

大豆 *GmNAC73-like* 基因的克隆和表达及其对 *GmIFS2* 基因的影响

万 群, 刘晓庆, 张大勇^①, 何晓兰, 徐照龙, 宁丽华, 黄益洪, 邵宏波^①

(江苏省农业科学院农业生物技术研究所 江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为研究 NAC 转录因子对大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 异黄酮合成的影响, 根据大豆基因组序列设计引物, 从豆荚中克隆获得 *GmNAC73-like* 基因, 并对该基因序列进行生物信息学分析。结果显示: *GmNAC73-like* 基因包含 1 个长度 981 bp 的完整开放阅读框, 编码 326 个氨基酸。GmNAC73-like 蛋白的理论相对分子质量 37 000, 理论等电点 pI 6.4, 为亲水性蛋白, 无信号肽, 并被定位在细胞核上, 包含核定位信号“PKRRK”。同源性比对结果显示: GmNAC73-like 蛋白与野大豆 (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、可可 (*Theobroma cacao* Linn.)、葡萄 (*Vitis vinifera* Linn.) 及拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 的 NAC 蛋白具有较高的相似性, 相似度分别为 93%、69%、73%、75% 和 58%。在 NJ 系统树上, GmNAC73-like 蛋白与野大豆的 GsNAC8 蛋白和木豆 [*Cajanus cajan* (Linn.) Millsp.] 的 CcNAC8 蛋白聚在一起, 显示出较近的亲缘关系。半定量 RT-PCR 分析结果显示: 在大豆的三叶期、开花期和结荚期, *GmNAC73-like* 基因在根中均不表达, 在茎和叶中可不同程度表达且茎中表达量较高; 而在开花期或结荚期, 该基因在花或豆荚中也可表达, 且豆荚中表达量较高。酵母单杂交实验结果显示: *GmNAC73-like* 可与异黄酮生物合成关键酶基因 *GmIFS2* 启动子中的 CGTG 基序结合; 在大豆转基因发状根系中过表达 *GmNAC73-like* 基因后, 除查尔酮异构酶基因的表达量无变化外, 其他异黄酮生物合成相关基因的表达量均不同程度提高, 其中, 肉桂酸-4-羟化酶基因和查尔酮合酶基因的表达量明显提高。此外, 在 *GmNAC73-like* 基因过表达的大豆转基因发状根系中总异黄酮含量显著降低。综合分析结果表明: *GmNAC73-like* 可能通过与 MYB 转录因子的互作调控 *GmIFS2* 基因的表达, 并在大豆异黄酮的生物合成过程中起负调控作用。

关键词: 大豆; *GmNAC73-like* 基因; 蛋白特性; 表达特性; *GmIFS2* 基因; 总异黄酮含量

中图分类号: Q786; S565.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)03-0012-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.03.02

Cloning and expression of *GmNAC73-like* gene from *Glycine max* and its effect on *GmIFS2* gene

WAN Qun, LIU Xiaoqing, ZHANG Dayong^①, HE Xiaolan, XU Zhaolong, NING Lihua, HUANG Yihong, SHAO Hongbo^① (Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Institute of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25 (3): 12-18, 27

Abstract: In order to study the effect of NAC transcription factor on isoflavone synthesis of *Glycine max* (Linn.) Merr., primers were designed according to genome sequence from *G. max*, *GmNAC73-like* gene was cloned from pod of *G. max*, and bioinformatic analysis of this gene sequence was carried out. The results show that *GmNAC73-like* gene includes a whole open reading frame with length of 981 bp, 326 amino acids are encoded. Theoretical relative molecular mass of GmNAC73-like protein is 37 000, theoretical isoelectric point is pI 6.4, which is a hydrophilic protein without signal peptide, it is located in nucleus and contains nuclear localization signal “PKRRK”. The homology alignment result shows that GmNAC73-like protein has a high similarity with NAC protein from *Glycine soja* Sieb. et Zucc., *Medicago*

收稿日期: 2016-05-04

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK20130727); 江苏省农业三新工程项目[SXGC(2016)335]; 江苏省农业科技自主创新资金项目[Cx(15)1005]; 江苏省“双创计划”人才项目

作者简介: 万 群(1982—), 女, 四川成都人, 博士, 助理研究员, 主要从事大豆耐盐分子生物学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: cotton.z@126.com; shaohongbochu@126.com

truncatula Gaertn., *Theobroma cacao* Linn., *Vitis vinifera* Linn. and *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., with a similarity degree of 93%, 69%, 73%, 75% and 58%, respectively. In NJ phylogenetic tree, *GmNAC73-like* protein, *GsNAC8* protein from *G. soja* and *CcNAC8* protein from *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp. are clustered together, showing close phylogenetic relationship. The semi-quantitative RT-PCR analysis result shows that at trefoil, flowering and pod setting stages, *GmNAC73-like* gene has no expression in root, and has different degrees of expression in stem and leaf, and has a higher expression in stem; while at flowering or pod setting stages, this gene also has expression in flower or pod, and has a higher expression in pod. The result of yeast one-hybrid experiment shows that *GmNAC73-like* can bind to CGTG motif in promoter of key enzyme gene *GmIFS2* of isoflavone biosynthesis. After over expression of *GmNAC73-like* gene in transgenic hairy roots of *G. max*, except expression of chalcone isomerase gene without change, expression of other related genes of isoflavone biosynthesis is enhanced with different degrees, in which, that of cinnamic acid-4-hydroxylase gene and chalcone synthase gene is enhanced obviously. In addition, total isoflavone content in transgenic hairy roots of *G. max* with over expression of *GmNAC73-like* gene decreases significantly. The comprehensive analysis result shows that *GmNAC73-like* may regulate expression of *GmIFS2* gene by interaction with MYB transcription factor, and plays a negative regulation in isoflavone biosynthesis process of *G. max*.

Key words: *Glycine max* (Linn.) Merr.; *GmNAC73-like* gene; protein characteristics; expression characteristics; *GmIFS2* gene; total isoflavone content

异黄酮为黄酮类化合物,主要分布在部分豆科 (Fabaceae) 种类中。大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 中异黄酮含量约为其他豆科植物的 100 倍,加之大豆是人类的主要食物营养来源,因此人们对大豆异黄酮进行了广泛的研究^[1]。大豆异黄酮能减少特定癌症的发生率^[2]、减轻妇女更年期综合征^[3]、预防冠状动脉心脏病、积极影响神经行为活动^[4],对植物则能增强植株抗病性^[5]、提高固氮能力^[6]。异黄酮通过苯丙氨酸路径的分支合成,苯丙烷代谢途径的前 3 步酶促反应依次由苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 和 4-香豆素辅酶 A 连接酶 (4CL) 催化完成;香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 在查尔酮合酶 (CHS) 催化下生成查尔酮 (chalcone), 从而进入类黄酮代谢途径;豆科植物特有的查尔酮还原酶 (CHR) 与 CHS 共同催化生成异甘草素,后经豆科植物特有的异黄酮合酶 (IFS2) 催化合成各种异黄酮异构体;而查尔酮异构酶 (CHI) 催化查尔酮生成的黄烷酮产物柚皮素 (naringenin) 是类黄酮化合物的基本骨架^[7-8]。

NAC 蛋白是植物特有的一类转录因子家族,其 N 端含 1 个高度保守的 DNA 结合区域和 1 个核定位信号序列^[9],其 C 端具有较大的变异性,是转录激活功能区^[10]。NAC 蛋白主要在植物的生长、发育以及激素信号中发挥作用^[11];部分 NAC 蛋白在生物和非生物胁迫信号中也有一定作用。除刘晓庆等^[12]曾报道大豆 *GmNAC011* 基因通过参与调控 *GmIFS2* 基因的表达调控异黄酮的合成外,NAC 蛋白在异黄酮代谢过程

中的作用尚不十分清楚。

作者在克隆大豆 *GmNAC73-like* 基因的基础上,对其进行生物信息学分析,利用半定量 RT-PCR 技术分析 *GmNAC73-like* 基因的组织表达特性,并采用酵母单杂交技术分析 *GmNAC73-like* 蛋白与 *GmIFS2* 基因启动子中 CGTG 基序的结合情况,同时测定 *GmNAC73-like* 基因过表达对异黄酮合成途径关键酶基因表达及总异黄酮含量的影响,以期为 NAC 类转录因子参与调控异黄酮合成的分子机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为本实验室保存的大豆品种 'Williams 82' 种子。

1.2 方法

1.2.1 播种及取样 将供试大豆种子播于盆钵并置于温室中,于温度 25 °C、光照时间 16 h · d⁻¹ 和光照度 1 000 lx 的条件下培养;分别在三叶期、开花期和结荚期采集根、茎、叶、花和豆荚,置于液氮中速冻,并于 -80 °C 保存、备用。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将上述样品分别在液氮中研磨后使用 SV Total RNA Isolation Z3100 System 试剂盒 (美国 Promega 公司) 提取总 RNA,用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量;

使用反转录试剂盒 PrimeScript Reverse Transcriptase D2680[宝生物工程(大连)有限公司]合成 cDNA。

1.2.3 基因克隆及序列分析 根据大豆基因组序列 (<http://www.phytozome.net/soybean.php>) 设计 1 对引物(正向引物序列为 5'-ATGACATGGTGCAATGAC TCAGA-3', 反向引物序列为 5'-CTATTTTCTGTCCAT CTTGGCTTTG-3'), 并克隆 *GmNAC73-like* 基因。扩增体系总体积 50.0 μL , 包括 cDNA 20 ng、5 \times Prime STAR buffer 10.0 μL 、2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 4.0 μL 、10 mmol \cdot L⁻¹ 正向引物和反向引物各 2.0 μL 及 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 1.25 U, 用重蒸水补足至 50.0 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 98 $^{\circ}\text{C}$

变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环。PCR 产物回收后连接到测序载体 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit CB111-01(北京全式金生物技术有限公司)上, 送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.4 基因表达分析 采用半定量 RT-PCR 技术对基因的表达情况进行分析, 以 *GmActin* (登录号 XM_003552652) 为内参, 并根据 cDNA 序列设计引物(表 1)。扩增体系同上; 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 28 个循环。PCR 产物用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 用于大豆异黄酮合成途径关键酶基因半定量 RT-PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequence used for semiquantitative RT-PCR amplification of key enzyme gene in synthesis pathway of isoflavone in *Glycine max* (Linn.) Merr.

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>GmActin</i>	CGGTGGTCTATCTTGGCATC	GTCTTCGCTTCAATAACCCTA
<i>GmNAC73-like</i>	ATGACATGGTGCAATGACTCAGA	CTATTTTCTGTCCATCTTGGCTTTG
<i>GmIFS2</i>	GACAGACCATCAGAATTCGGTC	CTAACTTTGGCATCATCACCTT
<i>GmPAL</i>	TAACTGGCAGACCCAACTCC	CTAACTTTGGCATCATCACCTT
<i>GmC4H</i>	GGTACCTTCCCTTGGTGTTG	TAAATGGCCCTCCTTTCTCAC
<i>Gm4CL</i>	ATTCTATTCTCCTCTGGCACCA	CCATACCTCTCCACAGCCTTTA
<i>GmCHS</i>	AGTCGTAGTAGACGGTGGAAAAA	AATCAGAGAGGTTGAAATGAAGG
<i>GmCHR</i>	TCCACTGATGCTCATCTGAC	TTCCATAGCCTCCCATATTC
<i>GmCHI</i>	GGGTTATTGGAGCCAGAAG	GCCAGAGATTGAATGGTTGAG

1.2.5 酵母单杂交实验方法 参照刘晓庆等^[12]的方法, 人工合成 *GmIFS2* 启动子中 NAC 结合元件(核心序列 CGTG)的 3 次重复序列(Yeast-pIFS2F: ggacGAATTCATTTTTCGTGATTCATATTTTTCGTGATTCATATTTTTCGTGATTCATACTAGTctgg; Yeast-pIFS2R: ccagACTAGTATGAATCACGAAAAATATGAATCACGAAAAATATGAATCACGAAAAATGAATTCgtcc), 并连接到 pHis2.1 载体上, 构建诱饵载体 pHis2.1-IFS2; 在 pGADT7-Rec2 载体多克隆位点处插入 *GmNAC73-like* ORF 序列, 构建 pGAD-Rec2-*GmNAC73-like* 载体; 将 2 个载体分别转入大肠杆菌中并提取质粒; 用 PEG/LiAc 共转化酵母菌株 Y187, 并将其涂在缺陷型培养基(SD/-His/-Leu/-Trp)上, 3~4 d 后挑取阳性克隆, 涂在添加 80 mmol L⁻¹ 3-AT 的缺陷型培养基(SD/-His/-Leu/-Trp)上; 3~4 d 后观察菌落生长情况, 并分析 *GmNAC73-like* 与 *GmIFS2* 启动子 CGTG 基序的

结合情况。阳性对照为 p53HIS2.1+pGAD-Rec2-53, 阴性对照为 p53HIS2.1+pGAD-Rec2-*GmNAC73-like*。

1.2.6 农杆菌介导的大豆发状根系转化及检测 参照文献[13]的方法进行大豆发状根系转化。设计 *GmNAC73-like* ORF 引物, 将 *GmNAC73-like* 基因序列克隆到 pCXS 植物表达载体上, 并采用冻融法将 pCXS-*GmNAC73-like* 质粒转入发根农杆菌 K599 中; 挑取已转化的 K599 单克隆, 在 LB 液体培养基(含质量浓度 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素)中于 28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 48 h, 离心收集菌体, 用 10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 重悬, 稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.5, 备用。

将无菌的大豆种子播种于 1/2MS 培养基中, 置于温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 16 h \cdot d⁻¹ 的培养室中培养 5~6 d; 于无菌条件下剪取子叶; 用无菌手术刀在子叶背面挖洞, 然后摆放在含质量浓度均为 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢菌素酶和羧苄青霉素的 Whiter 培养基上, 将上述菌

液滴在子叶背面的洞中,于 25 °C 条件下暗培养 17 ~ 25 d;待发状根系长 4 ~ 8 cm 时,剪下发状根系并提取 DNA;用 PCR 检测转基因发状根系,从中选取 OE-1、OE-2、OE-3 和 OE-4 共 4 个转基因发状根系。

1.2.7 总异黄酮含量测定 参照易金鑫等^[14]的方法,分别称取上述转基因发状根系各 0.2 g,加入 15 mL 体积分数 70% 乙醇,匀浆,于 60 °C 下提取 2 h;过滤后分别在波长 243、263 和 283 nm 处比色,计算总异黄酮含量。对照为转 K599 菌液(无 pCXSN - *GmNAC73-like* 质粒)的发状根系。

1.3 数据处理及分析

运用 Clustal X 及 GeneDoc 对 *GmNAC73-like* 序列进行分析。用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测蛋白的亲水性和疏水性,用 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) 预测蛋白三级结构,用 Signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽,用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 Pfam 结构域和蛋白互作网络。用 WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolfpsort.html>) 预测亚细胞定位,用 NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) 预测核定位信号。用 MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/index.html>) 构建系统进化树;采用 NJ 方法进行运

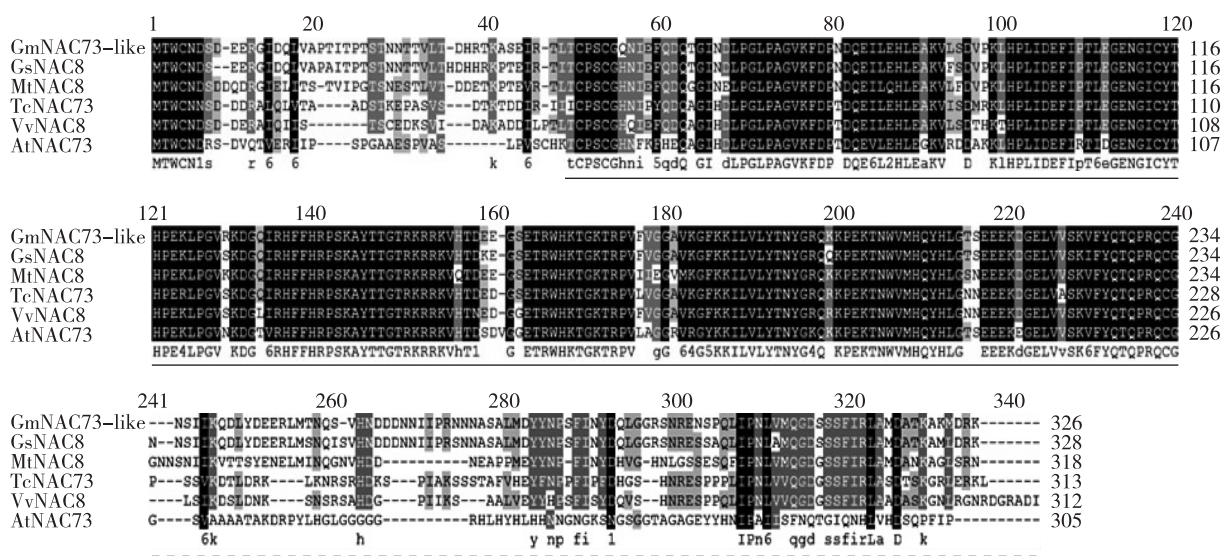
算,采用 Pairwise Deletion 和 Poisson correction 模式,校验参数 Bootstrap 设为 1 000 次。

2 结果和分析

2.1 *GmNAC73-like* 基因及其编码的蛋白质分析

采用半定量 RT-PCR 技术从大豆豆荚中克隆到 1 条 cDNA 序列,测序比对结果显示:该 cDNA 序列与数据库 (<http://www.Phytozome.net/soybean.php>) 中 *GmNAC73-like* 基因的理论序列完全一致;通过 BLASTx 证实该序列为 *GmNAC73-like* 基因(登录号 XP_003529352.1)。*GmNAC73-like* 基因含有 1 个长度 981 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 326 个氨基酸。该基因编码的蛋白质为 *GmNAC73-like* 蛋白,理论相对分子质量 37 000,理论等电点 pI 6.4。预测结果表明:*GmNAC73-like* 蛋白为亲水性蛋白,无信号肽,且被定位在细胞核上;NLStradamus 预测其有核定位信号“PKRRK”,与转录因子作用部位一致。

多重序列比对分析结果(图 1)显示:*GmNAC73-like* 蛋白的氨基酸序列与野大豆 (*Glycine soja* Sieb. et Zucc., KHN09961.1)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn., XP_013456941.1)、可可 (*Theobroma cacao* Linn., XP_007025530.1)、葡萄 (*Vitis vinifera* Linn.,



GmNAC73-like: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; *GsNAC8*: 野大豆 *Glycine soja* Sieb. et Zucc.; *MtNAC8*: 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; *TcNAC73*: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; *VvNAC8*: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; *AtNAC73*: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. 实线部分为保守区域,虚线部分为非保守区域 The solid line is conserved region, and the dotted line is non-conservative region.

图 1 大豆 *GmNAC73-like* 蛋白与其他植物 NAC 蛋白的同源性比对结果

Fig. 1 Result of homology alignment of *GmNAC73-like* protein from *Glycine max* (Linn.) Merr. with NAC protein from other species

XP_002278661.1) 和拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., NP_194579.1] 的 NAC 蛋白具有较高的相似性, 相似度分别为 93%、69%、73%、75% 和 58%; GmNAC73-like 蛋白的 N 末端有 1 个高度保守的 NAC 结构域, 而 C 末端则存在高度差异, 与已知的 NAC 蛋白的结构一致。GmNAC73-like 蛋白在第 68 位至第 209 位氨基酸间含有 NAM 结构域 (Pfam02365), 为 NAC 转录因子家族的结构域 (图 2); 该蛋白的三级结构含有 α -螺旋和 β -折叠。此外, 利用 SMART 预测 GmNAC73-like 蛋白互作蛋白网络, 发现该蛋白与 MYB 转录因子能够互作 (图 3)。

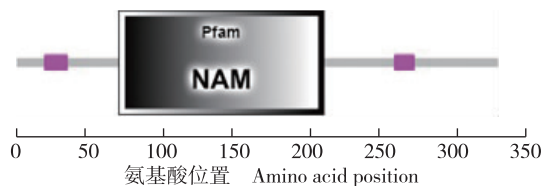
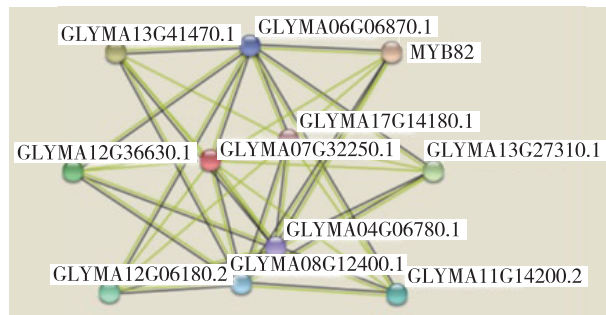


图 2 大豆 GmNAC73-like 蛋白的结构域预测
Fig. 2 Domain prediction of GmNAC73-like protein from *Glycine max* (Linn.) Merr.

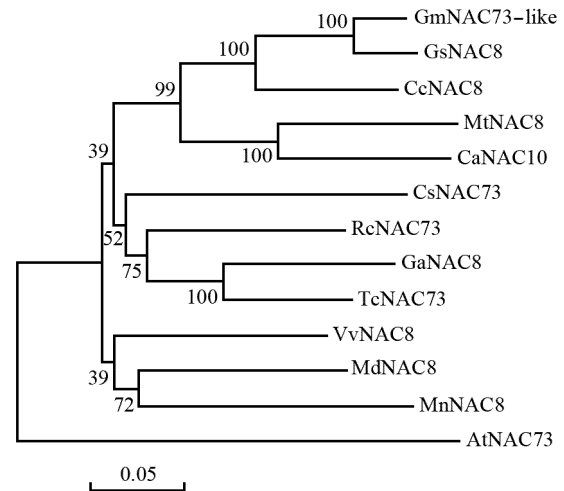


GLYMA13G41470.1: MYB82 转录因子 MYB82 transcription factor; GLYMA06G06870.1: 纤维素合酶 Cellulose synthase; MYB82: MYB82 转录因子 MYB82 transcription factor; GLYMA17G14180.1: HD1-like 蛋白 HD1-like protein; GLYMA12G36630.1: MYB46 转录因子 MYB46 transcription factor; GLYMA07G32250.1: NAC73-like 转录因子 NAC73-like transcription factor; GLYMA13G27310.1: MYB46 转录因子 MYB46 transcription factor; GLYMA04G06780.1: 纤维素合酶 Cellulose synthase; GLYMA12G06180.2: MYB46 转录因子 MYB46 transcription factor; GLYMA11G14200.2: MYB46 转录因子 MYB46 transcription factor; GLYMA08G12400.1: 纤维素合酶 Cellulose synthase.

图 3 大豆 GmNAC73-like 蛋白的互作网络预测结果
Fig. 3 Prediction result of interaction network of GmNAC73-like protein from *Glycine max* (Linn.) Merr.

2.2 GmNAC73-like 蛋白的亲缘关系分析

通过聚类分析构建大豆 GmNAC73-like 蛋白与其他 12 种植物 NAC 蛋白的 NJ 系统树 (图 4)。结果显示: 大豆 GmNAC73-like 与野大豆的 GsNAC8 蛋白



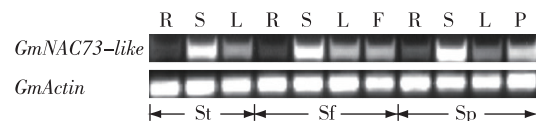
分支上的数据表示 bootstrap 百分比。Datums above the branches indicate percentage of bootstrap. GmNAC73-like: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; GsNAC8: 野大豆 *Glycine soja* Sieb. et Zucc.; CeNAC8: 木豆 *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp.; MtNAC8: 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; CaNAC10: 鹰嘴豆 *Cicer arietinum* Linn.; CsNAC73: 甜橙 *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck; RcNAC73: 蓖麻 *Ricinus communis* Linn.; GaNAC8: 树棉 *Gossypium arboreum* Linn.; TeNAC73: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; VvNAC8: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; MdNAC8: 苹果 *Malus domestica* Borkh.; MnNAC8: 川桑 *Morus notabilis* Schneid.; AtNAC73: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

图 4 大豆 GmNAC73-like 蛋白与其他植物 NAC 蛋白的 NJ 系统树
Fig. 4 NJ phylogenetic tree of GmNAC73-like protein from *Glycine max* (Linn.) Merr. and NAC protein from other species

的亲缘关系最近, 与同科植物木豆 [*Cajanus cajan* (Linn.) Millsp., KYP76320.1]、蒺藜苜蓿和鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* Linn., XP_004505102.1) 的 NAC 蛋白也有较近的亲缘关系。

2.3 GmNAC73-like 基因的组织表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法对大豆不同发育期 GmNAC73-like 基因在不同组织中的表达模式进行检测 (图 5)。在大豆的三叶期、开花期和结荚期, GmNAC73-like 基因在根中几乎不表达, 在其他组织



R: 根 Root; S: 茎 Stem; L: 叶 Leaf; F: 花 Flower; P: 豆荚 Pod. St: 三叶期 Trefoil stage; Sf: 开花期 Flowering stage; Sp: 结荚期 Pod setting stage.

图 5 不同发育期大豆不同组织中 GmNAC73-like 基因表达的 RT-PCR 分析结果
Fig. 5 Result of RT-PCR analysis on GmNAC73-like gene expression in different tissues of *Glycine max* (Linn.) Merr. at different development stages

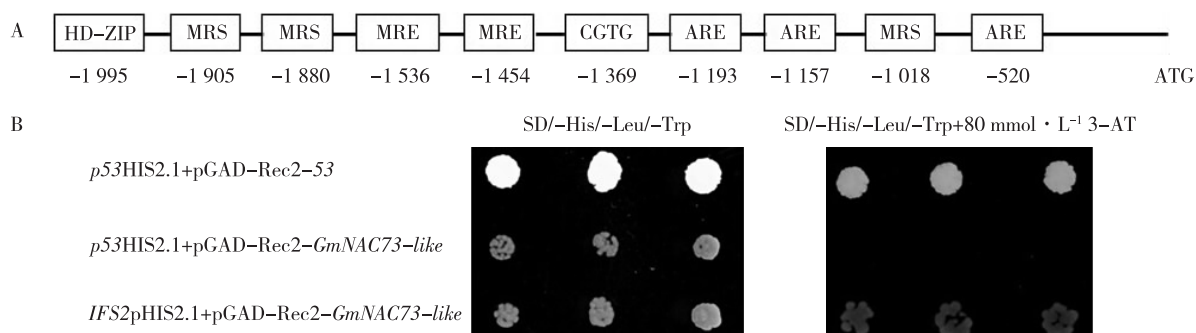
中均可表达;在不同发育期 *GmNAC73-like* 基因在茎和叶中均可表达,其中,茎中 *GmNAC73-like* 基因的表达量较高;此外,在开花期和结荚期该基因分别在花和豆荚中均可表达,其中,在豆荚中表达量相对较高。

2.4 *GmNAC73-like* 与 *GmIFS2* 启动子中 CGTG 基序结合的验证

NAC 可能的结合位点核心区域为 CGTA 或 CGTG

基序^[11-12]。对 *GmIFS2* (Glyma. 13G173500) 启动子序列(起始密码子 2 000 bp)的分析结果表明,其有 ARE、MRE 和 HD-ZIP 等结合元件,同时在 -1 369 位置有 1 个 CGTG 基序位点(图 6-A)。

用酵母单杂交的方法检测 *GmNAC73-like* 与 *GmIFS2* 启动子的结合情况。结果(图 6-B)显示:在添加 80 mmol · L⁻¹ 3-AT 的缺陷型 (SD/-His/-Leu/



p53HIS2.1+pGAD-Rec2-53: 阳性对照 Positive control; *p53HIS2.1+pGAD-Rec2-GmNAC73-like*: 阴性对照 Negative control; *IFS2pHIS2.1+pGAD-Rec2-GmNAC73-like*: 实验组 Experimental group.

A: *GmIFS2* 启动子顺式作用调控元件 *cis*-acting regulatory element of *GmIFS2* promoter; B: *GmNAC73-like* 与 *GmIFS2* 启动子中 CGTG 基序结合的验证结果 Confirmative result on *GmNAC73-like* binding to CGTG motif in *GmIFS2* promoter.

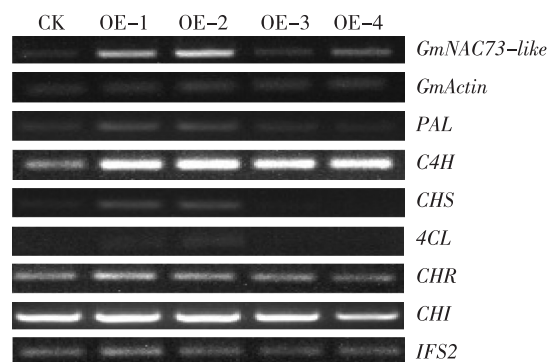
图 6 *GmIFS2* 启动子中 CGTG 基序的位点及 *GmNAC73-like* 与 CGTG 基序结合的验证
Fig. 6 Site of CGTG motif in *GmIFS2* promoter and confirmation of binding of *GmNAC73-like* to CGTG motif

-Trp) 固体培养基上,阳性对照 (*p53HIS2.1+pGAD-Rec2-53*)^[15] 和实验组 (*IFS2HIS2.1+pGAD-Rec2-GmNAC73-like*) 的菌株均能生长,而阴性对照 (*p53HIS2.1+pGAD-Rec2-GmNAC73-like*) 菌株则几乎不能生长;但在不添加 3-AT 的缺陷型 (SD/-His/-Leu/-Trp) 固体培养基上 3 组菌株均可正常生长,说明 *GmNAC73-like* 与 *GmIFS2* 启动子中的 CGTG 基序可以有效结合。

2.5 *GmNAC73-like* 基因过表达对异黄酮合成途径关键酶基因及总异黄酮含量的影响

PCR 结果(图 7)显示:在 *GmNAC73-like* 基因过表达的大豆转基因发状根系中,苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*)、肉桂酸-4-羟化酶基因 (*C4H*)、查尔酮合酶基因 (*CHS*)、4-香豆素辅酶 A 连接酶基因 (*4CL*)、查尔酮还原酶基因 (*CHR*) 和异黄酮合酶基因 (*IFS2*) 的表达量均不同程度提高,尤其是 *C4H* 和 *CHS* 的表达量明显提高,而查尔酮异构酶基因 (*CHI*) 的表达量则无变化。

对大豆转基因根系中总异黄酮含量的测定结果

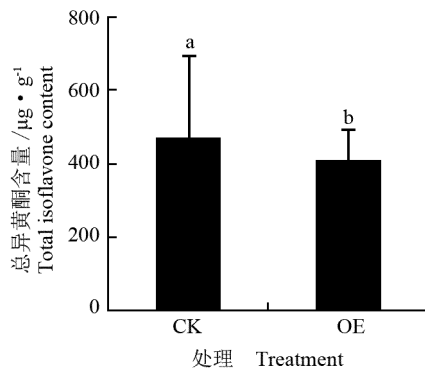


CK: 转 K599 菌液(无 pCXS_N-*GmNAC73-like* 质粒)的发状根系 Hairy roots of transformed K599 (without pCXS_N-*GmNAC73-like* plasmid); OE-1, OE-2, OE-3, OE-4: 转基因发状根系 Transgenic hairy roots. *GmActin*: 内参基因 Reference gene; *PAL*: 苯丙氨酸解氨酶基因 Phenylalanine ammonia-lyase gene; *C4H*: 肉桂酸-4-羟化酶基因 Cinnamic acid-4-hydroxylase gene; *CHS*: 查尔酮合酶基因 Chalcone synthase gene; *4CL*: 4-香豆素辅酶 A 连接酶基因 4-coumarin coenzyme A ligase gene; *CHR*: 查尔酮还原酶基因 Chalcone reductase gene; *CHI*: 查尔酮异构酶基因 Chalcone isomerase gene; *IFS2*: 异黄酮合酶基因 Isoflavone synthase gene.

图 7 *GmNAC73-like* 基因过表达对大豆转基因发状根系中异黄酮合成途径关键酶基因表达的影响

Fig. 7 Effect of over expression of *GmNAC73-like* gene on expression of key enzyme genes in synthesis pathway of isoflavone in transgenic hairy roots of *Glycine max* (Linn.) Merr.

(图 8)显示:在 *GmNAC73-like* 基因过表达的大豆转基因发状根系中,总异黄酮含量明显低于对照,差异达显著水平($P < 0.05$),表明 *GmNAC73-like* 基因在大豆异黄酮生物合成过程中起负调控作用。



CK: 转 K599 菌液(无 pCXS_N-*GmNAC73-like* 质粒)的发状根系 Hairy roots of transformed K599 (without pCXS_N-*GmNAC73-like* plasmid); OE: 转基因发状根系 Transgenic hairy roots.

不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different small letters indicate the significant difference ($P < 0.05$).

图 8 *GmNAC73-like* 基因过表达对大豆转基因发状根系中总异黄酮含量的影响

Fig. 8 Effect of over expression of *GmNAC73-like* gene on total isoflavone content in transgenic hairy roots of *Glycine max* (Linn.) Merr.

3 讨论和结论

上述研究结果显示:从大豆豆荚中克隆获得的 *GmNAC73-like* 基因,其编码的 *GmNAC73-like* 蛋白与野大豆的 *GsNAC8* 蛋白和木豆的 *CcNAC8* 蛋白亲缘关系最近,与这 3 种植物同为豆科种类有关;该蛋白的 N 端具有保守的 NAC 结合结构域,能够与 DNA 序列结合,且被定位在细胞核上,并具有核定位信号,这些都符合转录因子的基本特征。

GmNAC73-like 基因在大豆的茎、叶、花和豆荚中均可表达,说明该基因参与了大豆的大部分生长发育过程。*GmNAC73-like* 基因的表达量在豆荚中较高,这与“大豆异黄酮主要在大豆种子中合成^[16]”的结果相一致。推测 *GmNAC73-like* 基因与异黄酮的合成有一定的相关性。

对 NAC 蛋白分子生物学功能的研究,首先发现酵母中的 NAC 基因能激活 CaMV35S 启动子^[17];其后又相继发现拟南芥中的 3 个 NAC 基因(*NAC2*、*AtNAM*

和 *ANAC019*)和油菜(*Brassica campestris* Linn.)中的几个 NAC 基因可以结合到 CaMV35S 启动子上^[18];进一步的研究发现拟南芥中的 3 个 NAC 蛋白可以结合到 *ERD1* (*early responsive to dehydration stress 1*) 基因的启动子上,启动子中的 1 个以 CACG 为核心的 DNA 结构能被 NAC 结构域所识别^[19]。刘晓庆等^[12]认为,大豆中与异黄酮合成相关的 *GmNAC011* 可以与 *GmIFS2* 基因启动子中的 CGTG 基序结合。本研究中,与大豆异黄酮合成相关的 *GmNAC73-like* 同样可以与 *GmIFS2* 基因启动子中的 CGTG 基序结合。MYB 转录因子可以作为调节蛋白参与异黄酮合成途径的调控^[20-21];而大豆中 R1 型 MYB 转录因子 *GmMYB176* 可以调控 *CHS8* 基因的表达并影响大豆异黄酮的合成^[20];此外,在大豆中还鉴定出 1 个 R2R3 型转录因子 *GmMYB39*,能够抑制 *CHS* 的表达活性,并进而抑制异黄酮的生物合成^[21]。大豆 *GmIFS2* 基因启动子中也含有 MYB 结合位点 MRE,由于 *GmNAC73-like* 与 *GmMYB82* 和 *GmMYB46* 共表达,据此推测 *GmNAC73-like* 可能通过与 MYB 转录因子的互作调控 *GmIFS2* 的表达,从而负调控异黄酮的生物合成。

本研究中,*GmNAC73-like* 基因过表达后大豆转基因根系中与异黄酮合成途径相关的重要基因的表达量增加,说明 *GmNAC73-like* 可参与调控异黄酮合成。另外,*GmNAC73-like* 可以与 *GmIFS2* 基因启动子中的 CGTG 基序结合,这也进一步说明栽培大豆的 *GmNAC73-like* 基因可通过参与调控 *GmIFS2* 基因的表达来调控大豆异黄酮的合成。

参考文献:

- [1] YU O, SHI J, HESSION A O, et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63: 753-763.
- [2] MESSINA M, HO S, ALEKEL D L. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2004, 7: 649-658.
- [3] BARNES S. Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose? [J]. *British Journal of Nutrition*, 2003, 89: S101-S108.
- [4] LEPHART E D, WEST T W, WEBER K S, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2002, 24: 5-16.
- [5] DIXON R A. Natural products and plant disease resistance [J]. *Nature*, 2001, 411: 843-847.

(下转第 27 页 Continued on page 27)