

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.02.009

杨春, 沈良英, 李舒文, 等. 蒺藜苜蓿 NAC 转录因子基因 *MtNAC47* 克隆及表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(2): 98-110.

# 蒺藜苜蓿 NAC 转录因子基因 *MtNAC47* 克隆及表达分析

杨春<sup>1</sup>, 沈良英<sup>1</sup>, 李舒文<sup>2</sup>, 贾薇<sup>1</sup>, 晁跃辉<sup>1</sup>

1. 北京林业大学 草业与草原学院, 北京 100083; 2. 北京中学, 北京 100018

**摘要:** 植物 NAC 蛋白是重要的转录因子家族, 参与植物的生长、发育和胁迫应答。克隆了蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) ‘R108’ 中的 *MtNAC47* 基因, 并通过生物信息学分析、亚细胞定位、转录自激活检测及表达模式分析等方法初步探讨其功能。结果显示, *MtNAC47* 基因全长 1 023 bp, 编码 340 个氨基酸, 与红三叶 (*Trifolium pratense*) TpnAC47 亲缘关系最为接近。亚细胞定位表明 *MtNAC47* 定位于细胞核和细胞质; 酵母自激活检测发现 *MtNAC47* 具有自激活活性。表达分析表明, *MtNAC47* 在蒺藜苜蓿不同组织中的表达量从高到低依次为: 花、根、茎、叶、果。脱落酸 (Abscisic Acid, ABA)、茉莉酸甲酯 (Methyl Jasmonate, MeJA)、水杨酸 (Salicylic Acid, SA)、赤霉素 (Gibberellic Acid, GA) 和低温胁迫均能调控 *MtNAC47* 的表达, ABA、SA 和 GA 处理下表达量先升高后下降, MeJA 处理下表达量受到抑制, 低温胁迫下则先下降后上升。以上结果说明, *MtNAC47* 基因在植物生长发育及环境胁迫应答中可能发挥重要作用。

**关键词:** 蒺藜苜蓿; *MtNAC47*; 自激活检测; 亚细胞定位;  
表达模式分析

中图分类号: S326

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)02-0098-13

## Cloning and Expression Analysis of the NAC Transcription Factor Gene *MtNAC47* in *Medicago truncatula*

YANG Chun<sup>1</sup>, SHEN Liangying<sup>1</sup>, LI Shuwen<sup>2</sup>,  
JIA Wei<sup>1</sup>, CHAO Yuehui<sup>1</sup>

1. School of Grassland Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

2. Beijing Middle School, Beijing 100018

**Abstract:** Plant NAC proteins constitute a crucial family of transcription factors involved in plant growth,

收稿日期: 2025-04-17

基金项目: 内蒙古自治区科技厅内蒙古自治区科技重大专项(2022JBG00160302)。

作者简介: 杨春, 硕士研究生, 主要从事草类植物遗传育种的研究。

通信作者: 晁跃辉, 博士, 教授。

development, and stress responses. This study cloned the *MtNAC47* gene from *Medicago truncatula* 'R108' and preliminarily investigated its function through bioinformatics analysis, subcellular localization, transcriptional self-activation assays, and expression pattern analysis. The results showed that the full-length of *MtNAC47* gene was 1 023 bp, encoding 340 amino acids, and it exhibited the closest phylogenetic relationship with *TpNAC47* from *Trifolium pratense*. Subcellular localization revealed that *MtNAC47* was localized in both the nucleus and cytoplasm. Yeast self-activation assays demonstrated that *MtNAC47* possessed self-activation activity. Expression pattern analysis indicated that the expression levels of *MtNAC47* in different tissues of *Medicago truncatula* were sequentially as follows: flowers, roots, stems, leaves, and pods. Abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), gibberellic acid (GA), and low-temperature stress all regulated the expression of *MtNAC47*. Under ABA, SA, and GA treatments, expression levels initially increased and then decreased. MeJA treatment inhibited expression, while low-temperature stress caused an initial decrease followed by an increase. These findings suggest that the *MtNAC47* gene may play a significant role in plant growth and development, as well as in environmental stress responses.

**Key words:** *Medicago truncatula*; *MtNAC47*; self-activation detection; subcellular localization; expression pattern analysis

转录因子(Transcription Factor, TF)是一类通过与特定顺式作用元件结合来调控基因表达的蛋白质,在植物应对非生物胁迫、激素信号转导以及生长发育过程中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。已知 NAC (NAM、ATAF1/2 和 CUC2)结构域蛋白是在多种植物发育过程中具有不同功能的植物特异性转录因子。首个 NAC 转录因子是从矮牵牛(*Petunia hybrida*)中发现的 NAM(*No Apical Meristem*)基因,它与矮牵牛胚胎的生长和发育密切相关<sup>[3]</sup>,因携带 NAM 突变的矮牵牛胚胎无法发育出顶端分生组织,导致幼苗缺乏根和叶<sup>[4]</sup>。随后,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)中也发现了两个相关的 NAC 转录因子 ATAF1/2 和 CUC2<sup>[5-6]</sup>,NAC 转录因子的名称由“NAM”“ATAF”“CUC”3 个基因的首字母组成。NAC 转录因子由 N 末端的靶结合域和与其他蛋白质相互作用的高度保守的 C 末端域组成。N 末端的保守结构域最初在 4 个基因(NAM、ATAF1、ATAF2 和 CUC2)中被发现,随后进一步将其划分为 5 个亚结构域(A 至 E)。其中, A、C 和 D 结构域在不同物种的 NAC 成员中高度保守,而 B 和 E 结构域则表现出更多的多样性<sup>[2]</sup>。

NAC 蛋白作为植物特异性转录调节因子中最大的一类,目前已在水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[7]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[8]</sup>、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)<sup>[9]</sup>等多种植物中得到鉴定。研究表明,NAC 蛋白在植物应对各种逆境胁迫时发挥着独特的功能,能够直接或间接调控转录因子下游的应激相关基因,或与其他蛋白质相互作用,使植物响应外界环境的各种胁迫。例如,大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)中与拟南芥 ATAF1 同源的 *GmNAC109* 在盐胁迫下能够显著诱导其表达<sup>[10]</sup>;花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)的多个 NAC 转录因子(如 *ZbNAC7/18/47/72/79*)在抗旱过程中起着关键作用<sup>[11]</sup>。此外,NAC 转录因子还会在冷胁迫下受到诱导,参与植物对低温胁迫的反应<sup>[12]</sup>。番茄(*Solanum lycopersicum* L.)的 *Sl-NAM1* 和 *SlNAC1* 在低温胁迫下表达上调,有助于提高转基因植物的抗寒能力<sup>[13-14]</sup>;茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)的 *CsNAC17/26/30* 在低温胁迫下的表达逐渐增加,其中 *CsNAC17* 和 *CsNAC26* 的诱导作用尤为显著,常用作茶树的抗冻性分子标记进行性状鉴定<sup>[15]</sup>。

NAC 转录因子除参与植物应激反应外,还广泛参与根系生长、花器官发育、种子萌发、植物衰老和诱导细胞死亡等生物学过程<sup>[16-19]</sup>。水稻 *OsNAC2* 通过调控赤霉素(Gibberellic Acid, GA)途径影响植株高度和开花时间,*OsNAC54* 能够直接调节 CGGs 基因活性并促进 ABA INSENSITIVE 5 (*ABI5*)的表达,从而间接影响叶片衰老<sup>[20-21]</sup>;拟南芥 *AtNAC1* 通过抑制细胞分裂、DNA 修复和细胞分化的关键调节因子 *E2Fa* 的转录,来维持根分生组织的功能和促进根生长<sup>[22]</sup>;芜菁(*Brassica campestris* L.)*BcNAC2* 经组织

原位杂交后在胚囊中高度表达,说明 NAC 转录因子与种子或胚胎发育有关<sup>[23]</sup>。以上研究表明, NAC 转录因子可通过外界胁迫或植物信号调控其表达,进而参与多种生物学过程。

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)是豆科(Leguminosae)苜蓿属(*Medicago* L.)的一年生植物,因其具有基因组小、自花授粉、生长周期短和遗传转化效率高等优点,被广泛用作研究豆科植物的模式植物。目前,蒺藜苜蓿的全基因组数据已经公布,这为深入研究其基因调控、挖掘潜在遗传信息创造了有利条件<sup>[24]</sup>。对蒺藜苜蓿的研究不仅有助于理解豆科植物在生长发育过程、激素调控、信号转导及逆境胁迫响应等方面的理论,还具有重要的应用价值。NAC 转录因子尽管在拟南芥和水稻等模式植物中已有相关研究,但在蒺藜苜蓿中的研究相对较少。本研究基于课题组前期的蛋白互作筛选,在蒺藜苜蓿 *MtUFO* 上游调控因子中鉴定出 *MtNAC47* 基因,克隆了蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 基因,并进行了生物信息学分析、亚细胞定位、转录自激活检测及表达特征分析,旨在为该基因功能的进一步研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为蒺藜苜蓿野生型(*M. truncatula* ‘R108’),由北京林业大学草业与草原学院分子实验室提供。试验耗材 RNA 提取试剂盒(CW0598S)购于北京康为世纪生物公司,2× RapidTaq Master mix(P222)购于南京诺唯赞公司,OMEGA PCR 纯化试剂盒(D6492)购于广州飞扬生物工程有限公司,大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ (KTSM101L)购于北京康体生命公司,反转录试剂盒(AG11728)、qRT-PCR 试剂盒(AG11733)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司,Minimal SD Base(PM2030)、DO Supplement-Trp(PM2250)、X- $\alpha$ -gal(CX11922)、金担子素(Aureobasidin A)(CA2332)购自北京酷来博科技有限公司,农杆菌感受态 EHA105、酵母菌株 Y2HGGold、酵母诱饵表达载体 pGBKT7 及植物表达载体 3302Y 均为实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计

使用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计(表 1), *MtNAC47*-F/R 用于克隆 *MtNAC47* 基因; 3302Y-*MtNAC47*-F/R 用于构建亚细胞定位植物表达载体; pGBKT7-*MtNAC47*-F/R 用于构建酵母表达载体; T7 promoter 和 3'BD 用于检测酵母表达载体; *MtNAC47*-RT-F/R 用于 *MtNAC47* 基因的表达分析, *MtActin*-F/R 用于内参基因 *MtActin* 的表达分析<sup>[25]</sup>。

表 1 引物序列及名称

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>MtNAC47</i> -F	ATGGAGCTGAGCAGCAGCCAGGACG
<i>MtNAC47</i> -R	TTAGGGGGTGGGCAGGTGGTTGGCC
3302Y- <i>MtNAC47</i> -F	AGAACACGGGGGACTCTTGAATGGGCACCCCCAGACCAA
3302Y- <i>MtNAC47</i> -R	ACGCGTACTAGTCAGATCTAGCCCTGGTACTGGTGGTGGG
pGBKT7- <i>MtNAC47</i> -F	AGAGGAGGACCTGCATATGGATGGGCACCCCCAGACCAA
pGBKT7- <i>MtNAC47</i> -R	GATCCCCGGAATTCGGCCTTTAGCCCTGGTACTGGTGGT
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGG
3'BD	TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC
<i>MtNAC47</i> -RT-F	AAGACCATCGTGGCCAGC
<i>MtNAC47</i> -RT-R	GGGGGCTTGCCCTTGTAG
<i>MtActin</i> -F	TGATCTGGCTGGTTCGTGACCTTA
<i>MtActin</i> -R	ATGCCTGCTGCTTCCATTCCTAT

### 1.2.2 *MtNAC47* 基因克隆

以蒺藜苜蓿‘R108’为植物材料, 使用 RNA 提取试剂盒提取植物总 RNA, 随后反转录为 cDNA。以 *MtNAC47*-F/R 为引物, 蒺藜苜蓿 cDNA 为模板, 利用  $2\times$  RapidTaq Master mix 进行 PCR 扩增, 反应体系为  $20\ \mu\text{L}$ 。反应程序为:  $95\ ^\circ\text{C}$  3 min,  $95\ ^\circ\text{C}$  15 s,  $55\ ^\circ\text{C}$  20 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  15 s, 34 个循环,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸 5 min,  $12\ ^\circ\text{C}$  保温。反应结束后利用琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 并借助 PCR 纯化试剂盒回收目的条带连接至克隆载体 pMD19-T。使用大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  对连接产物进行转化, 吸取适量菌液涂布在含有氨苄青霉素( $100\ \text{mg/L}$ )的固体 LB 培养基上, 倒置于  $37\ ^\circ\text{C}$  培养箱中 12 h。挑取单克隆菌落进行 PCR 检测, 将符合目的基因片段大小的菌液送至北京睿博兴科生物公司测序, 将测序正确的质粒命名为 pMD-*MtNAC47*。

### 1.2.3 *MtNAC47* 的生物信息学分析

在 NCBI 网站对 *MtNAC47* 蛋白序列进行 Blast 比对, 并下载同源蛋白序列。通过 MEGA7.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, Bootstrap 重抽样次数默认为 1 000 次, 以评估系统发育树的可靠性。利用 DNAMAN 9.0 对 *MtNAC47* 及其他物种同源蛋白序列进行多序列比对分析。根据 SOPMA ([https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 和 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/QdTzAC/models/>) 网站预测蛋白质的二级和三级结构。使用 ExPASy-ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *MtNAC47* 蛋白的理化性质, 使用 SignalP 4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽。在 TMHMM 网站(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/TMHMM-2.0/>) 预测 *MtNAC47* 的跨膜结构域, 并通过 Expasy 网站(<https://www.expasy.org/>) 分析其亲疏水性。借助 NetPhos(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/NetPhos-3.1/>) 进行磷酸化位点预测。从蒺藜苜蓿基因组数据库中选择 *MtNAC47* 上游的 2 000 bp 作为启动子序列, 通过 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>) 进行启动子分析, 并用 TBtools 进行数据可视化。从 NCBI 下载 13 个同源蛋白物种的基因组文件, 分析 NAC 基因家族的基因结构, 并在 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 获取 NAC 结构域可视化分析结果。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 分析 NAC 蛋白的保守基序, 最后利用 TBtools 的 Gene Structure View 进行基因结构、保守基序和结构域的可视化。

### 1.2.4 表达载体构建及亚细胞定位

从测序正确的菌液中提取质粒, 使用特异性引物 3302Y-*MtNAC47*-F/R, 以 pMD-*MtNAC47* 作为模板进行 PCR 扩增。经琼脂糖凝胶电泳鉴别后, 回收纯化符合预期条带的 PCR 产物。用限制性内切酶 *Nco* I 对表达载体 3302Y 进行酶切, 随后采用无缝克隆技术按 1:1 比例连接纯化后的 PCR 产物及酶切产物, 转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 吸取并将菌液涂布在 LB 固体培养基(含  $50\ \text{mg/L}$  卡那霉素)上,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养箱中倒置过夜培养后挑取单菌落进行 PCR 检测并测序验证, 测序正确的质粒命名为 3302Y-*MtNAC47*。将质粒 3302Y-*MtNAC47* 转入农杆菌感受态 EHA105 中, 进行农杆菌菌液摇菌, 在培养箱中避光震荡 2~3 d, 直至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8 时, 将重悬菌液注射到 1 月左右生长良好的烟草叶片细胞下表皮中, 避光培养 48 h, 之后借助激光共聚焦显微镜(SP8)观察 *MtNAC47* 在细胞中的位置。

### 1.2.5 BD-*MtNAC47* 酵母表达载体构建及 Y2HGold 酵母感受态细胞的转化

以 pMD-*MtNAC47* 质粒为模板, BD-*MtNAC47*-F/R 为引物, 进行 PCR 扩增, 同时使用限制性内切酶 *Eco*R I 对酵母表达质粒 pGBKT7 进行单酶切。将 PCR 产物和酶切后的质粒分别进行纯化, 随后连接重组。连接产物通过大肠杆菌感受态转化、卡那霉素筛选及菌落 PCR 检测后, 将含有目标条带的菌液送至生物公司进行测序分析。测序正确的质粒命名为 BD-*MtNAC47*, 提取质粒并利用 PEG/LiAc 转化质粒 BD-*MtNAC47* 至 Y2HGold 酵母感受态细胞中, 吸取  $100\sim 200\ \mu\text{L}$  菌液均匀涂布在 SD/-Trp 固体培养基

上,于 30 ℃ 的酵母培养箱中培养 2~3 d,挑取单菌落进行 PCR 验证。

### 1.2.6 转录自激活作用检测

将含有 BD-MtNAC47 的酵母菌液使用 0.9% NaCl 稀释至 10 倍、100 倍、1 000 倍后,分别滴加在 SD/-Trp, SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 固体培养基上。在酵母培养箱中倒置培养 3~5 d。培养结束后观察酵母菌生长情况并进行拍照记录。

### 1.2.7 *MtNAC47* 基因的表达模式分析

挑选健康饱满的蒺藜苜蓿种子,用砂纸轻微打磨种皮,使其破损。将种子置于有吸水滤纸的培养皿中,在 4 ℃ 下进行春化处理 3~4 d。随后,将种子放入光照 16 h/25 ℃、黑暗 8 h/23 ℃ 的培养箱中,直至根系发育。接着将其移栽到花盆中,并在光周期为光照 16 h、黑暗 8 h,明暗温度分别为 25 ℃、23 ℃,湿度为 56% 的人工气候箱中继续培养。选取 3 月龄、长势良好一致的蒺藜苜蓿,分别取其根、茎、叶、花和果 5 部分组织,同时分别对单株的全部叶片喷施 50  $\mu\text{mol/L}$  的脱落酸(Abscisic Acid, ABA)、10  $\mu\text{mol/L}$  的茉莉酸甲酯(Methyl Jasmonate, MeJA)、10  $\mu\text{mol/L}$  的水杨酸(Salicylic Acid, SA)、10  $\mu\text{mol/L}$  的 GA 进行激素诱导,并将单株植株置于 4 ℃ 低温环境中进行胁迫处理。在 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、9 h、12 h 7 个时间点对叶片组织进行取样,每个处理进行 3 次生物学重复,样品用液氮速冻后放在超低温冰箱 -80 ℃ 保存。对样品进行 RNA 提取并反转录获得 cDNA,以 *MtActin* 作为内参基因, *MtNAC47*-RT-F/R 为特异性引物,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书使用荧光定量 PCR 仪器进行荧光定量,试验样品均采用 3 次生物学重复,所得数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法,使用 Excel 2019 进行分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MtNAC47* 基因克隆

以 *MtNAC47*-F 和 *MtNAC47*-R 为特异性引物,蒺藜苜蓿 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应结束后得到一条清晰且符合预期的条带,长度约为 1 000 bp,随后送至生物公司进行测序验证(图 1a)。测序结果表明, *MtNAC47* 长度为 1 023 bp,条带长度与目的基因序列长度一致,测序结果与目标基因序列一致性比对结果为 100%,证明成功克隆了蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 基因。

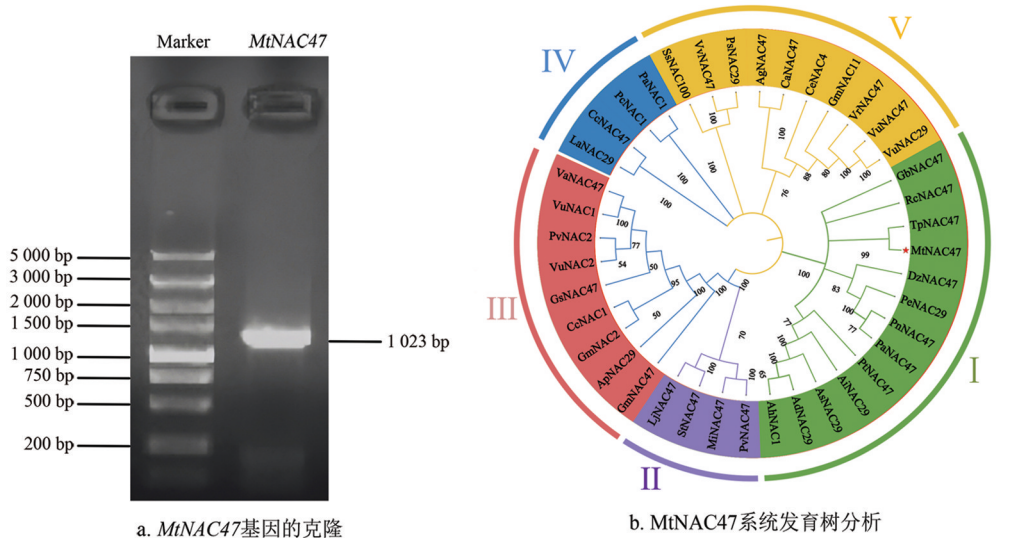
### 2.2 *MtNAC47* 基因的生物信息学分析

#### 2.2.1 *MtNAC47* 系统发育树构建及同源蛋白比对

对蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 蛋白和红三叶(*Trifolium pratense* L.)、豌豆(*Pisum sativum* L.)、毛苕子(*Vicia villosa* Roth.)等 40 个物种中的 NAC 同源蛋白进行系统发育树构建。结果表明, *MtNAC47* 与 *GbNAC47*、*RcNAC47*、*TpNAC47*、*DzNAC47* 等 12 个蛋白聚为一个亚簇分支,和红三叶 *TpNAC47* 亲缘关系最近,推断二者具有相似的生物学作用(图 1b)。对蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 基因的保守结构域进行预测,发现 *MtNAC47* 基因属于 NAM 超家族。对蒺藜苜蓿及其他 12 个物种的氨基酸序列进行多序列比对分析,结果显示蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 蛋白与毒羊豆(*Gastrolobium bilobum* R. Br.)、蓖麻(*Ricinus communis* L.)、红三叶等同源蛋白相似度较高(图 1c)。

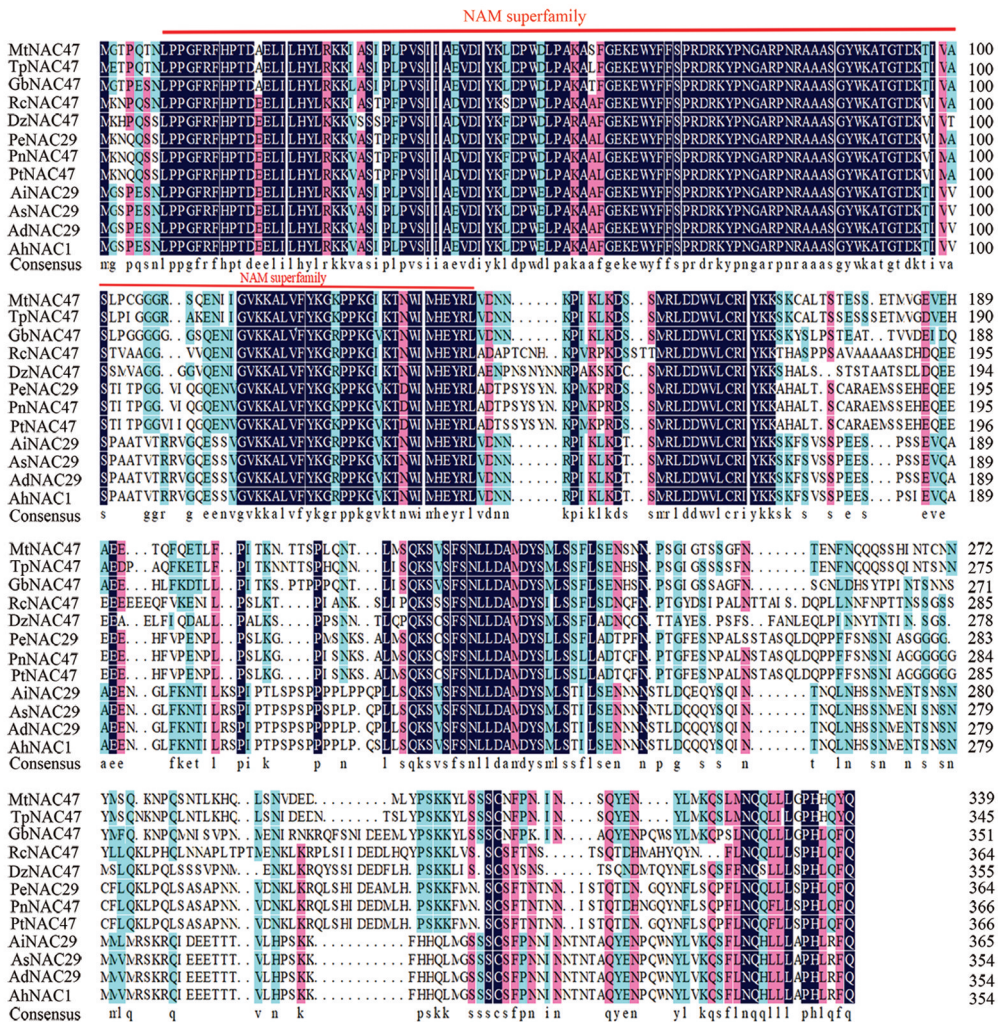
#### 2.2.2 *MtNAC47* 蛋白结构预测及理化性质分析

蛋白二、三级结构分析表明 *MtNAC47* 蛋白由 4 种二级结构模块组成,其中:无规则卷曲占比最高,为 80%;延伸链为 11.76%; $\alpha$ -螺旋占比为 8.24%(图 2a、2b)。蛋白质跨膜结构分析表明 *MtNAC47* 是非跨膜性蛋白,信号肽预测显示 *MtNAC47* 蛋白无信号肽,为非分泌蛋白或非膜蛋白,意味着该蛋白不被转运到细胞外或跨越细胞膜(图 2c、2d)。对 *MtNAC47* 蛋白的亲疏水性进行分析,发现该蛋白含有多个亲水区和疏水区(图 2e)。磷酸化位点分析显示 *MtNAC47* 蛋白共具有 43 个磷酸化位点,包括 26 个丝氨酸磷酸化位点、11 个苏氨酸磷酸化位点和 6 个酪氨酸磷酸化位点(图 2f)。



a. *MtNAC47* 基因的克隆

b. *MtNAC47* 系统发育树分析



c. *MtNAC47*同源蛋白多序列比对

*Mt*(*Medicago truncatula*): 蒺藜苜蓿; *Gb*(*Gastrolobium bilobum* R. Br.): 毒羊豆; *Re*(*Ricinus communis* L.): 蓖麻; *Tp*(*Trifolium pratense* L.): 红三叶; *Dz*(*Durio zibethinus* L.): 榴莲; *Pe*(*Populus euphratica* Oliv.): 胡杨; *Pn*(*Populus nigra* L.): 黑杨; *Pt*(*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray.): 毛果杨; *Ai*(*Arachis ipaensis* L.): 花生; *As*(*Arachis stenosperma* Krapov. & W. C. Greg.): 狭子花生; *Ad*(*Arachis duranensis* Krapov. & W. C. Greg.): 蔓花生; *Ah*(*Arachis hypogaea* L.): 落花生。

图 1 蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 基因的克隆、系统发育树分析及同源蛋白多序列比对

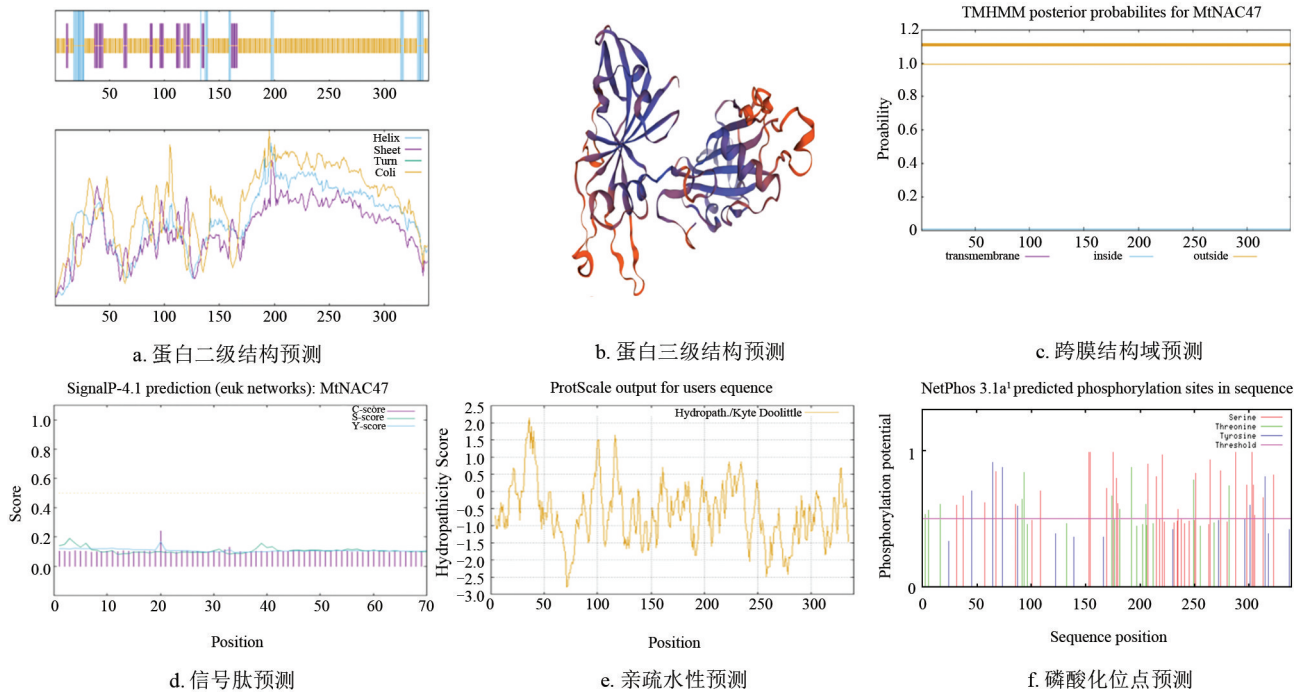


图 2 MtNAC47 蛋白理化性质分析

蛋白理化性质分析表明, MtNAC47 编码 340 个氨基酸, 分子式  $C_{1706}H_{2652}N_{462}O_{521}S_{15}$ , 丝氨酸占比最高, 为 10.9%, 其次为亮氨酸, 占比 9.4%, 蛋白分子量为 38.45 kg/mol, 理论 pI 值 8.87, 为碱性蛋白, 不稳定指数为 41.63, 总平均亲水指数为 -0.639, 说明 MtNAC47 是一个亲水不稳定的碱性蛋白(表 2)。

表 2 MtNAC47 蛋白理化性质

一级结构特征	预测结果	一级结构特征	预测结果
氨基酸数量/个	340	不稳定指数	41.63
蛋白分子量/(kg · mol <sup>-1</sup> )	38.45	理论 pI 值	8.87
分子式	$C_{1706}H_{2652}N_{462}O_{521}S_{15}$	总平均亲水指数	-0.639

### 2.2.3 MtNAC47 及其同源分支蛋白的保守基序和结构域分析

同源蛋白结构域分析表明 MtNAC47 蛋白与同源分支蛋白均包含 NAM 保守结构域, 属于 NAC 转录因子家族(图 3a)。motif 分析发现, 该蛋白在 13 个物种中均包含多个保守基序(如 motif1/2/3/4/5/6), 且这些基序的位置差异极小(图 3b)。通过分析 *MtNAC47* 与同源基因的外显子和内含子结构, 预测该基因可能编码的蛋白质结构和功能。基因结构分析表明除 *PaNAC47* 和 *TpNAC47* 外, 其他聚类中的基因结构较为相似, 在基因长度、外显子和内含子数量上差异较小(图 3c), 蛋白保守基序分析显示氨基酸残基的变异幅度较小且数量较多(图 3d)。

### 2.2.4 MtNAC47 基因顺式作用元件分析

顺式作用元件分析发现 *MtNAC47* 上游的启动子区除含有光响应元件(Gap-box、GATA-motif 等)外, 还具有多种与植物激素及非生物胁迫相关的反应元件, 如 MeJA 反应元件(CGTC-motif、TGACG-motif), ABA 反应元件(ABRE), GA 反应元件(TATC-box)以及厌氧诱导(ARE)和低温响应(LTR)元件, 说明 *MtNAC47* 基因在调控蒺藜苜蓿的生长发育、激素信号转导和非生物胁迫响应等多种生理过程中发挥重要作用(图 4a、4b)。

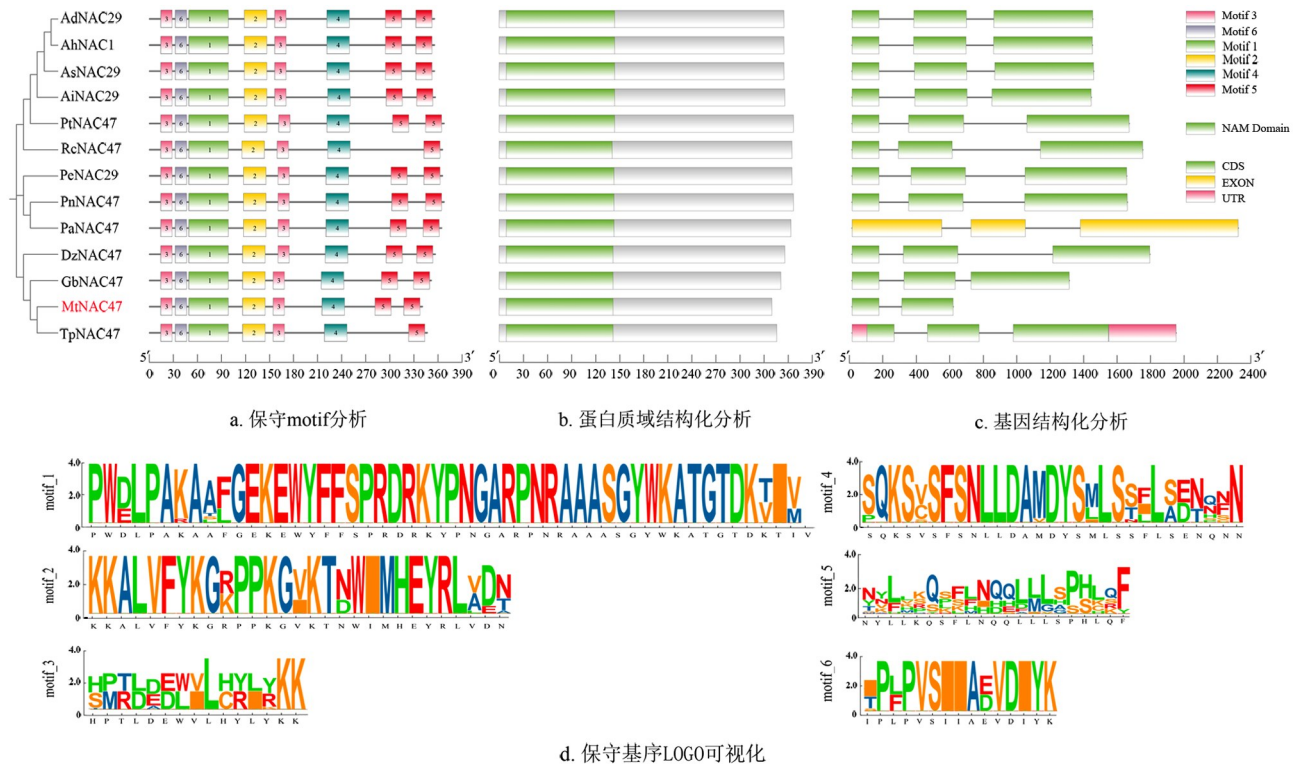


图 3 *MtNAC47* 同源蛋白结构化分析

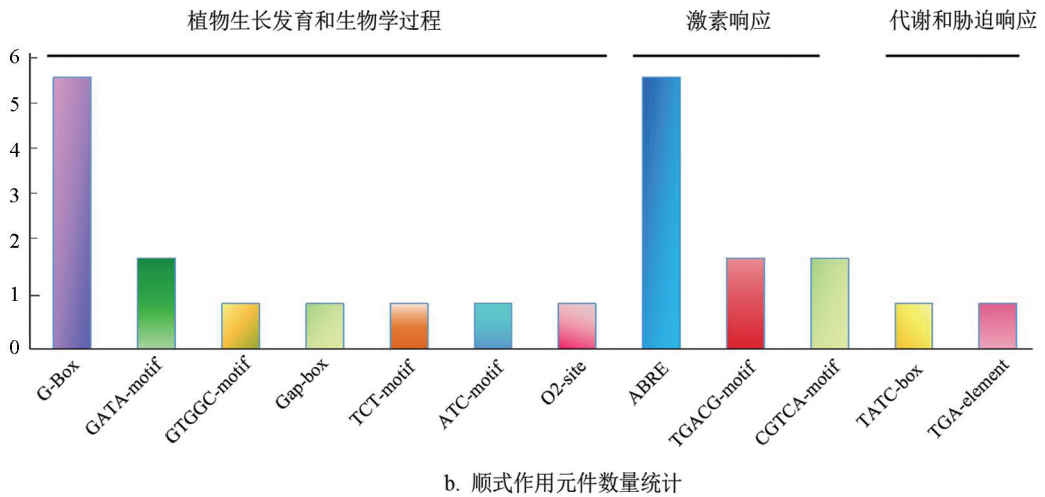
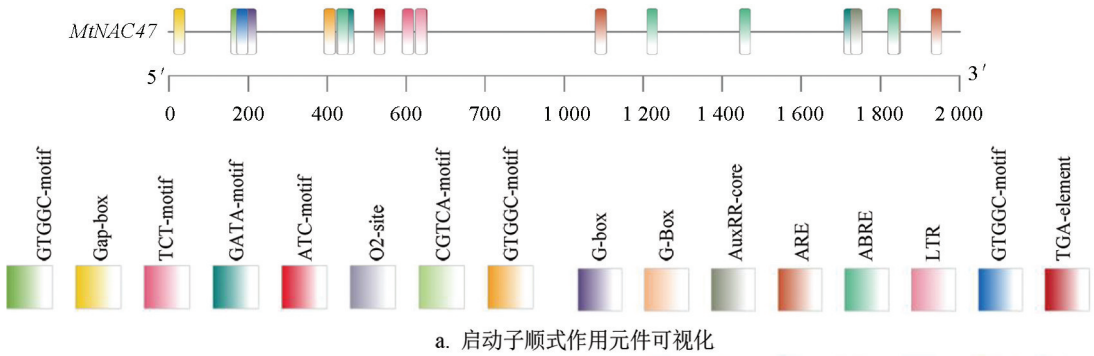


图 4 *MtNAC47* 启动子顺式作用元件分析

### 2.3 MtNAC47 的亚细胞定位

为检测 MtNAC47 蛋白在细胞中的定位情况,将携带 GFP 的 3302Y-MtNAC47 及 3302Y 空载的菌液分别注射到烟草下表皮细胞,暗培养 48 h 后观察荧光信号。在激光共聚焦显微镜下的观察结果表明,处理组烟草表皮细胞在细胞核和细胞质中检测到 MtNAC47-GFP 融合荧光蛋白,对照组烟草则在整个表皮细胞中均可检测到荧光信号,说明 MtNAC47 蛋白定位于细胞核和细胞质(图 5)。

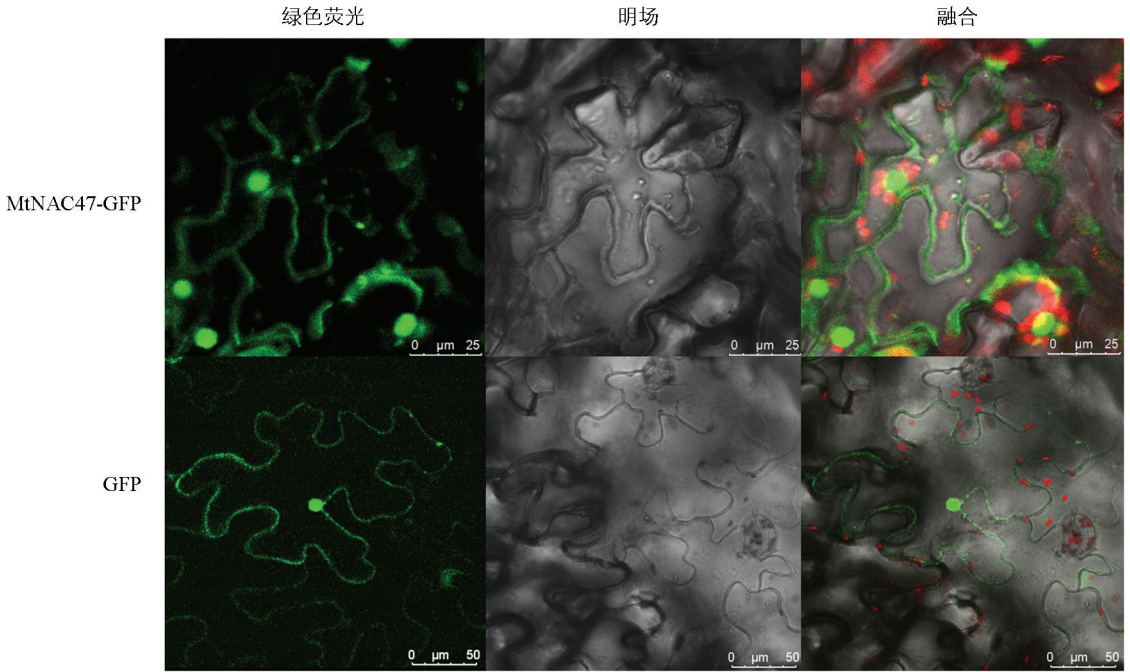
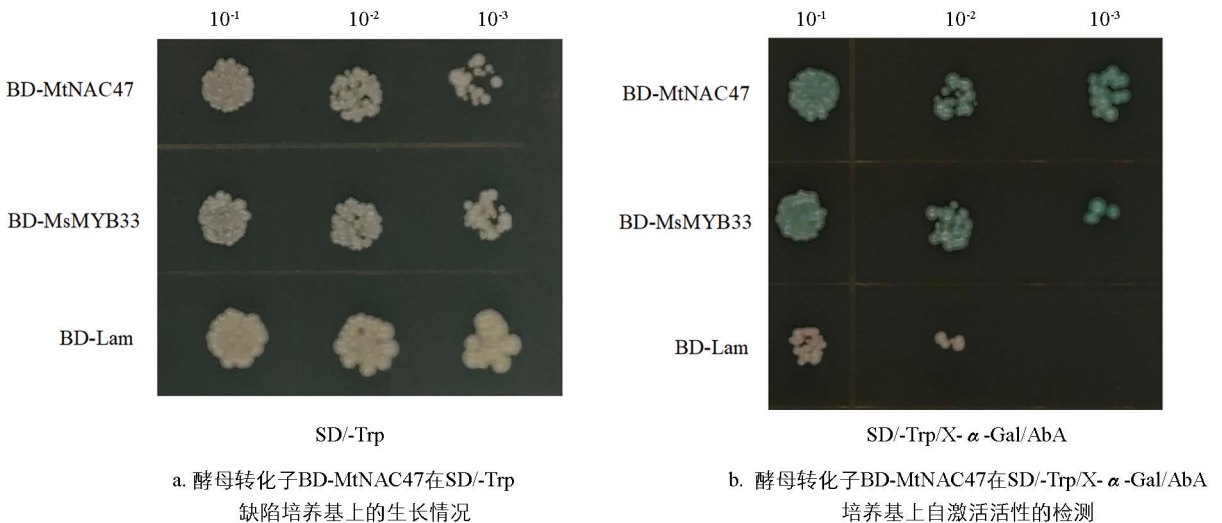


图 5 MtNAC47 亚细胞定位

### 2.4 转录自激活检测

为研究 MtNAC47 是否具有转录自激活活性,将 *MtNAC47* 基因连接到酵母表达载体 pGBKT7-BD 上,转入酵母感受态 Y2HGold 中;并以 BD-MsMYB33 为阳性对照,空白载体 BD-Lam 为阴性对照,稀释后点涂到 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 固体培养基上,进行 3~5 d 的培养。结果显示,在 SD/-Trp 培养基上菌落正常生长;在 SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 固体培养基上,菌落均能够正常生长且表现为蓝色,表明 BD-MtNAC47 存在转录自激活活性(图 6)。



a. 酵母转化子 BD-MtNAC47 在 SD/-Trp 缺陷培养基上的生长情况

b. 酵母转化子 BD-MtNAC47 在 SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 培养基上自激活活性的检测

图 6 MtNAC47 酵母自激活检测

## 2.5 *MtNAC47* 基因的表达模式分析

为更好研究 *MtNAC47* 基因在蒺藜苜蓿器官发育中的作用, 通过荧光定量技术测定 *MtNAC47* 在蒺藜苜蓿不同组织中的表达量。分析表明, *MtNAC47* 在根、茎、叶、花和果中均有表达, 在花中的相对表达量最高, 其次是根和茎, 在果中的相对表达量最低(图 7a)。对蒺藜苜蓿分别进行 ABA、MeJA、SA、GA 激素处理及低温胁迫处理, 以分析 *MtNAC47* 基因在不同激素处理及非生物胁迫下的应答情况。结果显示, ABA 处理后, *MtNAC47* 的相对表达量呈先下降后上升的趋势, 在 9 h 时达到顶峰, 是 0 h 时的 1.4 倍(图 7b); MeJA 处理后, *MtNAC47* 的相对表达量显著下降, 于 9 h 时达到低谷(图 7c); SA 处理后, *MtNAC47* 的相对表达量整体表现为先升后降再回升的趋势, 于 3 h 时到达最高值, 是对照组的 3.8 倍, 随后下降并在 9 h 出现回升(图 7d); GA 处理后, *MtNAC47* 的相对表达量先上升后下降, 在 6 h 时达到最大值, 上调到 0 h 的 2.4 倍(图 7e); 经低温胁迫处理后, *MtNAC47* 的相对表达量整体表现出先下降后上升, 在 6~9 h 出现回升, 随后下降并于 12 h 时出现最低值(图 7f)。

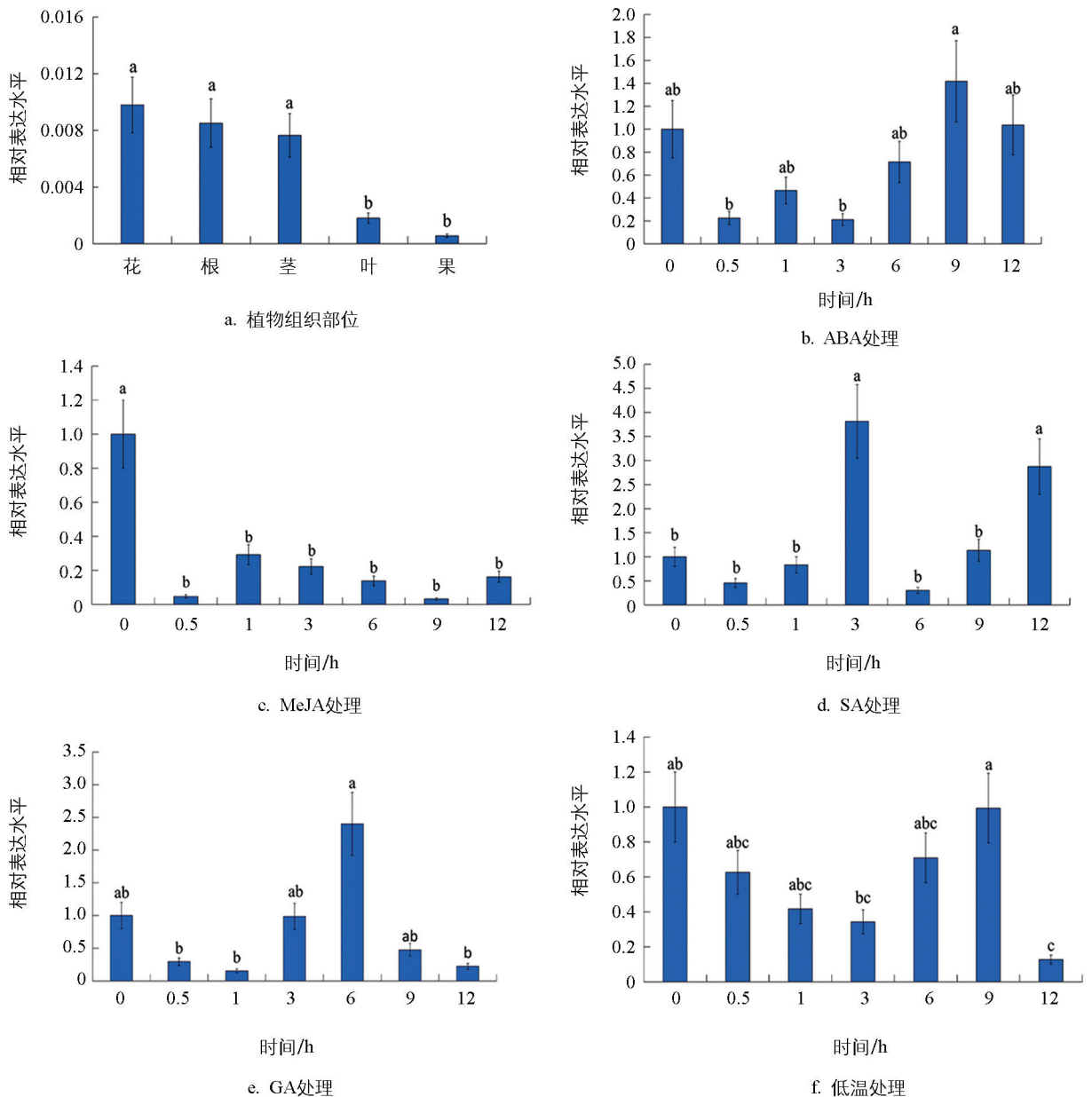


图 7 *MtNAC47* 表达模式分析

## 3 讨论与结论

### 3.1 讨论

NAC 转录因子家族是一类植物特异性调控蛋白,广泛存在于各种植物物种中,从模式植物拟南芥到重要作物如水稻和小麦(*Triticum aestivum* L.),通常超过 100 个成员,在植物生长发育、胁迫应答、代谢途径等多种生物学过程中发挥不可或缺的作用<sup>[23, 26-27]</sup>。本研究基于课题组前期的蛋白互做筛选,成功从蒺藜苜蓿 *MtUFO* 上游转录因子中鉴定出 *MtNAC47* 基因。前期研究已证明 *MtUFO* 在蒺藜苜蓿叶片和花器官发育中发挥重要作用,因此为探究 *MtNAC47* 基因在蒺藜苜蓿基因表达调控中的具体功能,克隆了蒺藜苜蓿中的 *MtNAC47* 基因,对其表达模式、转录自激活活性及亚细胞定位等进行分析,旨在为揭示该转录因子的功能和作用机制提供理论基础。

进化树分析发现, *MtNAC47* 与红三叶 *TpNAC47* 亲缘关系最近,它们可能由共同的祖先进化而来,并具有相似的生物学功能;多序列比对显示 *MtNAC47* 蛋白与毒羊豆、蓖麻、红三叶等同源蛋白相似度较高,且具有相同的 NAM 保守结构域, NAM 结构域是 NAC 转录因子家族的一个标志性特征,它与转录激活、植物生长调节以及逆境响应等生物学过程密切相关<sup>[28]</sup>;基因结构的差异分析及蛋白保守基序分析表明,不同物种的 NAC 基因在转录调控、基因表达和功能上存在多样性, *MtNAC47* 在进化过程中保持了较高的保守性,且在功能上具有相似性和较强的稳定性。亚细胞定位结果显示 *MtNAC47* 定位于细胞核和细胞质,与前人研究结果一致,说明 *MtNAC47* 主要在细胞核和细胞质中行使功能<sup>[29-30]</sup>。蛋白亲疏水性分析表明, *MtNAC47* 含有多个亲水区和疏水区,这可能与其在植物细胞中的功能和定位密切相关。磷酸化位点预测结果显示, *MtNAC47* 蛋白共含有 43 个磷酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点最多,发生磷酸化修饰的可能性最高,推测该蛋白可能通过调控这些特定的磷酸化位点在翻译后修饰其转录因子活性,影响下游基因的表达。转录因子通过与其他蛋白质的相互作用,直接或间接调控基因转录,在植物的应激反应、发育过程及其他重要生理过程中发挥着关键作用。本研究中的酵母自激活检测结果表明, *MtNAC47* 具有自激活活性,这意味着 *MtNAC47* 能够在不依赖外部激活信号的情况下自行触发报告基因的表达。因此, *MtNAC47* 不可直接应用于后续的酵母双杂交(Y2H)系统。

启动子预测有助于揭示基因表达的调控元件,为后续基因表达模式分析提供依据。通过对 *MtNAC47* 基因进行顺式作用元件分析,发现其具有低温胁迫响应元件以及 GA、ABA 等激素响应元件,因此对蒺藜苜蓿进行了相应的胁迫及激素处理。在 SA、GA 处理后的 *MtNAC47* 基因表达量为先上升后下降,这与水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.) *FmNAC1* 的表达模式相类似<sup>[31]</sup>。MeJA 处理后的 *MtNAC47* 表达量呈显著下降趋势,与辣椒(*Capsicum annuum* L.)中的 *CaNAC064* 表达模式一致,推测 *MtNAC47* 在蒺藜苜蓿中可能通过相同或相似的方式来发挥作用<sup>[32]</sup>。

组织表达分析结果显示, *MtNAC47* 基因在花中表达量最高,而在果中最低,表明该基因在蒺藜苜蓿中具有组织特异性。已有研究表明, NAC 转录因子在水稻<sup>[20]</sup>、拟南芥<sup>[21]</sup>和玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)<sup>[33]</sup>等植物中参与根系生长、花瓣细胞扩增以及开花时间的调控,证明了 NAC 转录因子在植物生长发育过程中通过冗余或非冗余的方式发挥重要作用。因此, *MtNAC47* 在花中的高表达说明该基因可能与蒺藜苜蓿的花发育、花器官形成或花期调控密切相关。此外,有报道指出, NAC 转录因子在冷胁迫下会被诱导,参与植物对冷胁迫的反应;并在低温胁迫下可能通过 ABA 信号途径与 NAC 转录因子的调控网络相互作用,共同调控植物的应激反应<sup>[12, 34]</sup>。本试验发现,在 ABA 和低温胁迫处理下, *MtNAC47* 的表达量均表现为先下降后上升的趋势,变化趋势一致,说明 ABA 和低温胁迫均能诱导 *MtNAC47* 的表达。然而, *MtNAC47* 是否通过 ABA 信号通路响应低温胁迫仍需通过后续实验进一步验证。

### 3.2 结论

本研究成功克隆了蒺藜苜蓿 *MtNAC47* 基因,编码 340 个氨基酸,为非跨膜性蛋白,不具有信号肽,

并且是一个亲水不稳定的碱性蛋白; MtNAC47 在进化过程中具有高度保守性, 亚细胞定位于细胞核和细胞质; 该蛋白具有转录自激活活性, 不能直接用于后续酵母双杂交实验。MtNAC47 基因的表达量在 SA、GA、MeJA、ABA 激素诱导及低温胁迫下均有响应, 在花组织中表达量最高, 说明 MtNAC47 不仅在花器官发育中具有重要功能, 还可能在植物对这些激素和逆境胁迫的应答过程中发挥调控作用。以上结果为进一步研究该基因的功能和机制提供了理论参考。

### 参考文献:

- [1] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription Factors in Plant Defense and Stress Responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5): 430-436.
- [2] CHRISTIANSON J A, DENNIS E S, LLEWELLYN D J, et al. ATAF NAC Transcription Factors: Regulators of Plant Stress Signaling [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(4): 428-432.
- [3] 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.
- [4] LIU H J, CHEN S S, WU X M, et al. Identification of the NAC Transcription Factor Family during Early Seed Development in *Akebia trifoliata* (Thumb.) Koidz [J]. *Plants*, 2023, 12(7): 1518.
- [5] AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, et al. Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the *Cup-Shaped Cotyledon* Mutant [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6): 841-857.
- [6] HU R B, QI G, KONG Y Z, et al. Comprehensive Analysis of NAC Domain Transcription Factor Gene Family in *Populus Trichocarpa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 145.
- [7] 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.
- [8] LI J, GUO G H, GUO W W, et al. miRNA164-Directed Cleavage of *ZmNAC1* Confers Lateral Root Development in Maize (*Zea mays* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 220.
- [9] ZHANG L, YAO L, ZHANG N, et al. Lateral Root Development in Potato Is Mediated by St-mi164 Regulation of NAC Transcription Factor [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 383.
- [10] YANG X F, KIM M Y, HA J, et al. Overexpression of the Soybean NAC Gene *GmNAC109* Increases Lateral Root Formation and Abiotic Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* Plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1036.
- [11] 张兆冉, 王利娜, 朱博艺, 等. NAC 转录因子: 参与植物诸多生命过程的调控因子 [J]. *安徽农业科学*, 2024, 52(15): 22-29.
- [12] DIAO P F, CHEN C, ZHANG Y Z, et al. The Role of NAC Transcription Factor in Plant Cold Response [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(9): 1785668.
- [13] LI X D, ZHUANG K Y, LIU Z M, et al. Overexpression of a Novel NAC-Type Tomato Transcription Factor, *SlNAMI*, Enhances the Chilling Stress Tolerance of Transgenic Tobacco [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 204: 54-65.
- [14] MA N N, ZUO Y Q, LIANG X Q, et al. The Multiple Stress-Responsive Transcription Factor *SlNAC1* Improves the Chilling Tolerance of Tomato [J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 149(4): 474-486.
- [15] SAMARINA L S, MALYUKOVA L S, EFREMOV A M, et al. Physiological, Biochemical and Genetic Responses of Caucasian Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) Genotypes under Cold and Frost Stress [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9787.
- [16] HE X J, MU R L, CAO W H, et al. AtNAC2, a Transcription Factor Downstream of Ethylene and Auxin Signaling Pathways, Is Involved in Salt Stress Response and Lateral Root Development [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 903-916.
- [17] BALAZADEH S, SIDDIQUI H, ALLU A D, et al. A Gene Regulatory Network Controlled by the NAC Transcription

- Factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during Salt-Promoted Senescence [J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(2): 250-264.
- [18] WEI K, YU S P, QUAN Q L, et al. An Integrative Analysis of Metabolomics, DNA Methylation and RNA-Seq Data Reveals Key Genes Involved in Albino Tea 'Haishun 2' [J]. *Beverage Plant Research*, 2022, 2(1): 1-9.
- [19] KIM J H, WOO H R, KIM J, et al. Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving *miR164* in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2009, 323(5917): 1053-1057.
- [20] CHEN X, LU S C, WANG Y F, et al. *OsNAC2* Encoding a NAC Transcription Factor that Affects Plant Height through Mediating the Gibberellic Acid Pathway in Rice [J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(2): 302-314.
- [21] HAN K J, ZHAO Y, SUN Y H, et al. NACs, Generalist in Plant Life [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(12): 2433-2457.
- [22] XIE C T, DING Z J. NAC1 Maintains Root Meristem Activity by Repressing the Transcription of *E2Fa* in *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12258.
- [23] 张海娟, 吴剑锋, 胡帅, 等. 芜菁 NAC 转录因子 *BcNAC2* 基因的分离及其表达 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(6): 1089-1096.
- [24] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物——蒺藜苜蓿 [J]. *草业学报*, 2008, 17(1): 114-120.
- [25] 杨春, 王晓倩, 王红军, 等. 蒺藜苜蓿 *MtZHD4* 基因克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. *生物技术通报*, 2025, 41(5): 244-254.
- [26] XIONG H Y, HE H D, CHANG Y, et al. Multiple Roles of NAC Transcription Factors in Plant Development and Stress Responses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(3): 510-538.
- [27] OLSEN A N, ERNST H A, LEGGIO L L, et al. NAC Transcription Factors: Structurally Distinct, Functionally Diverse [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79-87.
- [28] HU P, ZHANG K M, YANG C P. BpNAC012 Positively Regulates Abiotic Stress Responses and Secondary Wall Biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(2): 700-717.
- [29] 郑林, 王帅, 刘语诺, 等. 柑橘响应黄龙病菌侵染的 NAC 基因的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2022, 49(7): 1441-1457.
- [30] 曲硕, 刘芳, 孙浩文, 等. 大豆 NAC 转录因子生物信息学分析及 *GmNAC-1* 克隆和亚细胞定位 [J]. *大豆科学*, 2024, 43(5): 523-538.
- [31] CAO Y, HE L M, LU S D, et al. Function of the *NAC1* Gene from *Fraxinus Mandshurica* in Cold Resistance and Growth Promotion in Tobacco [J]. *Forests*, 2024, 15(8): 1405.
- [32] HOU X M, ZHANG H F, LIU S Y, et al. The NAC Transcription Factor *CaNAC064* Is a Regulator of Cold Stress Tolerance in Peppers [J]. *Plant Science*, 2020, 291: 110346.
- [33] PEI H X, MA N, TIAN J, et al. An NAC Transcription Factor Controls Ethylene-Regulated Cell Expansion in Flower Petals [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 775-791.
- [34] 柳展基, 邵凤霞, 唐桂英, 等. 一个新的玉米 NAC 类基因(*ZmNAC1*)的克隆与分析 [J]. *遗传*, 2009, 31(2): 199-205.

责任编辑 张枸

柳剑