



大豆 *GmNAC131* 基因的生物信息学及表达分析

万会娜, 于月华, 王 怡, 倪志勇

(新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: NAC 基因在多种作物中具有抵御生物与非生物胁迫的作用, 为了分析大豆 *NAC131* 基因的功能, 本研究从 Williams 82 大豆中克隆 *GmNAC131* 基因, 对该基因及其编码蛋白质的特征、结构、功能及不同组织的表达量进行生物信息学分析; 采用 qRT-PCR 方法分析非生物胁迫后不同时间段基因的诱导表达。结果表明: *GmNAC131* 基因 cDNA 全长 1 945 bp, 开放阅读框长 1 053 bp, 编码 350 个氨基酸, 蛋白质分子量为 39.49 ku, 等电点为 7.62。 *GmNAC131* 基因组包含 3 个外显子和 2 个内含子。 *GmNAC131* 蛋白在 16 ~ 166 位氨基酸处含有 1 个高度保守的 NAC 结构域。编码蛋白中没有信号肽, 没有跨膜结构, 蛋白质组成具有疏水性。 *GmNAC131* 定位在细胞核中, 具有 8 个糖基化位点和 34 个磷酸化位点。 *GmNAC131* 蛋白与野大豆、豇豆、绿豆及豌豆的 NAC 蛋白具有较高的相似性, 与 GsNAC 在相同分支。转录组数据表明 *GmNAC131* 基因在大豆不同组织中都表达, 在根中表达量最高, 在叶中表达量最低。4 °C 低温胁迫 24 h 过程中 *GmNAC131* 基因表达量波动变化; 250 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫 12 h 表达量出现最大值; 30% PEG6000 胁迫 0.5 h 表达量最高; 100 μmol·L⁻¹ ABA 胁迫 6 h 表达量达到最大值。表明大豆该基因可能参与响应高盐和干旱等非生物胁迫。

关键词: 大豆; *GmNAC131* 基因; NAC 转录因子; 非生物胁迫

Bioinformatics and Expression Analysis of *GmNAC131* Gene in Soybean

WAN Hui-na, YU Yue-hua, WANG Yi, NI Zhi-yong

(College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: NAC genes have the resistant function to the biological and abiotic stress in many crops. In order to explore the function in soybean, this study cloned a NAC gene *GmNAC131* from Williams 82 and analyzed the characteristics of the gene and its coding protein sequence, the protein structure and function, and the expression level of the gene in different tissues by bioinformatics. We analyzed the induced expression of abiotic stress at different time periods by fluorescence quantitative. The cDNA length of *GmNAC131* was 1 945 bp, and the open reading frame (ORF) was 1 053 bp. *GmNAC131* encoded 350 amino acids, with a molecular weight of 39.49 ku and an isoelectric point of 7.62, contained 3 exons and 2 introns. *GmNAC131* contained a highly conserved NAC domain at amino acids from 16 to 166. There was no signal peptide, no transmembrane structure, and the protein composition was hydrophobic. *GmNAC131* was located in the nucleus with 8 glycosylation sites and 34 phosphorylation sites. *GmNAC131* had a high similarity with NAC proteins of *Glycine soja*, *Vigna unguiculata*, *Mucuna pruriens*, and *Cajanus cajan*, and shared the same branch with GsNAC. Transcriptome data showed that *GmNAC131* gene was expressed in different tissues of soybean, with the highest expression in root and the lowest expression in leaf. The expression of *GmNAC131* gene fluctuated during 24 h of low temperature stress at 4 °C, the expression peaked at 12 h under 250 mmol·L⁻¹ NaCl stress, reached its maximum at 0.5 h under 30% PEG6000 stress and reached its maximum at 6 h under 100 mol·L⁻¹ ABA stress. It suggested that the gene might be involved in abiotic stresses such as salt tolerance and drought tolerance in soybean.

Keywords: Soybean; *GmNAC131* gene; NAC transcription factor; Abiotic stress

NAC 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 广泛分布于苔藓植物到高等双子叶植物中, 其名称起源于矮牵牛 NAM (No Apical Meristem)、拟南芥 ATAF1/2 和 CUC2 (Cup-shaped Cotyledon) 基因^[1]。其 N 端约含 150 个氨基酸组成的保守结构域, 可以分为 A ~ E 共 5 个保守区, 通常负责与特定的 DNA 序列结合^[2]; C 端序列变化较大, 富含氨基酸, 如丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸等氨基酸的

重复序列^[3-4]。NAC 结构域不包含任何已知的蛋白结构域, 而是以几个螺旋元件包围着 1 个扭曲的 β-折叠结构代替了典型的螺旋-转角-螺旋结构^[5]。NAC 家族转录因子参与植物生物和非生物胁迫的响应过程^[6-7]。现有研究发现, NAC 家族基因的诱导表达能提高植物体的耐旱、耐冷、抗盐能力^[8-10]以及对病虫害的抵御能力具有显著促进作用^[11-13]。因此, NAC 转录因子不仅是当前植物基因功能及表

收稿日期: 2020-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31860295, 31660295); 天山青年计划 (2018Q018, 2018Q002); 新疆农业大学作物学重点学科发展基金 (XNCDKY201908); 新疆农业大学研究生科研创新项目 (XJAUGRI2020004)。

第一作者: 万会娜 (1994—), 女, 在读硕士, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: 972268927@qq.com。

通讯作者: 倪志勇 (1981—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: nizhiyong@126.com。

达网络调控研究的热点,也成为利用基因工程实现作物品质改良、提高农作物抗逆能力的研究靶标^[14]。张进艳等^[15]发现水分胁迫下 16 个 NAC 转录因子编码基因在玉米幼苗、根、茎、叶中均不同程度的上调或下调,ATAF 亚族的基因在各个时期的根、茎、叶中都上调表达,如与 *ATAF1/2*、*OsNAC6* 和 *SNAC2* 高度同源的 *GRMZM2G014653_P01* 和 *GRMZM2G180328_P01* 基因在根、茎、叶中的表达量都上调。Nakashima 等^[16]对 *OsNAC6* 的研究表明,ATAF 亚族的 *OsNAC6* 参与胁迫响应过程。Mao 等^[17]研究发现过表达转基因玉米中 *ZmNAC111* 可提高苗期耐旱性,提高水分利用效率,诱导水分胁迫下干旱响应基因的上调。

研究显示,大豆(*Glycine max*)中有多个 *GmNAC* 基因在植物的发育及应答胁迫方面具有重要功能。Melo 等^[18]研究发现 *GmNAC065* 和 *GmNAC085* 的瞬时表达可诱导叶片衰老特征的出现,包括叶绿素损失、叶片黄化、脂质过氧化物等。Tran 等^[4]通过系统发育分析鉴定出 139 个 *GmNAC* 基因,并将其分为 17 个亚组,对于干旱胁迫和无胁迫叶片组织实时定量 PCR 分析得到 28 个脱水应答基因,确认了 *GmNAC* 基因表达实际上依赖于基因型。在此范围内被选中的 8 个基因(*GmNAC004*、*GmNAC021*、*GmNAC065*、*GmNAC066*、*GmNAC073*、*GmNAC082*、*GmNAC083* 和 *GmNAC087*) 在胁迫后具有较高的表达水平。Hao 等^[19]在大豆中鉴定了多个 NAC 基因,确定了 *GmNAC11* 和 *GmNAC20* 两个基因编码的蛋白质定位于细胞核,并结合到核心 DNA 序列 CGT,过表达 *GmNAC11* 具有提高作物耐盐性的功能,*GmNAC20* 很可能是通过调节激活 DREB/CBF-COR 通路,并可能通过改变生长素信号相关基因来控制侧根的发育。Shuo 等^[20]发现盐胁迫条件下过表达 *GmSIN1* 促进了大豆的根系生长和耐盐性,进而提高了盐胁迫条件下产量,RNA 干扰介导的 *GmSIN1* 基因敲除具有相反的作用。

尽管目前关于 *GmNAC131* 基因的研究报道较少,但通过其它作物 *NAC131* 的研究结果可以推测该基因在植物抵御生物与非生物胁迫方面发挥重要作用。Sepideh 等^[21]从高粱基因中鉴定出 131 个编码 183 个蛋白质的 *SbNAC* 基因,根据系统进化树的拓扑结构获得 13 种 *SbNAC* 蛋白聚类于 *SNAC* 亚家族,其中包括 *SbNAC131* 在内的这些蛋白有望参与对非生物胁迫的反应。Sun 等^[22]鉴定了 2 个水稻致病应答 NAC 转录因子 *ONAC122* 和 *ONAC131*,结果表明二者均通过调控其它防御和信号相关基因的表达,在水稻抗病应答中发挥重要作用。黄

磊^[23]分析发现 *ONAC131* 启动子含有 4 个 ABRE、4 个 MYB、10 个 MYC、6 个 W-box 和 1 个 GCC-box,推测 *NAC131* 在生物和非生物逆境胁迫中可能都发挥作用;验证发现 *ONAC131* 嵌合抑制子能够增强对白叶枯病菌的抗性,降低了对盐害、干旱及冷害的耐受力。本研究克隆 *GmNAC131*,对其编码蛋白质的理化性质、保守功能域、二级和三级结构特征和相关生物学功能进行生物信息学分析^[1],采用 qRT-PCR 分析 *GmNAC131* 在 4 种胁迫下的表达量,为进一步研究 *GmNAC131* 转录因子的生物学功能及其在大豆逆境育种中的应用提供信息和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为栽培品种 Williams 82,由本课题组植物逆境分子生物学课题平台提供。

1.2 试验设计

根据数据库 Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 中大豆 *Glyma.17G101500.1* 基因序列设计引物进行基因的克隆和测序。采用生物信息学分析方法建立基因编码蛋白的物种进化树,分析蛋白基本性质、结构、亚细胞定位和组织特异性表达等情况。

大豆在温室中水培 25 d 后,取样置于液氮速冻,并保存于 -80°C 冰箱备用。分别在 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、30% PEG6000、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 和 4°C 水培条件下进行非生物胁迫,各处理分别胁迫 0,0.5,2,4,6,12 和 24 h,采用 qRT-PCR 方法分析基因的表达情况。

1.3 方法

1.3.1 *GmNAC131* 基因全长序列的获得及克隆
使用 DNAMAN 8.0 设计特异性引物 *nGmNAC131-F* ($5'-\text{CGAAATCGTGATTCTGTTGTTCTTTTGA}-3'$) 和 *nGmNAC131-R* ($5'-\text{TTAGTAATTCCACAAACCATCAAGATCCAA}-3'$),由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。使用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 提取根 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 RNA;使用 FastKing RT Kit (With gDNase) FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化有限公司) 合成 cDNA。以 cDNA 为模板克隆 *GmNAC131* 基因,PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min; PCR 产物置于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并使用 Bio-Rad 紫外凝胶成像仪观察;将目的片段连接到 pJET1.2 克隆载体 (Thermo Fisher),转化 (*E. coli*) DH5 α 大肠杆菌菌株的感受态细胞,挑选阳性克隆

菌株送上海美季公司测序。

1.3.2 生物信息学分析 采用 NCBI 数据库中的 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析 *GmNAC131* 基因序列的 ORF;采用 Blastx 搜索其它物种的相似蛋白,采用 DNAMAN 8.0 进行氨基酸多序列比对,并通过 Clustalx 与 MEGA 5.05 建立系统进化树。

使用 ProtParam (physico-chemical parameters of a protein sequences <http://web.expasy.org/protparam/>)在线程序计算大豆 *GmNAC131* 编码蛋白的分子量、等电点等理化参数,使用 BioEdit 软件的 Kyte & Doolittle 方法计算蛋白质序列的疏水性分布;利用在线软件 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)分析大豆 *GmNAC131* 蛋白的功能结构域;使用 NetGlycate 1.0 和 NetPhos 2.0 在线软件预测 *GmNAC131* 蛋白的糖基化位点和磷酸化位点。

使用在线程序 COILS(http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)预测蛋白卷曲螺旋结构;采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测 *GmNAC131* 蛋白二级结构;采用 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三级结构;利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)在线程序和 iPSORT 数据库 (<http://ipsort.hgc.jp/predict.cgi>)预测蛋白质信号肽;利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)在线程序分析蛋白质的可能跨膜区。

使用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLoc.cgi>)进行亚细胞定位预测分析;利用 Phytozome v12.1 检索分析 *GmNAC131* 基因的组织特异性表达情况。

1.3.3 非生物胁迫下基因的表达分析 使用 TR-

Izol 试剂盒 (Invitrogen) 提取根 RNA;使用 FastKing RT Kit(With gDNase)FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化有限公司)反转录成 cDNA。使用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR,反应体系为(20 μL):2.0 μL cDNA,10.0 μL 2 × TransStart Tip Green qPCR SuperMix,正反向引物各 0.4 μL,7.2 μL ddH₂O。使用 Thermofisher ABI7500 进行 qRT-PCR,反应程序为:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 荧光信号采集 30 s,40 个循环。检测每份样品的目的基因和内参基因 Ct 值,3 次重复。

1.4 数据分析

使用相对定量 2^{-ΔΔCt} 方法计算 qRT-PCR 结果,利用 GraphPad Prism 5 软件进行统计制图,方法参照王萍等^[24]。

使用 IBM SPSS Statistis 19.0 进行统计分析,利用 Student-Newman-Keulsa 同类子集法及邓肯检验同时分析比对数据。

2 结果与分析

2.1 *GmNAC131* 的克隆及序列分析

从大豆中克隆了 1 个 NAC 基因 *GmNAC131*,该基因 cDNA 全长 1 945 bp,开放阅读框长 1 053 bp,编码 350 个氨基酸,蛋白质分子量为 39.49 ku,等电点为 7.62。经过序列分析发现,大豆基因 *GmNAC131* 包含 3 个外显子和 2 个内含子。功能结构域预测结果表明,*GmNAC131* 蛋白在 16 ~ 166 位含有 1 个高度保守的 NAC 结构域(图 1),推测大豆 *GmNAC131* 所编码蛋白属于 NAC 转录因子。*GmNAC131* 蛋白不存在信号肽、线粒体靶向或叶绿体转运肽,不存在跨膜区。蛋白定位在细胞核内,与 NAC 转录因子的特点相符。

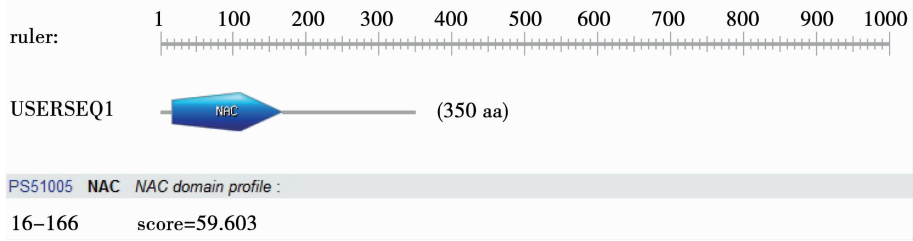


图 1 大豆 *GmNAC131* 蛋白的功能结构域分析

Fig.1 Functional domain analysis of soybean *GmNAC131* protein

2.2 大豆 *GmNAC131* 蛋白与其它植物 NAC 类蛋白的多序列比对和系统进化分析

大豆 *GmNAC131* 蛋白的同源性比对结果显示,*GmNAC131* 蛋白与野大豆 *GsNAC* (*Glycine soja*, XP_028208725.1)、豇豆 *VuNAC* (*Vigna unguiculata*, XP_

027915454.1)、绿豆 *VrNAC* (*Vigna radiata* var. *radiata*, XP_014507026.1) 及蠶豆 *MpNAC* (*Mucuna pruriens*, RDX76218.1) 的 NAC 蛋白具有较高的一致性,分别为 99.71%、89.77%、87.82% 和 88.15%。*GmNAC131* 蛋白的 C-端氨基酸中脯氨酸(P)、丝

氨酸(S)、亮氨酸(L)、天冬氨酸(D)和谷氨酸(G) 一个分支,此外与豇豆、木豆、绿豆的 NAC 蛋白具有
频繁出现(图2),符合植物转录激活区域的共同特 同源关系(图3)。
征。系统进化树显示,该蛋白与野大豆 GsNAC 同在

大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	MEVNVVVCREDQMDLPPGFRFHPDDEELISHYLYKKVVDTKFCARAIGEVDLNKSEPWDLPWKAKMGEK	70
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	MEKLSLLSRDQHHMDLPPGFRFHPDDEELISHYLYKKVVDTKFCARAIGEVDLNKSEPWDLPWKAKMGEK	70
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	MEVNVVVCREDQMDLPPGFRFHPDDEELISHYLYKKVVDTKFCARAIGEVDLNKSEPWDLPWKAKMGEK	70
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	MEVNVVVCREDQMDLPPGFRFHPDDEELISHYLYKKVVDTKFCARAIGEVDLNKSEPWDLPWKAKMGEK	70
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	MEKLSLLSRDQHHMDLPPGFRFHPDDEELISHYLYKKVVDTKFCARAIGEVDLNKSEPWDLPWKAKMGEK	70
Consensus	me k d mdlppgfrfhptdeeli hlyl kvi fcaraigevdlnksepwdlpwkakmgek	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	EWYFFCVRDRKYPTGLRNRATEAGYWKATGDKKEIFRGKSLVGMKKTLLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYR	140
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	EWYFFCVRDRKYPTGLRNRATEAGYWKATGDKKEIFRGKSLVGMKKTLLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYR	140
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	EWYFFCVRDRKYPTGLRNRATEAGYWKATGDKKEIFRGKSLVGMKKTLLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYR	140
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	EWYFFCVRDRKYPTGLRNRATEAGYWKATGDKKEIFRGKSLVGMKKTLLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYR	140
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	EWYFFCVRDRKYPTGLRNRATEAGYWKATGDKKEIFRGKSLVGMKKTLLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYR	140
Consensus	ewyffcvdrdkyptglrnrategaywkatkdkkeifrgkslvgmkkllvfyrgrapkgeksnwvmhey	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	LEGKFSVHNLPKTAKNEWVICRVFQKSSAGKKTHTISGIMRLDSFADELGSSALPPLSDSSPSIGNTKPKLN	210
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	LEGKFSVHNLPKTAKNEWVICRVFQKSSAGKKTHTISGIMRLDSFADELGSSALPPLSDSSPSIGNTKPKLN	210
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	LEGKFSVHNLPKTAKNEWVICRVFQKSSAGKKTHTISGIMRLDSFADELGSSALPPLSDSSPSIGNTKPKLN	203
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	LEGKFSVHNLPKTAKNEWVICRVFQKSSAGKKTHTISGIMRLDSFADELGSSALPPLSDSSPSIGNTKPKLN	210
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	LEGKFSVHNLPKTAKNEWVICRVFQKSSAGKKTHTISGIMRLDSFADELGSSALPPLSDSSPSIGNTKPKLN	210
Consensus	legkfsvhnlpktaknewvicrvfqkssagkkthtisgimrldsfaelgssalpplsdspsigntkp	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	DIAYVPCFSNPIDVORNGCVFDSFTNSMGVSNLPMGILPRMPSPSFSYSTQGVGCAAPNLAFPGSVVT	279
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	ESAYVPCFSNPIDVORNGCVFDSFTNSMGVSNLPMGILPRMPSPSFSYSAQGVCAVPNLTFPGSVVS	280
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	DSAYVPCFSNPIDVORNGCVFDSFTNSMGVSNLPMGILPRMPSPSFSY...ACAPNPTFPSSVVA	268
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	DIAYVPCFSNPIDVORNGCVFDSFTNSMGVSNLPMGILPRMPSPSFSYSTQGVGCAAPNLAFPGSVVT	279
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	ESAYVPCFSNPIDVORNGCVFDSFTNSMGVSNLPMGILPRMPSPSFSYSSQGVCAVPNLTFPGSVVS	279
Consensus	ayvpcfsnpi qrnq gv ds ns y vs n lprmpss sfy q pn fp svy	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	LQDHTILRLCENNG..YKPERDMISVSQETGLTLDINAETSSNFMGRPHEDHNNHSSVSAVFLDLDG.	346
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	LQDHTILRLCENNGSGYKPERDMISVSQETGLTLDINPETSSNFMGRPHEDHNNHSSVSAVFLDLDG.	349
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	LQDNNILRLCENNG..YKPERDMISVSQETGLTLET...TSSNFDLAREPHEDHNNHSSVSAVFLDLDG.	333
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	LQDHTILRLCENNG..YKPERDMISVSQETGLTLDINAETSSNFMGRPHEDHNNHSSVSAVFLDLDG.	346
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	LQDHTILRLCENNGGYKPERDMISVSQETGLTLDINPETSSNFMGRPHEDHNNHSSVSAVFLDLDG.	348
Consensus	lqd lr cennq yk erdmisvsqet ltt tssnfd rr f n nh svsvap dldg	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1WNY.....	350
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1WNY.....	353
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	GRTASDTSFSEVACSSCFSGLDQYSPANTEVTVKTKSLRNKSSENKESFASGTSNLLVKMTRKNKP	403
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1WNY.....	350
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1WNY.....	352
Consensus	1	
大豆 GmNAC131, XP_003549684.1	350
绿豆 VrNAC, XP_014507026.1	353
豌豆 MpNAC, RDX76218.1	RRISDKATAIENQSIERSSTWAVE	427
野大豆 GsNAC, XP_028208725.1	350
豇豆 VuNAC, XP_027915454.1	352
Consensus		

黑色背景序列表示一致性为 100% 的序列。
The black background color represents the sequence alignment results with 100% consistency.

图2 大豆 GmNAC131 蛋白与其它植物 NAC 类蛋白的多序列比对
Fig.2 Sequence comparison between GmNAC131 of soybean and NAC proteins of other plant

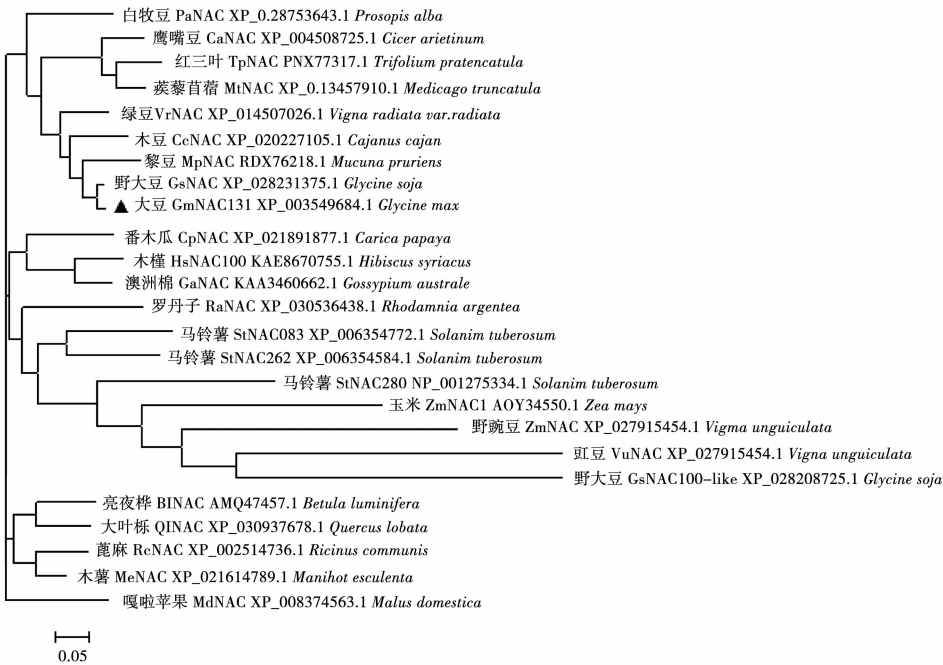


图3 大豆 GmNAC131 与其它植物 NAC 转录因子的系统进化树分析
Fig.3 Phylogenetic tree analysis on GmNAC131 of soybean and NAC transcription factors of other plant

2.3 GmNAC131 基因编码蛋白的基本性质分析

GmNAC131 蛋白由 20 种氨基酸组成,其中丝氨酸含量最丰富,占总数的 8.6%,赖氨酸和色氨酸含量最低,各占总数的 1.7% 和 2.0%。负电荷残基(天冬氨酸和谷氨酸)有 42 个,正电荷残基(精氨酸和赖氨酸)有 43 个,该蛋白酸碱氨基酸基本平衡,蛋白偏中性。脂肪系数为 65.17,不稳定系数为 35.93,属于稳定蛋白。GmNAC131 的 N-端为亲水区,C-端区域为疏水区,多肽链第 340 位具有最高的分值 1.0,此处具有最强的疏水性;第 85 位具有最低的分值 -2.25 和最强的亲水性。整条多肽链

平均疏水性(GRAVY)为 -0.515(图 4),该蛋白是亲水性较强的蛋白^[1]。

GmNAC131 基因编码的蛋白含有 8 个糖基化位点(9、42、55、98、131、144、155、296)和 34 个磷酸化位点,磷酸化位点中包括 17 个丝氨酸磷酸化位点(111、146、167、168、176、183、191、197、199、200、202、234、258、303、305、319、336)、13 个苏氨酸磷酸化位点(25、41、84、88、92、100、118、173、212、236、262、312、318)和 4 个酪氨酸磷酸化位点(96、214、240、295)。

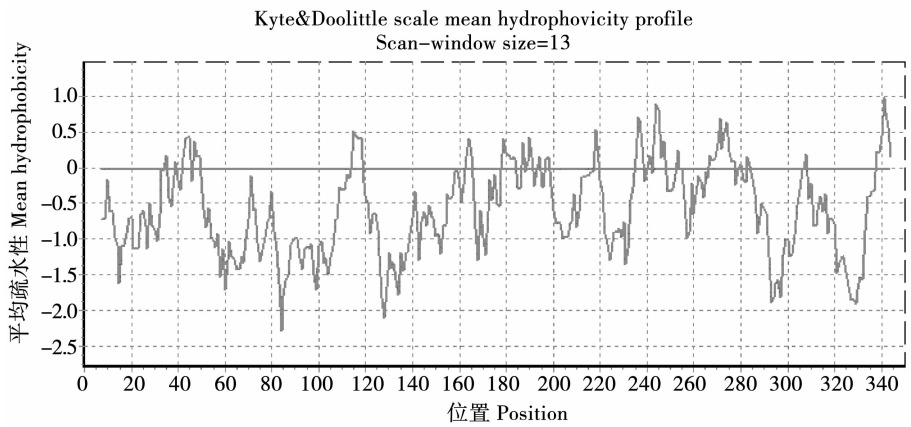


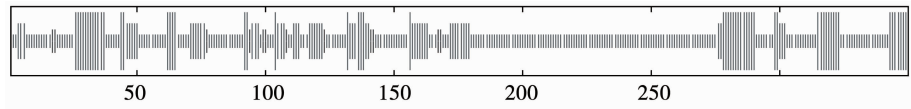
图 4 蛋白质序列的疏水性分布

Fig. 4 Hydrophobic distribution of protein sequences

2.4 大豆 GmNAC131 蛋白的二级和三级结构预测

GmNAC131 蛋白的二级结构中包括 64.29% 无规则卷曲、16.86% 的 α -螺旋、15.43% 的延伸带和

3.43% 的 β -转角(图 5)。使用 Swiss-Model 进行蛋白三级结构预测,结果显示其与水稻 *SNAC1* (3ulxA) 模型最相似(图 6),同源性达 49.69%。



最长竖线: α -螺旋;次长竖线:延伸带;第三长竖线: β -转角;最短竖线:无规则卷曲

The longest vertical line: Comb-screw; The second vertical line: Extension belt; The third vertical line: Corner; The shortest vertical line: Random curl

图 5 GmNAC131 蛋白的二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure prediction of GmNAC131 protein

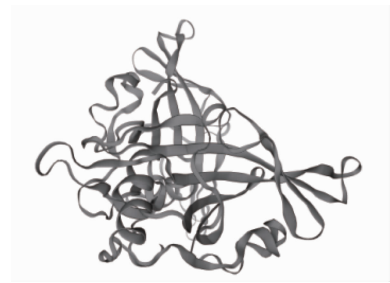


图 6 GmNAC131 蛋白的三级结构预测

Fig. 6 Tertiary structure prediction of GmNAC131 protein

2.5 组织特异性表达分析

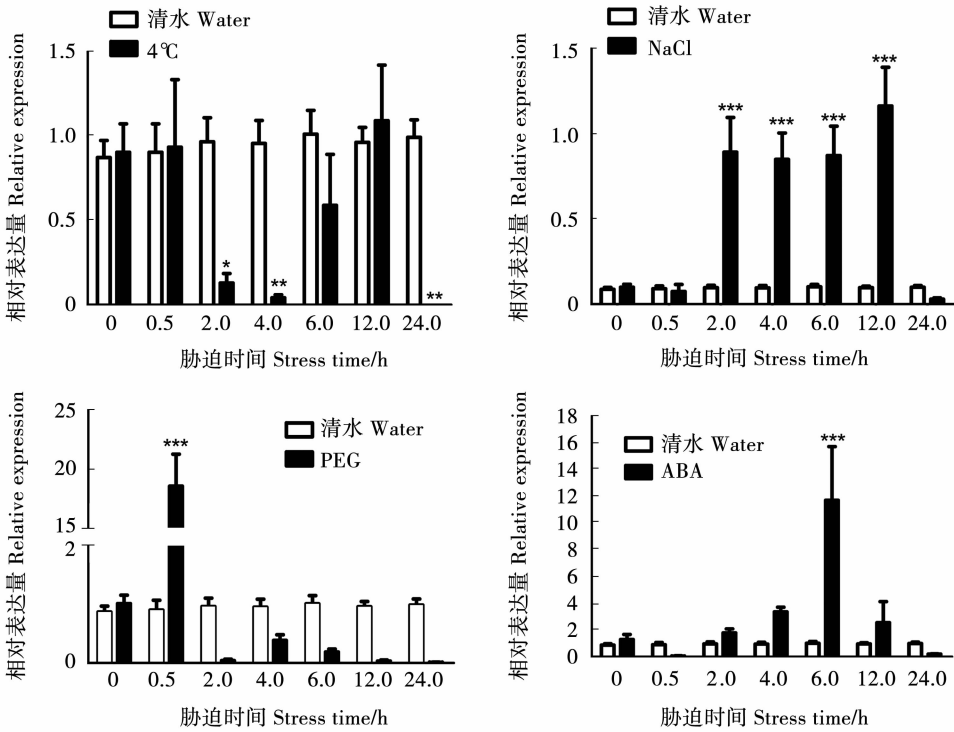
GmNAC131 基因在大豆的不同组织中均有表达,大豆根中 *GmNAC131* 基因的表达量最高,达到 41.422;种子与花中的表达仅次于根的表达量,分别为 15.581 和 13.669;在叶中表达量最低,仅为 0.703(表 1)。结果表明,在大豆不同组织中均有 *GmNAC131* 基因的参与,且在大豆营养生长和生殖生长阶段均起到一定的调控作用。

表 1 大豆 *GmNAC131* 基因的组织特异性表达
Table 1 Tissue specific expression of soybean *GmNAC131* gene

组织 Tissue	百万外显子的碱基片段 Fragments per kilo base of exon per million fragments mapped (FPKM)
茎 Stem	4.228
种子 Seed	15.581
根 Root	41.422
荚 Pod	7.201
根瘤 Nodule	3.949
根毛 Root hairs	4.750
叶 Leaf	0.703
花 Flower	13.669

2.6 不同胁迫时间内大豆 *GmNAC131* 的表达分析
在 4℃ 低温胁迫 2~4 h, 与常温处理相比大豆 *GmNAC131* 显著或极显著降低, 随后逐渐升高, 24 h

再次降到最低表达量。250 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫 2~12 h 表达量较高, 与清水处理在 $P < 0.001$ 水平存在极显著差异, 随后表达量下降。30% PEG6000 胁迫下, 0.5 h *GmNAC131* 的表达量迅速达到了最大值, 并与清水对照处理在 $P < 0.001$ 水平存在极显著差异, 随后迅速下降。100 μmol·L⁻¹ 的 ABA 胁迫诱导 *GmNAC131* 表达上调, 在 6 h 时段达到最大值, 并与清水对照处理在 $P < 0.001$ 水平存在极显著差异(图 7)。结果表明, 大豆在受到低温、NaCl、PEG6000 和 ABA 胁迫处理后, *GmNAC131* 基因的表达量均不同程度受到诱导, 该基因对低温胁迫、盐胁迫、干旱胁迫及脱落酸的诱导均有响应, 但出现显著性差异及峰值的胁迫时间段不尽相同, 这可能和参与不同非生物胁迫反应的调控网络途径及应激反应速度的差别有关。大豆 *GmNAC131* 很可能在参与冷胁迫、盐胁迫及干旱胁迫等非生物胁迫中发挥重要功能。



A: 低温胁迫; B: NaCl 胁迫; C: PEG 胁迫; D: ABA 胁迫。*、** 和 *** 分别表示清水对照与胁迫处理间在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 水平存在差异。
A: Low temperature stress; B: NaCl stress; C: PEG stress; D: ABA stress. *, ** and *** mean there is difference between water control and stress treatments at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ level respectively.

图 7 大豆 *GmNAC131* 在非生物逆境胁迫下的表达分析
Fig. 7 Expression of *GmNAC131* under abiotic stress

3 讨论

NAC 转录因子编码基因 *GmNAC131* 具有 3 个外显子和 2 个内含子, 倪志勇等^[25] 研究发现大豆 *GmNAC115* 同样具有 3 个外显子和 2 个内含子,

Meng 等^[26] 研究发现 *GmNAC1* ~ *GmNAC6* 都含有 2 个内含子, 表明这些 GmNAC 具有保守的基因组结构。
大多数的转录因子存在于细胞质中, 进入细胞核后被激活行使其转录调控基因表达的功能, 本研

究在 *GmNAC131* 编码的蛋白序列中虽然没有发现核定位序列,但 ProtComp 预测显示其与大多数 NAC 转录因子一样,*GmNAC131* 蛋白定位于细胞核中,是一个核蛋白,预测结果支持了 *GmNAC131* 是作为一个转录因子发挥调控功能的观点^[27]。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^[28]。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^[29-30],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^[31-32],这些修饰使蛋白质的结构更复杂,功能更完善,调节更精细,作用更专一^[33-34]。糖基化和磷酸化位点预测 *GmNAC131* 蛋白含有 8 个糖基化位点和 34 个磷酸化位点,表示该蛋白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,也就是说 *GmNAC131* 转录因子很可能同时响应多种胁迫环境并起到相应的调控作用。*GmNAC131* 蛋白与同为 NAC 转录因子家族的水稻 *SNAC1* (*3ulxA*) 模型最相似,推测 *GmNAC131* 蛋白也具有与之相似的生物学功能。研究显示,*NAC1* (*SNAC1*) 转录因子能够显著提高水稻的耐盐性和抗旱性^[35]。水稻蛋白磷酸酶 (*PP2C*) 基因 *OsPPI8* 的突变使活性氧清除酶基因表达下调,导致活性氧清除酶的活性降低,水稻对氧化胁迫的敏感性增强,而 *OsPPI8* 作为应激反应性下游基因受到 *NAC1* (*SNAC1*) 的调控^[36]。水稻 *OsSRO1c* 基因被鉴定为 *SNAC1* (应激反应性 *NAC1*) 的直接靶基因,参与调控气孔孔径和氧化反应。*SNAC1* 可以与 *OsSRO1c* 的启动子结合并激活 *OsSRO1c* 的表达,通过降低气孔开度减少水分流失,提高应对高盐及干旱胁迫的耐受性^[37]。*GmNAC131* 转录因子很可能类似地通过调控下游相关基因的方式在提高作物抗逆性方面发挥重要功能。

NAC 转录因子广泛参与植物的生长发育、器官建成、激素调节和胁迫应答^[6]。Nguyen 等^[38]将受干旱诱导的 *GmNAC109* 基因转入拟南芥,发现转基因植物的耐旱性有所提高,其存活率比野生型植物高 20% ~ 54%。此外,抗氧化酶分析表明, *GmNAC109* 转基因植物在干旱胁迫下具有较强的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性。这表明 *GmNAC109* 在 ABA 信号通路中作为一种正转录调节因子能够提高植物应对缺水条件的能力。组织特异性表达分析结果表明, *GmNAC131* 在检测的所有组织中均有表达,这表明在大豆的营养生长及生殖生长阶段, *GmNAC131* 都发挥一定的调控作用。

本研究中的大豆 *GmNAC131* 基因在盐胁迫及外源 ABA 胁迫后上调表达,表达量的差异分别达到

极显著和显著水平,说明该基因很可能参与高盐与 ABA 胁迫的生理响应。对大豆 *GmNAC131* 在非生物逆境胁迫下的表达分析发现该基因对低温胁迫、盐胁迫、干旱胁迫及脱落酸的诱导均有响应,由于不同胁迫下代谢反应速度的差异,大豆 *GmNAC131* 受到胁迫诱导后表达量出现峰值的时间段不尽相同。研究结果为进一步了解 *GmNAC131* 基因在大豆逆境胁迫中的生物学功能奠定理论基础。

4 结 论

本研究从大豆中克隆大豆 *GmNAC131* 基因,该基因具有 3 个外显子和 2 个内含子, ORF 长 1 053 bp,编码 350 个氨基酸,基因序列与现有 NAC 基因序列相似,具有 NAM 保守结构域。其编码产生的 *GmNAC131* 转录因子的结构预测、跨膜区和定位预测结果符合 NAC 转录因子的特征,系统进化树分析发现该蛋白与野大豆 *GsNAC* 在同一个分支。糖基化和磷酸化位点预测显示该蛋白可能存在多种翻译后修饰及表达调控方式, *GmNAC131* 转录因子很可能同时响应多种胁迫环境并起到相应的调控作用。大豆 *GmNAC131* 在大豆的根、茎、叶、花、豆荚、种子、根毛、根瘤中均有表达,根中表达量最高,叶中表达量最低,推测该基因在大豆营养生长及生殖生长阶段均发挥作用。非生物逆境胁迫下该基因对低温胁迫、盐胁迫、干旱胁迫及脱落酸的诱导均有响应。本研究为进一步了解 *GmNAC131* 转录因子在大豆逆境胁迫中的生物学功能及其分子机制奠定理论基础,同时可为大豆逆境育种研究提供参考依据。

参考文献

- [1] 康桂娟,曾日中,聂智毅,等. 巴西橡胶树 NAC 转录因子 *HbNAC1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(34): 1-11. (Kang G J, Zeng R Z, Nie Z Y, et al. Cloning and bioinformatics analysis of the gene of NAC transcription factor *HbNAC1* in Brazilian rubber tree[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(34): 1-11.)
- [2] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice[J]. Gene, 2010, 465(1-2): 30-44.
- [3] Yoshii M, Yamazaki M, Rakwal R, et al. The NAC transcription factor RIM1 of rice is a new regulator of jasmonate signaling[J]. Plant Journal, 2010, 61(5): 804-815.
- [4] Tran L S P, Quach T N, Guttikonda S K, et al. Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 281(6): 647-664.
- [5] Ernst H A, Olsen A N, Skriver K, et al. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of

transcription factors[J]. *Embo Reports*, 5(2):297-303.

[6] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, et al. NAC proteins; Regulation and role in stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(6):369-381.

[7] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2):97-103.

[8] Schulz P, Romeis H T. Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2):523-530.

[9] 王永鑫, 刘志薇, 吴致君, 等. 茶树中 2 个 NAC 转录因子基因的克隆及温度胁迫的响应[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(11):14-22. (Wang Y X, Liu Z W, Wu Z J, et al. Cloning of two NAC transcription factor genes in tea plants and response to temperature stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(11):14-22.)

[10] Hu H, Dai M, Yao J, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(35):12987-12992.

[11] 王凤涛, 蔺瑞明, 徐世昌. 小麦 3 个 NAC 转录因子基因克隆与功能分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 4(6):37-43. (Wang F T, Liu R M, Xu S C. Cloning and functional analysis of three NAC transcription factor genes in wheat [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 4(6):37-43.)

[12] 张娟. 基因枪法介导的 *OsNAC1*、*GFP* 和 *Thp1* 基因转化小麦的研究[D]. 江苏:扬州大学, 2012. (Zhang J. Study on gene markers-mediated transformation of *OsNAC1*, *GFP* and *Thp1* genes in wheat [D]. Jiangsu: Yangzhou university, 2012.)

[13] 孙玉燕, 范敏, 何艳军. 西瓜 NAC 转录因子全基因组鉴定及其对黄瓜绿斑驳花叶病毒的胁迫应答[C]. 青岛:中国园艺学会 2018 年学术年会, 2018. (Sun Y Y, Fan M, He Y J. Genome-wide identification of watermelon NAC transcription factor and its stress response to cucumber green mottled mosaic virus [C]. Qingdao: The 2018 annual conference of Chinese Society for Horticultural Science, 2018.)

[14] 李伟, 韩蕾, 钱永强, 等. 植物 NAC 转录因子的种类、特征及功能[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4):596-606. (Li W, Han L, Qian Y Q, et al. Types, characteristics and functions of plant NAC transcription factors [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(4):596-606.)

[15] 张进艳, 陈芳, 李亮, 等. 水分胁迫下 16 个玉米 NAC 转录因子的序列特征和表达分析[J]. *山西农业科学*, 2014, 42(4):307-312. (Zhang J Y, Chen F, Li L, et al. Sequence characteristics and expression analysis of 16 NAC transcription factors in maize under water stress [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2014, 42(4):307-312.)

[16] Nakashima K, Tran L S 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 Journal*, 2007, 51(4):617-630.

[17] Mao H, Wang H, Liu S, et al. A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings[J]. *Nature Communications*, 2015, 6:8326.

[18] Melo B P, Fraga O T, Silva J C F, et al. Revisiting the soybean GmNAC superfamily [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:01864.

[19] 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 Journal*, 2011, 68(2):302-313.

[20] Shuo L, Nan W, Dandan J, et al. A *GmSINI/GmNCED3s/GmRbohBs* feed-forward loop acts as a signal amplifier that regulates root growth in soybean exposed to salt stress[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31:2107-2130.

[21] Sanjari S, Shirzadian-Khorramabad R, Shobbar Z, et al. Systematic analysis of NAC transcription factors' gene family and identification of post-flowering drought stress responsive members in sorghum[J]. *Plant Cell Reports*, 2019.

[22] Sun L J, Zhang H J, Li D Y, et al. Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 81(1-2):41-56.

[23] 黄磊. 水稻 NAC 转录因子 ONAC131、MNAC1 和 ONAC095 在抗病抗逆中的功能研究[D]. 杭州:浙江大学, 2015. (Huang L. Functional study of NAC transcription factors ONAC131, MNAC1 and ONAC095 in rice against disease resistance [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.)

[24] 王萍, 于月华, 白玉翠, 等. 大豆 *GmNAC23* 基因的克隆及特征分析[J]. *华北农学报*, 2019, 34(1):50-57. (Wang P, Yu Y H, Bai Y C, et al. Cloning and characterization of *GmNAC23* gene from soybean [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(1):50-57.)

[25] 倪志勇, 于月华, 陈全家, 等. 大豆 *GmNAC115* 基因克隆及特征分析[J]. *大豆科学*, 2016, 35(5):754-759. (Ni Z Y, Yu Y H, Chen Q J, et al. Cloning and characterization of soybean *GmNAC115* gene [J]. *Soybean Science*, 2016, 35(5):754-759.)

[26] Meng Q C, Zhang C H, Gai J Y, et al. Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(8):1002-1012.

[27] He Z, Jinpu J, Liang T, et al. Plant TFDB 2.0: Update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(1):1114-1117.

[28] 叶强, 金晓琴, 刘伟娜, 等. 植物蛋白质 N-糖基化修饰研究进展[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 121(1):86-92. (Ye Q, Jin X Q, Liu W N, et al. Advances in nglycosylation modification of plant proteins [J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2016, 121(1):86-92.)

[29] 王志凤. 小黑杨花芽和叶芽糖基化蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2014. (Wang Z F. Glycosylated proteomics of small black poplar flower bud and leaf bud [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014.)

[30] 王洋, 崔继哲, 周静, 等. 植物表达重组蛋白的 N-糖基化研究进展[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(10):174-179. (Wang Y, Cui J Z, Zhou J, et al. Advances in N-glycosylation of plant expressed recombinant proteins[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(10):174-179.)

[31] 陈婕妤. 水稻磷酸盐转运体 PHT1 家族翻译后调控的分子机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2013. (Chen J Y. Molecular mechanism of post-translational regulation of rice phosphate transporter PHT1 family [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.)

[32] 甄艳, 李春映, 陆叶, 等. 植物磷酸化蛋白质组研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 56(6):245-254. (Zhen Y, Li C Y, Lu Y, et al. Advances in the study of plant phosphorylated proteome [J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 56(6): 245-254.)

[33] 许治永. ATP/GTP 结合和磷酸化修饰对于 LjCYC 蛋白调控百脉根两侧对称花型的发育至关重要[D]. 北京:中国科学院大学; 上海:中国科学院上海生命科学研究院; 上海:植物生理与生态研究所, 2014. (Xu Z Y. ATP/GTP binding and phosphorylation are crucial for the regulation of the development of bilateral symmetrical flower patterns of LjCYC [D]. Beijing: University of Chinese academy of sciences; Shanghai: Shanghai Institutes for Biological Sciences; Shanghai: Science of Plant Physiology and Ecology, 2014.)

[34] 申玉华, 徐振军, 杨晓坡, 等. 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[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(6): 1312-1319. (Shen Y H, Xu Z J, Yang X P, et al. Cloning, bioinformatics analysis and expression analysis of NAC transcription factor *MsNAC1* gene in alfalfa under abiotic stress [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(6): 1312-1319.)

[35] Shanaz P, Sudip B, Samsad R, et al. Salinity and drought tolerance conferred by in planta transformation of SNAC1 transcription factor into a high-yielding rice variety of Bangladesh [J]. Acta Physiol Plant, 2015, 37(4): 68.

[36] You J, Zong W, Hu H, et al. A SNAC1-regulated protein phosphatase gene *OsPPI8* modulates drought and oxidative stress tolerance through ABA-independent reactive oxygen species scavenging in rice[J]. Plant Physiology, 2014, 166:2100-2114.

[37] Jun Y, Wei Z, Xiaokai L, et al. The SNAC1-targeted gene *OsSRO1c* modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2): 569-583.

[38] Nguyen C N, Xuan L T H, Quang T N, et al. Ectopic Expression of *Glycine max GmNAC109* enhances drought tolerance and ABA sensitivity in *Arabidopsis*[J]. Biomolecules, 2019, 9: 714-729.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
黑龙江省农业科学院大豆研究所
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所