 AF-PdCBF1 是典型的 CBF 转录因子。系统进化树分析显示,AF-PdCBF1 (KM245570) 与 PaDREB1 (BAC20184) 和 PmCBF (ADF43035) 的亲缘关系最近。推测 AF-PdCBF1 转录因子在扁桃冷驯化途径中具有一定功能。但是关于 AF-PdCBF1 转录因子在冷调节途径中是如何发挥其功能的,还需要从蛋白水平上进行深入的研究。原核表达体系是研究蛋白质结构与功能的基础。本研究将从新疆扁桃中克隆的 AF-PdCBF1 转录因子构建到原核表达载体 pET-32a(+) 中,并在 E. coli (ED3) 中成功表达了大约为 48 kD 的蛋白质。生物信息学预测结果表明 AF-PdCBF1 蛋白分子量大小为 27.405 kD,而原核表达载体 pET-32a(+) 的融合标签 Trx·Tag, His·Tag 和 S·Tag 蛋白大小为 20.4 kD,所以推测 47.805 kD 的融合蛋白大小与电



A: M 为蛋白分子量标准;IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 时,泳道 1,2 分别为 pET-32a(+) 空载体转化子诱导 0 h,6 h;泳道 3~9 分别为 pET-PdCBF1 诱导 0 h,1 h,2 h,3 h,4 h,5 h,6 h

A: M represents protein molecular weight marker, line 1 and 2 were pET-32a(+) induced with 0.2 mmol/L IPTG for 0h and 6 h, line 3-9 were pET-PdCBF1 induced with 0.2 mmol/L IPTG for 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, and 6 h



B: M 为蛋白分子量标准;泳道 1,2 为 pET-32a(+) 空载体转化子 IPTG 终浓度为 0,1 mmol/L 时诱导 3 h;泳道 3~8 为 pET-PdCBF1 IPTG 终浓度分别为 0,0.05,0.1,0.2,0.5,1 mmol/L 时诱导 3 h

B: M represents protein molecular weight marker, line 1 and 2 were pET-32a(+) induced with 0 mmol/L and 1 mmol/L IPTG for 3 h; line 3-8 were pET-PdCBF1 induced with 0 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L IPTG for 3 h

图5 融合蛋白 pET-PdCBF1 在大肠杆菌中的 SDS-PAGE 诱导表达分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant pET-PdCBF1 in E. coli

泳结果基本吻合,此结论也与肖艳等^[27]使用 pET-32a(+) 原核表达载体构建竹 CBF1 融合表达载体后诱导表达的总蛋白推测的大小相一致。对重组蛋白的诱导条件进行优化后结果表明,重组蛋白 pET-PdCBF1 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L、诱导 4 h 时,其表达量最佳。

外源基因能否在大肠杆菌中成功表达受到许多因素的影响,如不同的原核表达载体、宿主菌、IPTG 浓度、诱导时间和温度等^[28]。李娟等^[29]认为过低

的 IPTG 浓度(终浓度小于 0.1 mmol/L)下,蛋白表达量不高,而过高的 IPTG 浓度(终浓度大于 1.0 mmol/L)也会对宿主菌有毒害作用。本研究起初将重组质粒在常规表达宿主菌 BL21 (DE3) 中表达,结果显示目的基因几乎没有表达。然后将重组载体导入 Rosetta (DE3) 菌株中表达,结果目的基因在含有补充稀有密码子的大肠杆菌中正常表达。由于不同生物使用密码子的偏爱性不同,外源基因在 *E. coli* 中过表达会因为缺乏某种或某几种 tRNA 而直接导致翻译错误或终止。Rosetta (DE3) 菌株能提供大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子 (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA) 对应的 tRNA, 所以此菌株能够有效改善大肠杆菌由于缺少稀有密码子而造成目的基因的表达限制,从而有效的提高蛋白的表达量^[30]。

本研究从新疆扁桃栽培品种矮丰中成功克隆了 *AF-PdCBF1* 转录因子,并进行了相关的生物信息学分析,构建了 pET-*PdCBF1* 重组质粒,并在大肠杆菌中成功表达了融合蛋白,为 *AF-PdCBF1* 蛋白的纯化和鉴定及其功能的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李疆,胡芳名,李文胜,等. 扁桃的栽培及研究概况[J]. 果树学报,2002,19(5):346-350
- [2] 梅立新,郭春会,刘林强. 我国扁桃生产现状与发展对策[J]. 西北农林科技大学学报,2003,31(4):95-98
- [3] 吕胜男,生吉萍,赵丹莹,等. *CBF* 基因调控植物抗冷途径的研究进展[J]. 西北植物学报,2011,31(6):1275-1281
- [4] 李科友,朱海兰. 植物非生物逆境胁迫 *DREB/CBF* 转录因子的研究进展[J]. 林业科学,2001,47(1):124-134
- [5] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. Plant Physiol,2001,127(3):910-917
- [6] 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,1997,94:1035-1040
- [7] Kitashiba H, Ishizaka T, Isuzugawa K, et al. Expression of a sweet cherry *DREB1/CBF* ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance[J]. Plant Physiol,2004,161:1171-1176
- [8] Welling A, Palva E T. Involvement of *CBF* transcription factors in winter hardiness in birch [J]. Plant Physiol, 2008, 147: 1199-1211
- [9] Benedict C, Skinner J S, Meng R G, et al. The *CBF1*-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. [J]. Plant Cell Environ, 2006,29:1259-1272
- [10] Kayal W E, Navarro M, Marque G, et al. Expression profile of *CBF*-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold [J]. J Exp Bot,2006,57:2455-2469
- [11] Gamboa M C, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela P D T, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding a *CBF* transcription factor from *E. globulus*[J]. Plant Physiol Biochem,2007,45:1-5
- [12] Navarro M, Marque G, Ayax C, et al. Complementary regulation of four *Eucalyptus* *CBF* genes under various cold conditions[J]. J Exp Bot,2009,60:2713-2724
- [13] Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, et al. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid[J]. Plant Cell Environ,2006,29:1410-1421
- [14] Champ K I, Febres V J, Moore G A. The role of *CBF* transcriptional activators in two Citrus species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance[J]. Plant Physiol,2007,129:529-541
- [15] Wisniewski M, Norelli J, Bassett C, et al. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) *CBF* transcription factor in apple (*Malus x domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness[J]. Planta,2011,233:971-983
- [16] Novillo F, Medina J, Salinas J. *Arabidopsis* *CBF1* and *CBF3* have a different function than *CBF2* in cold acclimation and define different gene classes in the *CBF* regulon[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(52):21002-21007
- [17] Gilmour S J, Fowler S G, Thomashow M F. *Arabidopsis* transcriptional activators *CBF1*, *CBF2* and *CBF3* have matching functional activities[J]. Plant Mol Biol,2004,54(5):767-781
- [18] Jaglo K R, Gilmour S J, Zarka D G, et al. *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance [J]. Science,1998,280(5360):104-106
- [19] 甄伟,陈溪,孙思洋,等. 冷诱导基因的转录因子 *CBF1* 转化油菜和烟草及抗寒鉴定[J]. 自然科学进展,2000,10(12):1104-1108
- [20] Gregor D, Hartmann W, Stsner R. Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers [J]. Acta Hort,1994,359:33-28
- [21] Haymes K M, Henken B, Davis T M, et al. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry [J]. Theor Appl Genet, 1997,94:1097-1101
- [22] Hong L, Walker M A. Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks [J]. HortScience, 1997, 32(7):1264-1622
- [23] Lodhi M A, Ye G N, Weeden N F, et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species[J]. Plant Mol Biol Rep,1994,12:6-13
- [24] 增斌,罗淑萍,李疆. 硅胶干燥野扁桃叶片制备 DNA 样品及其 SSR 反应体系的建立[J]. 经济林研究,2009,27(1):1-6
- [25] Nakano T K, Fujimura S T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Physiol, 2006,140:411-432
- [26] Barros P M, Goncalves N, Saibo N J M, et al. Functional characterization of two almond C-repeat-binding factors involved in cold response[J]. Tree Physiol,2012,32(9):1113-1128.
- [27] 肖艳,林华,杨丽娟,等. 笋竹 *CBF1* 基因的原核表达和多克隆抗体的制备[J]. 园艺学报,2014,41(2):375-381
- [28] 卢晟晔,王丽颖. 大肠杆菌中外源蛋白高效表达的影响因素及策略研究的新进展[J]. 中国实验诊断学,2006,10(9):1100-1103
- [29] 李娟,王泽文,杨利新,等. 小麦 Fe 超氧歧化酶基因的原核表达分析[J]. 西北植物学报,2013,33(11):2147-2152
- [30] Novy R, Drott D, Yaeger K, et al. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression [J]. Innovations, 2001, 12:1-3