

紫花苜蓿 NAC 转录因子 *MsNAC1* 基因的克隆、 生物信息学分析及非生物逆境胁迫下的表达分析

申玉华,徐振军,杨晓坡,相吉山,文 静,黄文婕

(赤峰学院生命科学学院,内蒙古赤峰 024000)

摘要: NAC 转录因子是高等植物所特有的具有多种生物功能的转录因子,在植物生长发育、抵抗逆境和激素调节等过程中发挥着重要作用。本研究利用 RACE-PCR 技术,克隆获得了紫花苜蓿 NAC 转录因子 *MsNAC1* (GenBank 登录号为 JN099384.1) 基因的 cDNA 序列。生物信息学分析显示,*MsNAC1* 基因的开放阅读框(ORF)为 993 bp,编码一个由 330 个氨基酸残基组成的亲水性蛋白,N-端具有保守的 NAM 结构域,C-端高度变异,具备 NAC 转录因子的基本特征;*MsNAC1* 蛋白被定位在细胞核中,含有 2 条核定位信号序列,具有 9 个糖基化位点和 23 个磷酸化位点,三级结构为对称的同型二聚体。多重比对发现,*MsNAC1* 蛋白与拟南芥 ATAF1 和水稻 OsNAC6 蛋白的同源性较高;系统进化分析表明,*MsNAC1* 蛋白属于 NAC 转录因子家族中的 ATAF 亚族,与 ATAF1 的亲缘关系最近。非生物逆境胁迫下的表达分析显示,*MsNAC1* 基因在高盐、干旱和低温胁迫下表达量均呈现先上调后下调的趋势,不同处理时间的差异达到极显著水平,并且根中的表达量上调幅度高于叶片,说明该基因可能参与调控非生物逆境胁迫的生理响应。

关键词: 紫花苜蓿; NAC 转录因子; 基因克隆; 生物信息学分析; 荧光定量 PCR; 非生物逆境

Cloning and Bioinformatics Analysis of a Novel NAC Transcription Factor *MsNAC1* from *Medicago sativa* L. and Detection of Its Expression Under Abiotic Stresses

SHEN Yu-hua, XU Zhen-jun, YANG Xiao-po, XIANG Ji-shan, WEN Jing, HUANG Wen-jie

(College of Life Sciences, Chifeng University, Chifeng Inner Mongolia 024000)

Abstract: NAC are specific novel transcription factors in plants with multiple biological functions, which play an important role in growth and development, stress resistance, and hormonal regulation of plant. In this study, the *MsNAC1* (JN099384.1) gene in *Medicago sativa* L. was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. Bioinformatics analysis showed that *MsNAC1* had an open reading frame (ORF) of 993 bp, encoding a stable, water-soluble protein with 330 amino acids. The *MsNAC1* protein had the basic characteristics of the NAC transcription factors including conserved NAM domain in the N-terminus and highly divergent C-terminus. It was predicted to locate in the nucleus with 2 nuclear localization sequences, and contained 9 glycosylation sites and 23 phosphorylation sites. The tertiary was symmetrical homodimer. Sequence alignment analysis revealed that the structure of *MsNAC1* was predicted to have high homology with ATAF1 in *Arabidopsis thaliana* and OsNAC6 in *Oryza sativa*. Phylogenetic analysis revealed that *MsNAC1* was a member of NAC transcription factor family belonging to ATAF subgroup, and had most close genetic relationship with ATAF1. The expression of *MsNAC1* under abiotic stresses was analyzed by qRT-PCR, its expression levels increased at first but later decreased under high-salinity, drought, and cold stress

收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-03-04 网络出版日期:2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2027.011.html>

基金项目:国家自然科学基金(31360572);内蒙古自然科学基金项目(2011MS0408);内蒙古高等学校科学研究项目(NJZY11219)

第一作者研究方向为植物基因工程。E-mail: nmcfshy@126.com

treatments. The difference among different treatment times were significant at 0.01 level, and the expression level in root was higher than that in leaf which indicating that this gene might participate in regulation of plant abiotic stress response.

Key words: *Medicago sativa* L.; NAC transcription factor; gene clone; bioinformatics analysis; qRT-PCR; abiotic stress

NAC 转录因子是高等植物特有的一类转录因子^[1-3]。其最初命名来源于矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 的 *NAM* 基因^[2]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *ATAF1/2* 和 *CUC1/2* 基因^[4] 首字母的缩写, 这些基因所编码蛋白的 N-端均包含有一段保守的氨基酸序列与 *NAM* 蛋白高度同源, 所以将其称为 NAC 蛋白的结构域^[4]。目前已在大约 20 种植物中发现 NAC 家族转录因子基因^[5], 其中水稻 (*Oryza sativa*) 和拟南芥中分别至少有 151 和 117 个成员^[6], 大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 和柑橘 (*Citrus limonia Osbeck*) 中分别至少有 48 和 45 个成员^[7-8], 大豆 (*Glycine max* L.) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中均至少有 152 个成员^[9-10], 杨树 (*Populus trichocarpa*) 中至少有 163 个成员^[11]。因此, NAC 转录因子被认为是至今发现的植物基因组中最大的转录因子家族之一。NAC 转录因子参与高等植物的诸多生物学过程, 如顶端分生组织的形成^[12-13]、细胞周期的调控^[14]、种子和胚的发育^[15]、花药的发育^[16]、次生根的形成^[17]、次生壁的形成^[18-19]、叶片的衰老^[20-21]、激素信号转导^[7, 20, 22-23], 同时还具有调控逆境胁迫应答的功能^[24-29]。尽管 NAC 转录因子基因的功能还有待深入研究, 但其在植物遗传工程方面已展现出了巨大的应用潜力。拟南芥 NAC 转录因子 *ATAF1* 基因的表达受干旱和 ABA 处理诱导, 负调控渗透胁迫反应^[30]。水稻 (*Oryza sativa* L.) 的 *SNAC1/2* 基因受到干旱、高盐、低温以及 ABA 的诱导表达, 其过表达植株耐冷、抗盐并能抵御干旱, 转 *SNAC1* 基因的水稻在大田里生长正常, 且耐旱性好, 展现出很高的育种价值^[31]。与生物胁迫有关的 NAC 基因还包括水稻的 *OsNAC6*^[32]、*OsNAC109*^[33] 以及辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 的 *CaNAC1*^[34] 等。花生 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* 蛋白序列与拟南芥 RD26 同源性较高, 推测与干旱响应和 ABA 信号传导有关^[35]。

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是畜牧业生产中重要的优质饲草, 含有丰富的蛋白质、矿物质及多种维生素, 大面积种植紫花苜蓿有利于调节气候、改善农业生产环境和生态环境^[36]。然而, 生态环境的劣变导致饲草产量降低、品质下降, 草畜失衡的矛盾日

益加剧, 严重制约了畜牧业的可持续发展, 因此开展牧草抗逆分子机理研究, 提高其抗逆性对我国畜牧业发展和生态环境的改善具有重要意义。截至目前, 对紫花苜蓿 NAC 转录因子研究的报道相对较少, 只有 Y. X. Wang^[37] 克隆了一个紫花苜蓿 NAC 转录因子基因 (*ADK23915.1*), 干旱、高盐和 ABA 均可诱导该基因的表达, 并且转基因拟南芥比野生型具有更强的耐旱性。本研究以 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* 基因序列为基础, 通过 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE, rapid amplification of cDNA ends) 克隆紫花苜蓿逆境相关 NAC 转录因子新基因, 并对其进行生物信息学分析和非生物逆境胁迫下的表达分析, 为应用苜蓿 NAC 基因开展牧草抗逆基因机理研究, 以及通过转基因技术改善牧草抗逆性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用紫花苜蓿中苜 3 号 (Zhongmu 3) 由黑龙江省畜牧研究所惠赠。反转录试剂盒 RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司, 5'-Full RACE Set Agarose Regular 和 3'-Full RACE Set Agarose Regular 试剂盒, RNAiso plus 植物组织总 RNA 提取试剂盒, LA Taq DNA Polymerase, pMD18-T 试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, DNA marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司, 荧光染料 SYBR-Green I 购自 Bio-Rad 公司。引物合成由北京 BIOMED 公司完成。感受态细胞大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因的克隆

1.2.1 紫花苜蓿总 RNA 的提取 紫花苜蓿总 RNA 的提取根据 RNAiso plus 试剂盒的说明书进行。

1.2.2 cDNA 的合成 RACE-PCR 试验所用 cDNA 分别根据 3'-Full RACE Set Agarose Regular 和 5'-Full RACE Set Agarose Regular 的说明书以试剂盒内附带的引物按步骤合成。根据 RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 的说明利用试剂盒内附带的随机引物合成 cDNA。

1.2.3 *MsNAC1* 全长 cDNA 的克隆 以豆科植物

花生 NAC 转录因子基因 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* (EU755023 和 EU755022) 序列为基础,在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 BLAST 搜索,通过相似性比较,发现蒺藜苜蓿 3 号染色体基因组序列 (CU468234) 与 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* 有一段高度同源序列。根据这段同源序列设计特异引物 (MsP1: 5'-ACCAAACGGTTC AAGGCCGAACC-3'、MsP2: 5'-CGATACTCGTGCATGATCCAATTG-3'),对紫花苜蓿 cDNA 进行扩增,反应体系 (20 μ L) 为 cDNA 2 μ L, MsP1 (10 μ mol/L) 1 μ L, MsP2 (10 μ mol/L) 1 μ L, 10 \times LA PCR Buffer 2 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 1 μ L, LA *Taq* (5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 12.75 μ L; 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经凝胶电泳回收后连接至 pMD-18T 载体并转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 挑取阳性克隆测序。根据获得的片段序列,设计 3'RACE 上游引物 (MsP3: 5'-GCCGAACCGGGCGGCTGGGTCTGG-3'),以 3'RACE 专用 cDNA 为模板,以 MsP3 和 3'-Full RACE Set Agarose Regular 试剂盒提供的 Outer Primer (3'ROP) 为引物来完成 3'RACE 片段扩增并测序;根据 3'RACE 测序结果,设计 5'RACE 特异性 inner 和 outer 引物 (MsP4: 5'-CGGTCGGCCTGAACCGTTTGG-3'、MsP5: 5'-AGCCCGGTTTCGGCCTTGAAAC-3'),以 5'RACE 专用 cDNA 为模板,以 MsP4、MsP5 根据 5'-Full RACE Set Agarose Regular 试剂盒说明书要求来完成 5'RACE 片段扩增并测序;拼接得到 *MsNAC1* 基因的全长 cDNA 序列。根据全长 cDNA 序列设计基因 ORF 特异性引物 (MsP6: 5'-ACCAAACGGTTC AAGGCCGAACC-3'、MsP7: 5'-CGATAC TCGTGCATGATCCAATTG-3'),以反转录的 cDNA 为模板克隆 *MsNAC1* 基因 ORF 全长,PCR 反应体系及程序、克隆方法同上,退火温度为 53 $^{\circ}$ C。

1.3 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因的生物信息学分析

根据 *MsNAC1* 基因序列,利用 DNASTAR 中 Edit Seq 的 Find ORF 预测开放阅读框 (ORF),从而推导出氨基酸序列。Blastx 搜索其他物种的相似蛋白,用 DNAMAN 5.2 (Lynnon Corporation, Quebec, Canada) 进行氨基酸序列多重比对和进化树分析;利用 ExPasy 在线工具 ProParam 和 ProtScale (<http://www.expasy.org/tools>) 分析 *MsNAC1* 蛋白的各种氨基酸含量、理论分子量和等电点等的理化参数和疏水性图谱;NCBI CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白的

功能结构域;NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 和 NetGlycate (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/>) 预测蛋白的磷酸化位点和糖基化位点;SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质序列的信号肽;TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质序列的跨膜结构域;ProtComp v. 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry>) 分析蛋白的亚细胞定位情况;SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_opma.html) 预测蛋白的二级结构;SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构。

1.4 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因在非生物逆境胁迫下的表达

用 MS₀ 培养基培养中苜 3 号的种子,出苗 2 周后分别用 250 mmol/L NaCl 溶液、10% PEG6000 溶液、4 $^{\circ}$ C 低温处理 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h,按不同处理提取根和叶的总 RNA;根据 *MsNAC1* 全长 cDNA 序列设计荧光定量表达引物 (MsP8: 5'-TGCACTATTGATTGGTCGGGA-3'、MsP9: 5'-AGTGGCA CCTCGCATGTAGG-3');以紫花苜蓿 *Actin* 基因 (EU664318) 为内参,设计引物 (MsP10: 5'-CAGGTCGTGATCTCACAGACG-3'、MsP11: 5'-TCTTCTCAACAGCTGAGCTCG-3')。用 SYBR Green I 法对不同胁迫处理时间点的样品进行 Real-Time PCR 定量分析,反应体系为 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (2 \times) 12.5 μ L,上游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L,下游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 模板 2.5 μ L,加入 ddH₂O 补足到 25 μ L;反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;最后添加溶解曲线。所用仪器为 ABI7500 Real-Time PCR 仪。相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[38]。用 SAS 8.0 软件对表达量进行方差分析。

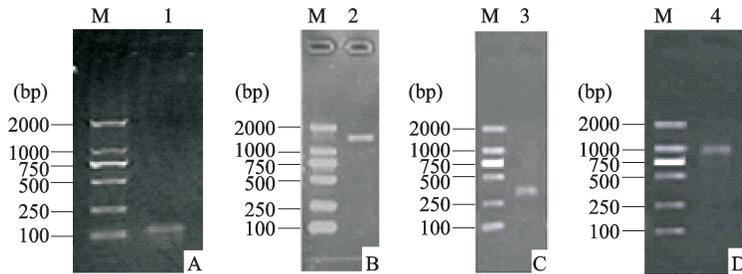
2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因全长 cDNA 克隆

2.1.1 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因的克隆 利用 MsP1、MsP2 对紫花苜蓿反转录 cDNA 进行 PCR 扩增,获得 172 bp 的目标片段 (图 1-A),序列比对显示该片段与 *AhNAC2*、*AhNAC3*、CU468234 的相应序列高度同源,同源性分别为 70%、72%、91%。利用根据该序列设计的引物 MsP3 对 cDNA 进行 3'RACE,获得 1431 bp 的目标片段 (图 1-B),根据测

序结果设计引物 MsP4、MsP5 进行 5'RACE 扩增,获得 432 bp 的目标片段(图 1-C),拼接 3'和 5'RACE 结果得到 1309 bp 的 cDNA 全长序列,命名为 *MsNAC1* 基因(Gene Bank 注册号为 JN099384.1)。通过 Find ORF 分析发现,*MsNAC1* 基因的 ORF 为

993 bp,编码 330 个氨基酸,在 107、150 位置有 2 个核定位信号序列(图 2)。在 ORF 的两端设计引物 MsP6、MsP7,以 cDNA 为模板进行扩增,获得一条 1000 bp 左右的条带(图 1-D),测序结果为 993 bp,与预期片段大小一致。



A: MsP1、MsP2 引物扩增中苜 3 号反转录 cDNA 结果; B: 3'RACE 结果; C: 5'RACE 结果; D: MsP6、MsP7 引物扩增中苜 3 号反转录 cDNA 结果
A: Amplify result of Zhongmu 3 reversed transcription cDNA by primers MsP1 and MsP2, B: Result of 3' RACE, C: Result of 5' RACE, D: Amplify result of Zhongmu 3 reversed transcription cDNA by primers MsP6 and MsP7

图 1 *MsNAC1* 基因的 PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 Amplification result of the *MsNAC1* gene

```

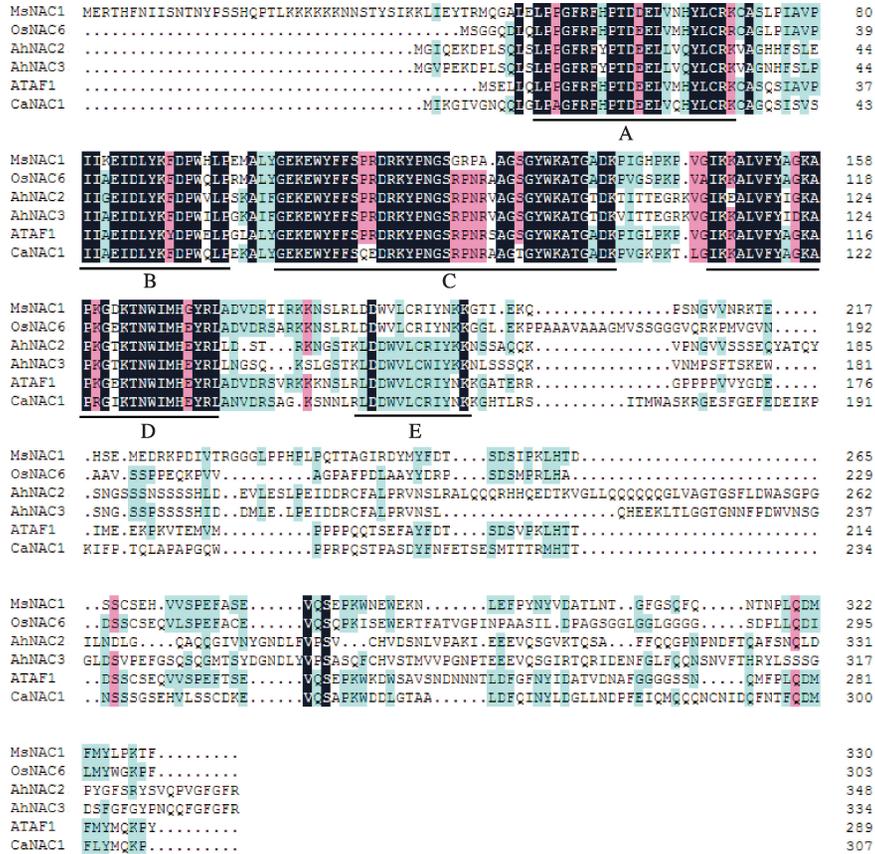
1  ATGGAAGAAGTCACTTCATATCATATCCAACTAATCACTCCCTAGCAGCCACCAACCA
1  M E R T H F N I I S N T N Y P S S H Q P
61  ACACCTGAAGAAGAAGAGAGAGAAACAATAGTACGATATAGTATCAGAAATTAATTGAA
21  T L K K K K K K N N S T Y S I K K L I E
121  TATACCGAATGCAAGGAGCATTAGAATTACCACCTGGCTTCAGATTTCCACCGGATGAT
41  Y T R M Q G A L E L P P G F R F H P T D
181  GATGAGCTTGTCAATCACTACTTGTGTAGAAAGTGTGCTTCCCTCCCTATAGCTGTTCCT
61  D E L V N H Y L C R K C A S L P I A V P
241  ATTATCAAAGAAATTAATTTGATAAGTTTATCCATGGCACTCTCCAGAAATGGCTCTT
81  I I K E I D L Y K F D P W H L P E M A L
301  TACGGTGAAGAAGAGTGGTATTTTTCTCCCAAGGGATCGAAATATCCAAACGGTTCA
101  Y G E K E W Y F F S P R R D R K Y P N G S
361  GGCCGACCGCGGCTGGTCTGGATATTGGAAGGCAACCGGGGCGGATAAACCAATAGGT
121  G R P A A G S G Y W K A T G A D K P I G
421  CACCCTAAACCGTGTGGAATCAGAAAGCTTTGGTGTTTTACGCGGATAAAGCACCTAAA
141  H P K P V G I K K A L V F Y A G K A P K
481  GGTGATAAAACCAATTTGATCATGCACGGGTATCGTTTGGCTGATGTAGATCGCACCAIT
161  G D K T N W I M H G Y R L A D V D R T I
541  CGCAAAAGAACAGCTTAGTGGTATGGTGGTGTTCGCGTATATACACAAAGAA
181  R K K N S L R L D D W V L C R I Y N K K
601  GGTACAATTGAGAAACACCAACCAACCGTGTGTTCACCGGAAACAGACATTCTGAA
201  G T I E K Q P S N G V V N R K I E H S E
661  ATGGAAGACAGGAAGCGGATATTGTGACACCTGGAGGTGGCTTCCACCCATCCTCTT
221  M E D R K P D I V T R G G G L P P H P L
721  CCGCAAACTACCGCTGGAATTAGGGATTACATGTACTTTGACACATCAGATTCCATTCCT
241  P Q T T A G I R D Y M Y F D T S D S I P
781  AAGCTGCACACCGGATTCGAGCTGTTCGGAACCGTGGTGTACCGGAGITTCGAAGTGA
261  K L H T D S S C S E H V V S P E F A S E
841  GTGCAGGTGAGCCTAAGTGGAAACGAGTGGGAAAAGAATCTTGAATTTCCCTTATAATTAT
281  V Q S E P K W N E W E K N L E F P Y N Y
901  GTTGAATGCCACTCTGAACACTGGTTTTGGCTCCCAATTCCAAATACTAATCCGTTGCA
301  V D A T L N T I G G S Q F Q N T N P L Q
961  GATATGTCATGTACTTGCACAAAACCTTTTGA
321  D M F M Y L P K T F *
    
```

下划线部分代表预测的核定位信号序列
The underlined sections are nuclear localization signal sequences

图 2 *MsNAC1* 核苷酸及编码的氨基酸序列
Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequence of *MsNAC1* gene

2.1.2 紫花苜蓿 *MsNAC1* 与其他植物 NAC 类蛋白的多重比对和系统进化分析 与水稻 OsNAC6 (BAA89800.1)、花生 AhNAC2 和 AhNAC3、拟南芥 ATAF1 (CAA52771.1) 以及辣椒 CaNAC1 (AY714222) 进行多重比对结果表明, *MsNAC1* 与拟南芥 ATAF1、水稻 OsNAC6 蛋白的同源性较高, 分别为 64% 和 60%。另外, *MsNAC1* 与其他 NAC 类蛋白一样, N-端的氨基酸序列高度保守, 可以进一步划分为 A~E 5 个保守的亚结构域。C-端虽然与其他植物 NAC 类蛋白一样呈现多样性, 但也有一些保守的氨基酸位点如丝氨酸(S)、甘氨酸(G)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、丙氨酸(A)、天冬酰胺(N), 这是植物转录激活区域的共同特征(图 3)。

利用 DNAMAN 5.2 软件进行 *MsNAC1* 与拟南芥 ATAF1 (CAA52771.1)、AtNTM1 (AEC07970.1)、AtNST3 (AEE31527.1)、AtCUC2 (AAM61198.1)、花生 AhNAC2、AhNAC3、蒺藜苜蓿 MtNST1 (ADK23700.1)、MtNAC100 (XP_003618528.1)、MtSENU5 (XP_003620957.1)、五彩椒 CaNAC1 (AY714222)、棉花 GhNST1 (ADN39414.1)、GhNST2 (ADN39413.1)、GhNAC2 (ACI15342.1)、大豆 GmNAC100 (XP_003524726.1)、大麦 HvNAM (BAG32519.1)、HvNAC (CAM57978.1)、水稻 OsIDEF-1 (BAG32518.1)、OsNAC6、玉米 ZmSPII (AFW81879.1) 系统进化分析表明, *MsNAC1* 与逆境胁迫相关的 NAC 类蛋白同源性较高, 与 ATAF1 的亲缘关系最近, 属于 ATAF 亚族(图 4)。



下划线部分代表 NAC 结构域的 5 个保守亚结构域 A ~ E

The underlined sections are five conservative sub-domains A to E in NAC domain

图 3 MsNAC1 与其他蛋白的 NAC 结构域比对

Fig. 3 Comparison of NAC domain alignments between MsNAC1 and some other proteins

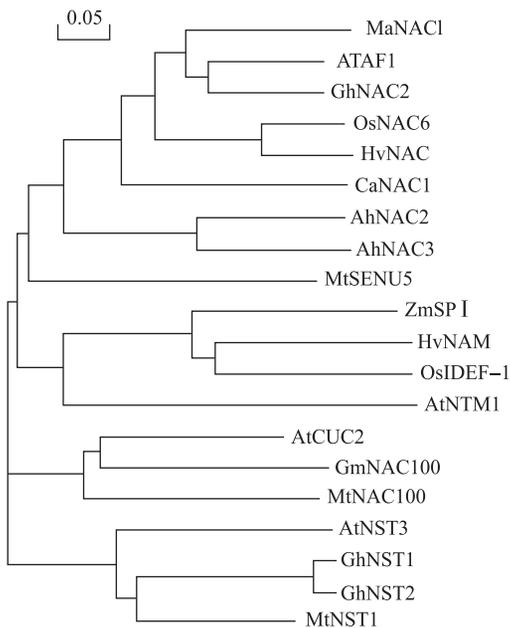


图 4 MsNAC1 与其他植物 NAC 类蛋白系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of MsNAC1 and some other NAC proteins

2.2 紫花苜蓿 MsNAC1 蛋白的理化性质分析及功能预测

2.2.1 MsNAC1 蛋白的理化性质分析 利用 ProtParam 在线软件推测 MsNAC1 蛋白由 330 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 37.9 kD; 由 20 种氨基酸组成, 其中, 赖氨酸 (Lys) 含量最高, 为 9.7%, 半胱氨酸 (Cys) 含量最低, 为 1.2%; 推测的理论等电点 PI 为 9.19, 脂肪系数为 62.06, 不稳定系数 (instability index) 为 35.61。ProtScale 在线软件预测 MsNAC1 多肽链第 78 位具有最高的分值 (2.144) 和最强的疏水性; 第 27 位具有最低的分值 (-3.167) 和最强的亲水性; 整体表现为 N-端为亲水区、C-端区域为疏水区, 整条多肽链平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.795, 表现为亲水性。

2.2.2 MsNAC1 蛋白的功能结构域预测与分析 利用 NCBI CDD (Conserved Domain Database) 数据库分析 MsNAC1 蛋白的保守结构域发现 (图 5), 在 N-端第 50 ~ 174 位氨基酸之间有一个典型的由 125 个氨基酸组成的 NAM 保守结构域。由此推断, 紫花苜蓿 MsNAC1 基因属于 NAC 家族转录因子。

利用 NetGlycate 1.0 和 NetPhos 2.0 在线软件预测 *MsNAC1* 蛋白的糖基化位点和磷酸化位点发现, *MsNAC1* 基因编码的蛋白含有 9 个糖基化位点(25、36、37、71、83、137、163、182、199)和 23 个磷酸化位点,磷酸化位点包括 11 个丝氨酸(S)磷酸化位点(17、31、34、110、120、127、185、219、256、267、274)、4 个苏氨酸(T)磷酸化位点(21、59、179、216)和 8 个酪氨酸(Y)磷酸化位点(14、33、88、101、107、116、

298、300)。

2.2.3 *MsNAC1* 蛋白的二级结构预测 利用 SOPMA 对 *MsNAC1* 蛋白的二级结构进行预测发现(图 6),该蛋白的二级结构中包括 68.49% 的无规卷曲结构、16.06% 的 α -螺旋结构、2.42% 的 β -转角和 13.03% 的延伸链结构。无规则卷曲结构所占的比例最高,其主要作用是连接其他二级结构元件,如 α -螺旋、 β -转角和延伸链。

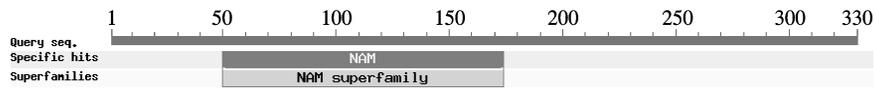
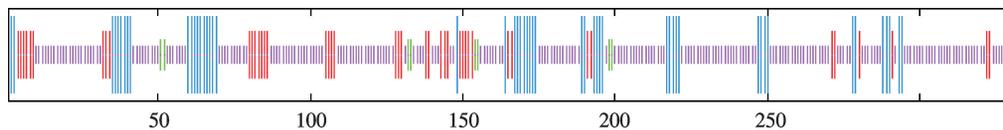


图 5 *MsNAC1* 蛋白的保守结构域

Fig. 5 Conserved domain of *MsNAC1* protein



蓝色: α -螺旋; 红色: 延伸链; 绿色: β -转角; 浅紫色: 无规则卷曲

Blue: Alpha helix, Red: Extended strand, Green: Beta turn, Purple: Random coil

图 6 *MsNAC1* 蛋白的二级结构预测

Fig. 6 Predicted secondary structure of *MsNAC1* protein

2.2.4 *MsNAC1* 蛋白的三级结构预测 利用 SWISS-MODEL 对 *MsNAC1* 蛋白结构域氨基酸的三级结构进行预测发现(图 7), *MsNAC1* 蛋白结构域是一个对称的同型二聚体,每个单体由多个螺旋环绕一个反向平行的 β -折叠构成,两单体通过精氨酸(R)和谷氨酸(E)间的氢键或盐桥形成二聚体,在二聚体表面的一侧富含正电荷,可能与 DNA 结合有关。

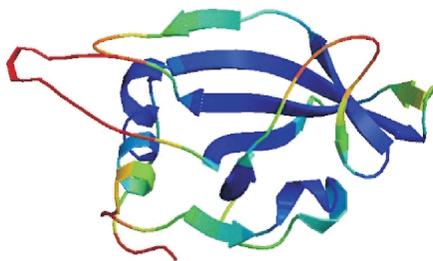


图 7 *MsNAC1* 蛋白三级结构预测

Fig. 7 The tertiary structure prediction of *MsNAC1* protein

2.2.5 *MsNAC1* 蛋白的核定位预测 利用 SignalP 4.0 Server 和 TMHMM 2.0 Server 对 *MsNAC1* 进行信号肽预测和跨膜结构分析,结果显示 *MsNAC1* 氨基酸序列没有信号肽也不包含跨膜结构域,说明不是膜结合蛋白,也不是分泌蛋白。ProtComp v. 9.0 亚细胞定位分析显示,细胞核、细胞质、线粒体、细胞骨架、内质网的得分依次为 60.9%、21.7%、8.7%、4.3%、

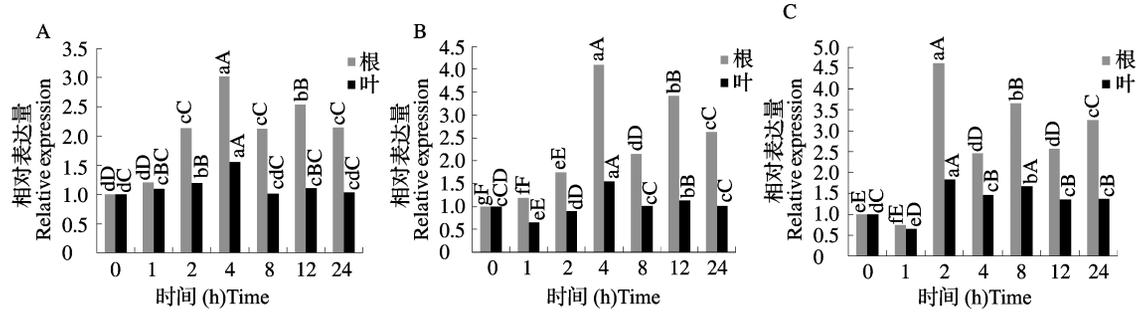
4.3%,推测 *MsNAC1* 蛋白可能定位在细胞核内。

2.3 紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因在非生物逆境胁迫下的表达分析

为了进一步探讨 *MsNAC1* 基因的功能,将紫花苜蓿分别在 250 mmol/L NaCl 溶液、10% PEG 6000 溶液、4 $^{\circ}$ C 条件下培养 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h,发现 3 种非生物逆境胁迫下,根和叶中的表达量随着处理时间的延续均呈现先上调后下调的趋势(图 8);峰值分别出现在处理 4 h、4 h、2 h 时,并且不同处理时间表达量的差异均达到极显著水平。说明紫花苜蓿 *MsNAC1* 基因可能参与高盐、干旱、低温胁迫的生理响应,并且根中的表达量上调幅度大于叶片。

3 讨论

NAC 转录因子不仅是当前植物基因功能及表达网络调控研究中的热点,而且已经成为提高农作物抗逆能力及作物品质改良的基因工程研究目标^[24,39-41]。紫花苜蓿作为全球范围内的重要牧草,有着多种抗性。本研究利用 RACE 技术,克隆到紫花苜蓿 1 个 NAC 转录因子 *MsNAC1* (GenBank 注册号为 JN099384.1) 基因,编码蛋白与逆境相关的 NAC 类蛋白同源性较高,与拟南芥 ATAF1 亲缘关系较近,属于 ATAF 亚族。



A:250 mmol/L NaCl;B:10% PEG6000;C:4 °C

不同大小写字母分别表示差异达到显著、极显著水平

Different capital and small letters mean the significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively

图8 *MsNAC1* 基因在胁迫诱导后的相对表达量

Fig. 8 The relative expression of *MsNAC1* gene induced by stress

X. Zhong 等^[42]的研究表明,NAC 蛋白是亲水性蛋白。本研究发现紫花苜蓿 NAC 类蛋白 *MsNAC1* 是由 330 个氨基酸残基组成的稳定的亲水性蛋白,N-端具有 NAC 转录因子典型的保守 NAM 结构域,高度变异的 C-端具有一些保守的氨基酸位点,符合植物 NAC 转录因子的基本特征^[43]。细胞内许多蛋白质的功能是通过蛋白质翻译后修饰来调控的^[44]。其中,糖基化修饰位点与蛋白质的定位以及细胞内信号转导等过程有关,磷酸化修饰位点与植物代谢、基因表达、细胞分化和增殖密切相关^[45]。*MsNAC1* 蛋白含有 9 个糖基化位点和 23 个磷酸化位点,推测可能存在多种翻译后修饰及表达调控方式,具有一因多效性。NAC 家族转录因子的 N-端具有高度保守的 NAM 结构域,已经发现大量 NAC 转录因子的 NAM 保守结构域具有核定位序列,并且通过瞬时表达试验证实定位在细胞核中^[46-50]。本研究在 *MsNAC1* 蛋白序列中发现了 2 条核定位信号序列,并且通过 ProtComp 预测表明其与大多数 NAC 转录因子一样定位在细胞核中,是一个核蛋白,这 2 个结果相互印证,并支持了 *MsNAC1* 是作为一个转录因子发挥调控功能的结论。

NAC 转录因子家族一些基因具有调控逆境胁迫应答^[24-26]的功能,并且存在一因多效性。刘旭等^[35]的研究发现,花生的 NAC 转录因子 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* 基因在干旱、低温、外源 ABA、外源 GA 处理下表达量均上调,但对高盐处理不敏感。才华等^[51]的研究发现,野生大豆 NAC 转录因子 *GsNAC20* 基因在高盐胁迫下表达量短期内迅速上调;在干旱胁迫下,叶中表达量下调,根中早期上调;在低温胁迫下,叶中表达初期受到抑制、后期上调,根中早期下调,后期上调。Y. X. Wang^[37]克隆到的紫花苜蓿 NAC 转录因子基因(ADK23915.1),同时参与调控

耐旱、耐盐等性状。本研究发现,紫花苜蓿 NAC 转录因子 *MsNAC1* 基因在高盐、干旱、低温胁迫下表达量均呈现先上调后下调的趋势,不同处理时间的差异达到极显著水平,并且根中的表达量上调幅度大于叶片,说明 *MsNAC1* 基因可能参与调控植物非生物胁迫的生理响应,属于非生物胁迫反应中早期应答基因。本研究还发现,*MsNAC1* 蛋白与拟南芥 *ATAF1*、水稻 *OsNAC6* 蛋白的同源性较高。*ATAF1* 基因的表达受干旱和 ABA 处理诱导,负调控渗透胁迫反应^[30];*OsNAC6* 基因是响应生物和非生物逆境胁迫的 NAC 转录因子,在低温、干旱和高盐胁迫下其表达量均上调,且转基因水稻明显提高对高盐和干旱的抗性^[32]。说明 *MsNAC1* 与 *ATAF1*、*OsNAC6* 具有相似的基因功能和相近的蛋白结构。

NAC 转录因子具有普遍的生物学功能多效性,如 *ATAF1*^[52]、*ANAC019* 和 *ANAC055*^[53] 等同时在非生物逆境抗性、抗病性中具有生物学功能,该特点决定 NAC 转录因子在植物育种实践中存在较高的应用潜力。本试验克隆的紫花苜蓿 NAC 转录因子 *MsNAC1* 基因可能对非生物逆境胁迫具有多重功效,在苜蓿抗逆性遗传改良中具有一定的利用价值。但该基因是否具有其他生物学功能,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jin H, Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family[J]. *Plant Mol Biol*,1999,41:577-585
- [2] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries[J]. *Cell*,1996,85(2):159-170
- [3] 柳展基,邵凤霞,唐桂英. 植物 NAC 转录因子的结构功能及其表达调控研究进展[J]. *西北植物学报*,2007,27(9):1915-1920
- [4] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ sepa-

- ration in *Arabidopsis*, analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6):841-857
- [5] 刘旭,李玲.植物 NAC 转录因子的研究进展[J].*生命科学研究*,2008,12(4):297-302
- [6] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice [J]. *Gene*, 2010, 465:30-44
- [7] Christiansen M W, Holm P B, Gregersen P L. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4:302
- [8] de Oliveira T M, Cidade L C, Gesteira A S, et al. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses [J]. *Tree Genet Genomes*, 2011, 7:1123-1134
- [9] Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress [J]. *DNA Res*, 2011, 18:263-276
- [10] Rushton P J, Bokowiec M T, Han S C, et al. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147:280-295
- [11] Hu R, Qi G, Kong Y, et al. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10:145-178
- [12] Takada S, Hibara K, Ishida T, et al. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation [J]. *Development*, 2001, 128:1127-1135
- [13] Vroemen C W, Mordhorst A P, Albrecht C, et al. The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15:1563-1577
- [14] Kim Y S, Kim S G, Park J E, et al. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18:3132-3144
- [15] Zhang H J, Wu J F, Hu S, et al. Isolation and expression analysis of *BcNAC2*, a NAC transcription factor gene in *turnip* [J]. *Acta Horti Sin*, 2011, 38:1089-1096
- [16] 李捷,陈旭,罗莉琼,等. *ANAC092* 参与调控花药发育的功能初探 [J]. *遗传*, 2013, 35(7):913-922
- [17] Hao Y J, Wei W, Song Q X, et al. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants [J]. *Plant J*, 2011, 68:302-313
- [18] Hussey S G, Mizrahi E, Spokevicius A V, et al. *SND2*, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus* [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11:173
- [19] Ohtani M, Nishikubo N, Xu B, et al. A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar [J]. *Plant J*, 2011, 67:499-512
- [20] Zhang K, Gan S S. An abscisic acid-activated protein phosphatase 2c regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158:961-969
- [21] Yoon H K, Kim S G, Kim S Y, et al. Regulation of leaf senescence by NTL9-mediated osmotic stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Mol Cells*, 2008, 25:438-445
- [22] Jensen M K, Kjaersgaard T, Nielsen M M, et al. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of *ANAC019* stress signaling [J]. *Biochem J*, 2010, 426(2):183-196
- [23] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *BBA-Gene Regul Mech*, 2012, 1819(2):97-103
- [24] Xue G P, Way H M, Richardson T, et al. Overexpression of *TaNAC69* leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat [J]. *Mol Plant*, 2011, 4:697-712
- [25] Mao X, Zhang H, Qian X, et al. *TaNAC2*, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63:1-14
- [26] Yang R, Deng C, Ouyang B, et al. Molecular analysis of two salt-responsive NAC-family genes and their expression analysis in tomato [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38:857-863
- [27] 丁晓辉,任丽萍,张春荣,等. Cd^{2+} 胁迫对紫花苜蓿叶绿素和可溶性糖含量的影响 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(1):64-66
- [28] Yang Q C. *Guide of alfalfa production and manage* [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 2003:8-68
- [29] Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Wang H, et al. An NAC transcription factor orchestrates multiple features of cell wall development in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2010, 63(1):100-114
- [30] Lu P L, Chen N Z, An R, et al. A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63:289-305
- [31] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:12987-12992
- [32] Nakashima K, Tran L P, Nguyen D V, et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice [J]. *Plant J*, 2007, 51:617-630
- [33] Lin R M, Zhao W S, Meng X B, et al. Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Sci*, 2007, 172:120-130
- [34] Oh S K, Lee S, Yu S H, et al. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (*CaNAC1*) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens [J]. *Planta*, 2005, 222:876-887
- [35] 刘旭,李玲.花生 NAC 转录因子 *AhNAC2* 和 *AhNAC3* 的克隆及转录特征 [J]. *作物学报*, 2009, 35(3):541-545
- [36] de Zelicourt A, Diet A, Marion J, et al. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence [J]. *Plant J*, 2012, 70(2):220-230
- [37] Wang Y X. Characterization of a novel *Medicago sativa* NAC transcription factor gene involved in response to drought stress [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(11):6451-6458
- [38] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25:402-408
- [39] Zheng X N, Chen B, Lu G J, et al. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem J*. *Biophys Res Commun*, 2009, 379(4):985-989
- [40] Jeong J S, Kim Y S, Baek K H, et al. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(1):185-197
- [41] Liu X, Hong L, Li X Y, et al. Improved drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(3):443-450
- [42] Zhong R, Lee C, Ye Z H. Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2):1044-1055
- [43] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2):79-87