

朱 峰,陈孝仁,钱 坤,等. 生物胁迫相关 NAC1 转录因子的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):43-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.010

生物胁迫相关 NAC1 转录因子的生物信息学分析

朱 峰,陈孝仁,钱 坤,纪兆林,孔维文,杨益众

(扬州大学园艺与植物保护学院,江苏扬州 225009)

摘要:植物 NAC1 转录因子在调控植物的抗生物胁迫反应中起着重要的作用。为探究生物逆境相关 NAC1 转录因子的功能,通过生物信息学的方法对 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白氨基酸序列一致性、氨基酸组成、理化性质、亲/疏水性、保守结构域、磷酸化位点、亚细胞定位、二级结构及三级结构等进行了预测和分析。结果表明,8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白 N-端保守性较强,包括 5 个保守的亚结构域,共同组成 NAC1 结构域。C-端含有多个保守的氨基酸,具有转录激活功能。同时蛋白中含有多个丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)磷酸化位点。8 个 NAC1 蛋白都为亲水性蛋白,大多定位于细胞核,个别定位于细胞质或叶绿体。二级结构则以 α -螺旋和 β -折叠为主。8 个 NAC1 蛋白三维结构上的相似性暗示了功能上存在相似。本研究结果为进一步挖掘生物逆境相关 NAC1 转录因子的功能和改良植物抗生物逆境特性提供理论依据。

关键词:生物胁迫;NAC1 转录因子;生物信息学;抗生物逆境特性

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0043-06

NAC(NAM/ATAF/CUC)转录因子家族是目前发现的最大的一类植物特有的转录因子,在其他真核生物中尚未发现该家族成员^[1-2]。NAC 家族的命名源于矮牵牛(*Petunia hybrida*) NAM(*no apical meristem*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) ATAF1、ATAF2 以及 CUC2(*cup-shaped cotyledon*) 基因^[3-4]。研究表明,NAC 转录因子具有多种功能,在植物的生长发育、器官建成、激素信号应答及逆境胁迫中均发挥重要的作用,已成为当前植物基因功能及表达网络调控研究中的热点^[2,5-6],如枝顶端分生组织发育^[7]、植物的衰老^[8-10]、细胞分裂^[11]、植物激素调控与信号转导^[12-13]和参与生物胁迫中植物的防御反应^[14-16]等。

NAC 转录因子是一个庞大的家族,大量的 NAC 基因被识别,其中在拟南芥中已发现 117 个 NAC 基因,水稻中发现 151 个 NAC 基因,葡萄中发现 79 个 NAC 基因,烟草中发现 152 个 NAC 基因^[17]。越来越多的研究表明了 NAC1 基因在调控植物的抗生物胁迫反应起着重要的作用。辣椒 *CaNAC1* 在细菌性斑点病菌侵染后快速诱导,而且非寄主病菌侵染和抗病信号分子 SA 和 ET 处理后也能诱导 *CaNAC1* 强烈的表达^[18]。先前的研究表明假单胞杆菌可以诱导番茄 *SINAC1* 基因的表达^[19],进一步研究表明番茄 *SINAC1* 在调控植物抗性抵抗假单胞杆菌侵染起着重要的作用,并且番茄 *SINAC1* 和本生烟 *NbNAC1* 有高度的同源性,抑制 *NbNAC1*,削弱植物的抗性,增加本生烟对假单胞杆菌的敏感性^[20]。葡萄 *VvNAC1* 基因调控葡萄的防御反应应答坏死型和活体营养型病原菌的入

侵,在拟南芥中过量表达 *VvNAC1* 基因可以增强植物对坏死型和活体营养型病原菌的入侵,并且防御相关的植物激素(如 SA、MeJA、ABA 和乙烯)可以诱导葡萄 *VvNAC1* 基因的表达^[21]。在大麦中过量表达 *HvSNAC1* 基因能够增强大麦对镰刀菌的抗性,减轻叶斑病症状^[22]。一些研究表明,NAC 转录因子在应答病毒入侵时也起着一定的作用。番茄曲叶病毒(tomato leaf curl virus, TLCV)能够诱导番茄 *SINAC1* 基因的表达,并且该病毒编码的 Ren(geminiviral replication enhancer)蛋白能与 *SINAC1* 蛋白相互作用,过量表达 *SINAC1* 后可以加速 TLCV 的 DNA 积累^[23]。

因此本研究将通过生物信息学的方法对生物逆境胁迫相关的普通烟 *NtNAC1*、番茄 *SINAC1*、拟南芥 *AtATAF1*、辣椒 *CaNAC1*、大麦 *HvSNAC1*、小麦 *TaNAC1*、水稻 *OsNAC1* 和葡萄 *VvNAC1* 转录因子的理化性质、等电点、亲/疏水性、序列一致性、磷酸化位点、保守结构域、亚细胞定位、二级结构和蛋白三维结构等进行预测和比较分析,旨在为进一步挖掘生物逆境相关 NAC1 转录因子的功能和改良植物抗生物逆境特性提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 GenBank 上下载普通烟 *NtNAC1*、番茄 *SINAC1*、拟南芥 *AtATAF1*、辣椒 *CaNAC1*、大麦 *HvSNAC1*、小麦 *TaNAC1*、水稻 *OsNAC1* 和葡萄 *VvNAC1* 转录因子的氨基酸序列。

1.2 NAC1 蛋白氨基酸序列比对及系统发生树构建

利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列一致性分析。利用在线程序 Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行氨基酸多重序列比对。利用 MEGA 5.0 软件^[24]构建系统发生树,采取遗传距离建树法的相邻连接法(neighbor-joining, NJ)建树,对构建的树进行自检(boot-

收稿日期:2016-04-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31500209);江苏省高校自然科学基金面上项目(编号:15KJB210007);江苏省扬州市自然科学基金-青年科技人才项目(编号:YZ2015106)。

作者简介:朱 峰(1985—),男,江西九江人,博士,讲师,主要从事植物病理与分子生物学研究。E-mail:zhufeng@yzu.edu.cn。

strap), 重复设定为 1 000。

1.3 NAC1 蛋白一级结构及理化特性分析

利用在线程序 ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 对蛋白理化性质进行分析^[25]。利用在线程序 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行氨基酸疏水性分析, 利用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行蛋白磷酸化位点修饰分析^[26]。

1.4 NAC1 蛋白二级结构预测及亚细胞定位分析

利用在线程序 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测 α -螺旋 (alpha helix)、 β -折叠 (extended strand)、 β -转角 (beta turn)、无规卷曲 (random coil) 等蛋白二级结构。利用在线程序 WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行蛋白亚细胞定位^[27]。

1.5 NAC1 蛋白三级结构预测

利用 SWISS-MODEL workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) 对蛋白的三维结构进行同源模拟^[28]。其中 *SINAC1*、*CaNAC1*、*AtATAF1*、*TaNA1*、*NtNAC1*、*OsNAC1* 和

HbSNAC1 的模板 PDB 号都是 3ulxA, *VvNAC1* 的模板 PDB 号是 1ut7B。然后通过 UCSF Chimera 软件将蛋白三维结构读取出来^[29]。

2 结果与分析

2.1 NAC1 蛋白氨基酸序列比对及系统发生树构建

通过 DNAMAN 软件对这 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白氨基酸序列的一致性进行分析, 发现它们的氨基酸序列一致性为 46.52%。进一步通过在线程序 Clustal Omega 对它们进行多重序列比对, 寻找 NAC1 中的保守区域。如图 1 所示, 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 转录因子在氨基酸序列 N-端保守性较强, 其结构域由高度保守的约 150 个氨基酸残基组成。C-端氨基酸则具有高度的多样性, 但 C-端仍有几个较为保守的氨基酸, 如酪氨酸 (Y)、亮氨酸 (L)、缬氨酸 (V)、丝氨酸 (S)。利用 MEGA 5.0 软件对这 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白构建系统进化树。如图 2 所示, *SINAC1* 和 *CaNAC1* 亲缘关系最近, 和 *AtATAF1* 亲缘关系稍近, 与 *NtNAC1* 的亲缘关系最远。

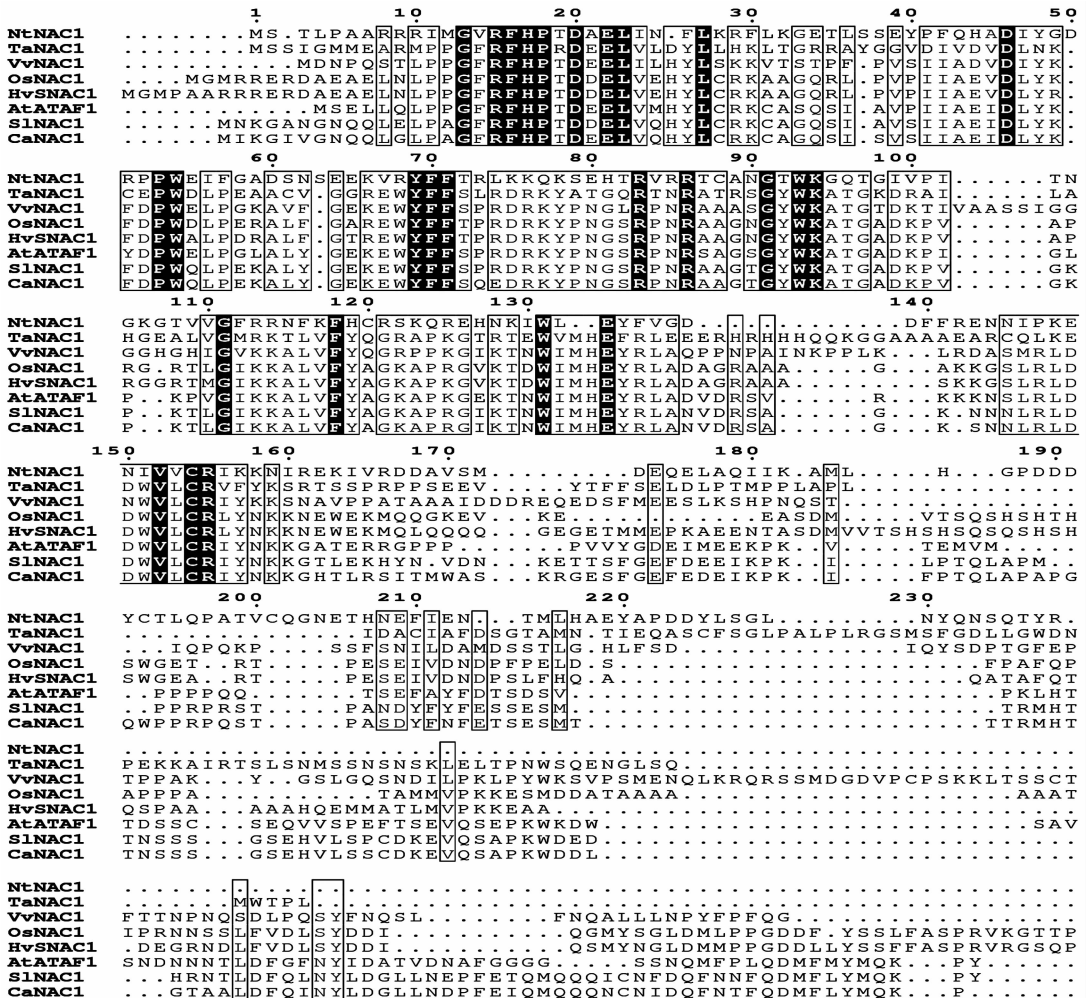


图1 生物逆境胁迫相关 NAC1 转录因子氨基酸序列比对

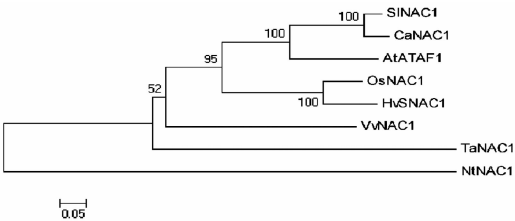


图2 8 种生物逆境胁迫相关 NAC1 转录因子的系统发育树

2.2 NAC1 蛋白理化性质及亲疏水性分析

利用在线程序 ProtParam 预测 NAC1 蛋白的理化性质(表 1),结果表明,NtNAC1、OsNAC1、SINAC1 和 CaNAC1 为稳定蛋白,而 TaNAC1、VvNAC1、HvSNAC1 和 AtATAF1 为不稳定蛋白。由预测的等电点可知,生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白

中碱性等电点居多,如 NtNAC1、SINAC1、CaNAC1、TaNAC1 和 VvNAC1,也有酸性等电点,如 OsNAC1、HvSNAC1、AtATAF1。从蛋白组成可以看出,NtNAC1 中精氨酸(Arg)含量最高,TaNAC1 中亮氨酸(Leu)含量最高,OsNAC1 和 HvSNAC1 中丙氨酸(Ala)含量最高,VvNAC1 和 AtATAF1 中脯氨酸(Pro)含量最高,SINAC1 和 CaNAC1 中赖氨酸(Lys)含量最高。

另外由表 1 可以看出,8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白的亲水性平均系数都为负值,说明它们都是亲水性蛋白,其中 SINAC1 的亲水性平均系数最小,说明 SINAC1 蛋白的亲水性最强。为了进一步证实 NAC1 蛋白都属于亲水性蛋白,利用在线程序 ProtScale 对 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白进行疏水性/亲水性预测(图 3)。根据氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强的规律,介于 +0.5 至 -0.5 之间

表 1 NAC1 蛋白的氨基酸组成及理化性质

蛋白名称	分子量 (u)	主要氨基酸含量 (%)	蛋白不稳定 指数	酸性氨基酸/碱性氨基酸	理论等 电点	亲水性 平均系数
NtNAC1	27 845.4	Arg(8.4),Asn(6.3),Glu(7.6),Ile(6.3),Lys(6.7),Thr(6.3)	39.50S	32/36	8.73	-0.764
TaNAC1	32 750.2	Ala(8.0),Arg(8.3),Glu(7.3),Gly(7.6),Leu(9.7),Ser(7.6)	49.84U	35/37	8.18	-0.537
VvNAC1	37 503.3	Asp(6.3),Leu(7.8),Lys(7.2),Pro(10.7),Ser(9.9)	50.73U	33/37	8.75	-0.628
OsNAC1	34 989.5	Ala(11.8),Arg(7.3),Asp(7.6),Gly(7.6),Pro(8.9)	35.40S	43/42	6.62	-0.619
HvSNAC1	36 942.5	Ala(11.5),Arg(7.3),Asp(7.0),Gly(7.6),Pro(7.6)	42.70U	44/41	6.33	-0.720
AtATAF1	32 922.3	Asp(6.6),Glu(6.6),Gly(6.6),Lys(8.0),Pro(9.3),Ser(7.6)	54.52U	38/36	6.15	-0.661
SINAC1	34 835.2	Asn(7.0),Asp(6.3),Glu(6.3),Leu(7.6),Lys(8.0),Pro(7.0)	38.46S	38/39	7.62	-0.837
CaNAC1	34 986.5	Ala(6.5),Gly(7.2),Leu(7.2),Lys(7.5),Pro(6.5),Ser(6.8)	38.04S	35/37	8.15	-0.652

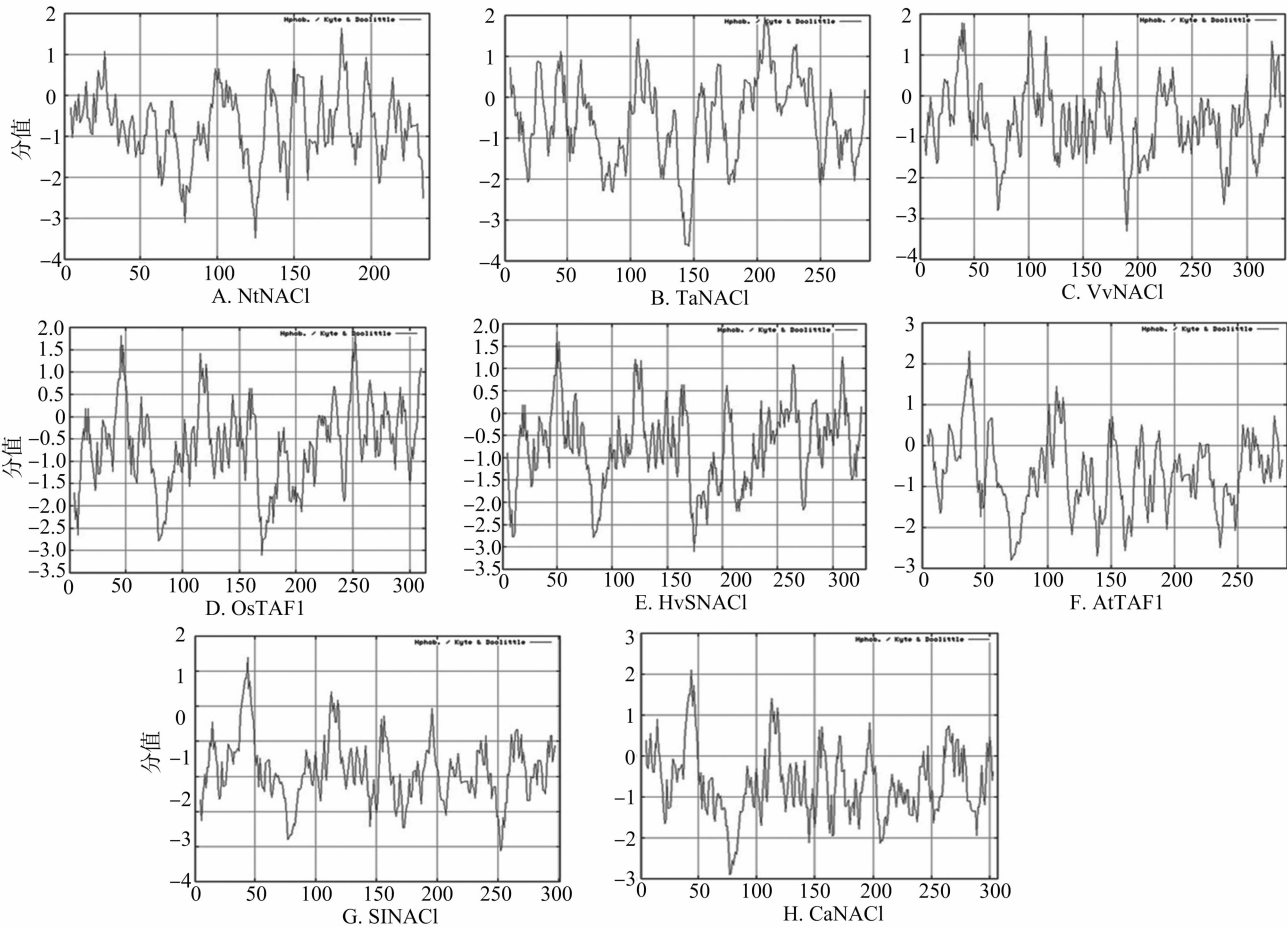


图3 生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白疏水性/亲水性预测

的主要为两性氨基酸,从整体来看,这 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白氨基酸的分值为负值,也就说明了它们都为亲水性蛋白。从图 3 还可以看出,SINAC1 蛋白氨基酸整体上的分值是最低的,说明了 SINAC1 蛋白的亲水性最好。这也证实了在线程序 ProtParam 预测 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白都为亲水性蛋白的结果。其中在 SINAC1 多肽链中第 252 位的谷氨酸(Glu)具有最低分值为 -3.122,亲水性最强,第 44 位的异亮氨酸(Ile)具有最高分值 2.389,疏水性最强。

2.3 NAC1 蛋白磷酸化分析

蛋白质合成后,化学修饰是一种对其活性进行调节的重要形式。因此对氨基酸序列翻译后修饰的预测和分析可以为认识蛋白质的亚细胞定位以及推测蛋白功能提供重要的帮助。蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)是生物界最普遍也是最重要的一种蛋白质翻译后修饰。蛋白质磷酸化和去磷酸化是原核和真核生物细胞表达调控的关键环节,对许多生物的细胞功能起开关调控作用。如蛋白激酶 C 的磷酸化对于基因表达、细胞分化、机体代谢和增殖起着重要的作用。其中蛋白磷酸化主要有氨基酸序列中苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)和丝氨酸(S)的磷酸化。因此利用 NetPhos 2.0 Server 在线程序对这 8 个 NAC1 蛋白氨基酸磷酸化位点进行了预测。生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白的磷酸化位点数量如表 2 所示。结果显示,这 8 个生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白中丝氨酸磷酸化位点最多。

2.4 NAC1 蛋白二级结构预测及亚细胞定位分析

蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等。如表 3 所示,通过在线程序 SOPMA 的预测,结果表明,生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白中无规卷曲的比例较高(38.66%~54.33%),它具有连接其他二级结构元件的作用;此外,主要二级结构元件有 α -螺旋(18.69%~

32.80%) 和 β -折叠(14.63%~24.57%)。生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白二级结构预测见图 4,它们在二级结构上也具有较高的相似性。尤其是 SINAC1 和 CaNAC1 中的二级结构(如 α -螺旋和 β -折叠)出现的氨基酸残基的位置比较相近,同样 *OsNAC1* 和 *HvSNAC1* 中的二级结构出现的氨基酸残基的位置也很相近。

表 2 生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白氨基酸序列磷酸化位点预测

蛋白名称	磷酸化位点数量(个)		
	丝氨酸	苏氨酸	酪氨酸
NtNAC1	5	1	4
TaNAC1	10	4	2
VvNAC1	17	4	5
OsNAC1	9	4	4
HvSNAC1	11	4	2
AtATAF1	10	5	6
SINAC1	8	5	5
CaNAC1	9	5	6

表 3 生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白二级结构预测

蛋白名称	α -螺旋比例 (%)	β -折叠比例 (%)	β -转角比例 (%)	无规卷曲比例 (%)
NtNAC1	27.31	23.53	10.50	38.66
TaNAC1	31.49	15.57	10.73	42.21
VvNAC1	26.27	14.63	4.78	54.33
OsNAC1	32.80	15.29	5.41	46.50
HvSNAC1	30.61	17.58	7.88	43.94
AtATAF1	18.69	24.57	7.27	49.48
SINAC1	28.24	16.28	6.31	49.17
CaNAC1	24.10	18.57	9.45	47.88

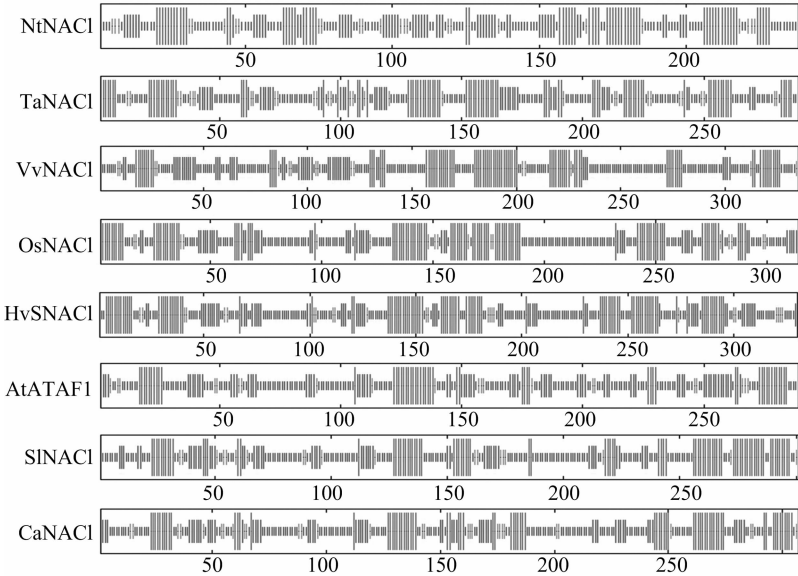


图4 生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白质的二级结构

利用在线程序 WOLF PSORT 分别对 8 个 NAC1 成员蛋白质的亚细胞定位进行分析,结果以得分形式表现。结果(表 4)表明,TaNAC1 定位于细胞质的可能性较大,CaNAC1 定位于叶绿体的可能性较大,其余蛋白定位于细胞核,这也从侧面

表明了这些转录因子的存在及其发挥功能的场所主要是细胞核。

2.5 NAC1 蛋白三维结构分析

蛋白质三级结构的预测和分析对理解蛋白质结构和功能

表 4 生物逆境胁迫相关 NAC1 蛋白亚细胞定位预测

蛋白名称	得分				
	Nucl	Cyto	Chol	Mito	Plas
NtNAC1	7	2		4	
TaNAC1	2	6	2	2	
VvNAC1	12	1			0.5
OsNAC1	10		3	1	
HvSNAC1	11		2		1
AtATAF1	11	3			
SINAC1	7	1		4	2
CaNAC1	2	2	5		

之间的关系有一定的作用。因此通过 SWISS - MODEL workspace 对 NAC1 蛋白三维结构进行同源模拟。结果表明,

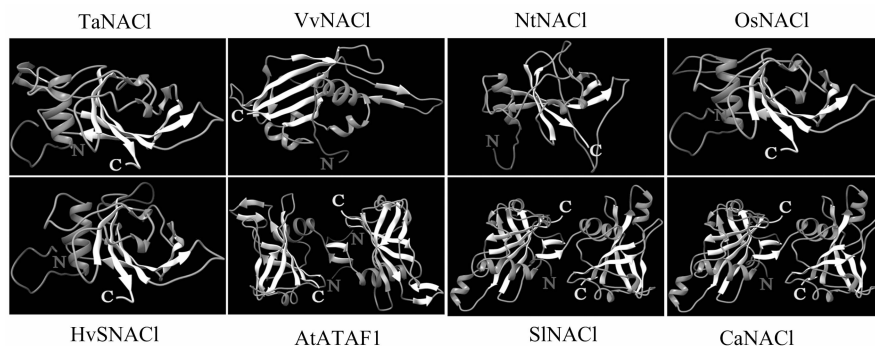


图5 同源模拟生物逆境胁迫相关NAC1蛋白三维结构

3 讨论与结论

植物转录因子的研究不仅是当前生物科学研究领域的热点,而且是功能基因组学研究的重要内容之一。大量研究表明,NAC 转录因子在植物生长发育中具有重要的调控作用^[2],而且也参与植物对于旱、高盐、低温等非生物和病原菌侵染等生物胁迫的抗逆反应、激素信号途径的转导、机体的凋亡等方面^[2,5-6]。越来越多的研究表明,NAC1 基因在调控植物的抗生物胁迫(如细菌、真菌、病毒的侵染)方面起着重要的作用。因此本研究重点针对 NAC1 基因进行了生物信息学分析。

氨基酸序列比对结果表明 NAC1 转录因子在 N - 端保守性非常强,其结构域可以分为 5 个亚结构域。研究表明,NAC 转录因子 C - 端富含酸性氨基酸、谷氨酰胺和脯氨酸等氨基酸时,一般是转录激活区域^[30-32]。本研究比对结果显示,生物逆境胁迫相关 NAC1 转录因子的 C - 端氨基酸组成比较符合这个特征,推测参与转录激活。近年来,关于核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的研究已经越来越深入,大致可分为以下 3 类^[33]:(1)单一型(monopartite)NLS。这种 NLS 最初发现存在于猿猴病毒 40 的大 T 抗原中,包含 7 个氨基酸(PKKKRKV)的短肽^[34]。单一型 NLS 一般是由 4~8 个氨基酸组成的短肽,富含带正电荷的 Lys - 和 Arg -, 通常还含有 Pro。(2)双分型(bipartite)NLS。这种 NLS 是由 2 簇碱性氨基酸组成,中间是由 10~12 个非保守性氨基酸分隔而形成的序列。研究表明双向的信号可能是标准的 NLS^[35]。Nogueira 等发现 SsNAC23 包含 1 个双向的核定位信号^[36-37]。(3)其他类型 NLS。除上述 2 类典型的 NLS 外,还有一些没有特定序列特征的 NLS,它们主要存在于可在细胞核和细胞

SINAC1、CaNAC1 和 AtATAF1 由于亲缘关系较近,结构相似,包含 A 链和 B 链,而 TaNAC1、VvNAC1、NtNAC1、OsNAC1、HvSNAC1 都只包含 1 条链(图 5)。并且 SINAC1 和 CaNAC1 的 A 链和 B 链以及 NtNAC1 都是包含 4 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠,而 AtATAF1 的 A 链和 B 链以及 TaNAC1 都是由 3 个 α 螺旋和 9 个 β 折叠组成。OsNAC1 和 HvSNAC1 由 3 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠组成。VvNAC1 由 4 个 α 螺旋和 9 个 β 折叠组成。总体来看,8 个成员的二级结构有着较高的相似性,这从某种程度上反映了它们在三级结构上的相似性。一般认为 α 螺旋和 β 折叠比无规则卷曲要稳定,对维持蛋白质分子空间结构的相对稳定起着重要的作用。本试验结果为进一步深入了解 NAC1 蛋白的结构和生物学功能提供了依据。

质间穿梭的蛋白质中。本研究中 8 个生物逆境胁迫 NAC1 转录因子大多定位于细胞核,由亚细胞定位的结果可以推断,具有相近生物学功能的 NAC1 蛋白可能定位于相同的亚细胞结构。

对这些生物逆境胁迫 NAC1 蛋白的二级结构进行分析进一步得知这些蛋白均属于亲水蛋白,但他们在亲水程度方面存在差异。SINAC1 蛋白的亲水性最强,表明 SINAC1 蛋白更易水解。蛋白三维结构与其生物学功能息息相关^[38]。通过 SWISS - MODEL workspace 对 NAC1 蛋白三维结构进行同源模拟,结果发现,SINAC1、CaNAC1 和 AtATAF1 结构相似,包含 A 链和 B 链,各自形成 1 个对称的同源二聚体。目前,已有研究通过晶体衍射的方法将拟南芥 ANAC 蛋白和水稻胁迫响应 NAC1 蛋白的结构解析出来。结果证实它们的晶体结构为 1 个对称的同源二聚体,并且每个单体包含 6 个反向平行的 β - 折叠和 3 个 α - 螺旋^[39-40]。总体来看,8 种成员的二级结构中的 α - 螺旋、 β - 折叠和无规卷曲具有较高的保守性。这也从某种程度上反映了它们在三级结构上的相似性以及生物学功能的相似性。

综上所述,NAC1 转录因子保守结构域的序列将直接影响到 NAC1 蛋白的亲水性、疏水性、亚细胞定位、二级结构以及三级结构的形成等,进而影响 NAC1 蛋白的生理功能。因此本研究应用生物信息学的方法对已知蛋白序列 NAC1 进行序列比对、分析、推断和预测其结构和功能,为进一步挖掘生物逆境相关 NAC1 转录因子的功能和改良植物抗生物逆境特性提供理论依据。

参考文献:

[1] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription

- factors; genome – wide comparative analysis among eukaryotes [J]. Science, 2000, 290(5499): 2105 – 2110.
- [2] 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.
 - [3] Souer E, Vanhouwelingen 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] 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.
 - [5] Zheng X, Chen B, Lu G, et al. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 379(4): 985 – 989.
 - [6] Nuruzzaman M, Sharoni A M, Satoh K, et al. Comprehensive gene expression analysis of the NAC gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near – isogenic lines (NILs) generated from crossing Aday Selection (drought tolerant) and IR64 [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(5): 389 – 410.
 - [7] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, et al. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18(11): 2929 – 2945.
 - [8] Guo Y, Gan S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence [J]. The Plant Journal, 2006, 46(4): 601 – 612.
 - [9] Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat [J]. Science, 2006, 314(583): 1298 – 1301.
 - [10] 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: for Cell and Molecular Biology, 2010, 62(2): 250 – 264.
 - [11] Kim S Y, Kim S G, Kim Y S, et al. Exploring membrane – associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(1): 203 – 213.
 - [12] 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.
 - [13] Kim S G, Lee A K, Yoon H K, et al. A membrane – bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid – mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination [J]. The Plant Journal, 2008, 55(1): 77 – 88.
 - [14] Delessert C, Kazan K, Wilson I W, et al. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis – related genes in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2005, 43(5): 745 – 757.
 - [15] 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 Science, 2007, 172(1): 120 – 130.
 - [16] Donze T, Qu F, Twigg P, et al. Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in *Arabidopsis* by binding to the NAC transcription factor TIP [J]. Virology, 2014, 449(20): 207 – 214.
 - [17] Nuruzzaman M, Sharoni A M, Kikuchi S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(4): 248.
 - [18] 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(5): 876 – 887.
 - [19] Mysore K S, Crasta O R, Tuori R P, et al. Comprehensive transcript profiling of Pto – and Prf – mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato [J]. The Plant Journal, 2002, 32(3): 299 – 315.
 - [20] Huang W, Miao M, Kud J, et al. SINAC1, a stress – related transcription factor, is fine – tuned on both the transcriptional and the post – translational level [J]. The New Phytologist, 2013, 197(4): 1214 – 1224.
 - [21] Le Hénaff G, Profizi C, Courteaux B, et al. Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(16): 4877 – 4893.
 - [22] Mcgrann G R, Steed A, Burt C A, et al. Contribution of the drought tolerance – related Stress – responsive NAC1 transcription factor to resistance of barley to *Ramularia* leaf spot [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(2): 201 – 209.
 - [23] Selth L A, Dogra S C, Rasheed M S, et al. A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication [J]. The Plant Cell, 2005, 17(1): 311 – 325.
 - [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 – 2739.
 - [25] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server [M]. The proteomics protocols handbook. New York: Humana Press, 2005: 571 – 607.
 - [26] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure – based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1351 – 1362.
 - [27] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): W585 – W587.
 - [28] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS – MODEL workspace: a web – based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195 – 201.
 - [29] Zhu F, Xu M, Wang S, et al. Prokaryotic expression of pathogenesis related protein 1 gene from *Nicotiana benthamiana*: antifungal activity and preparation of its polyclonal antibody [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(5): 919 – 924.
 - [30] Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, et al. GAL4 – VP16 is an unusually potent transcriptional activator [J]. Nature, 1988, 335(6190): 563 – 564.
 - [31] Courey A J, Holtzman D A, Jackson S P, et al. Synergistic activation by the glutamine – rich domains of human transcription factor Sp1 [J]. Cell, 1989, 59(5): 827 – 836.
 - [32] Mermod N, O’neill E A, Kelly T J, et al. The proline – rich transcriptional activator of CTF/NF – I is distinct from the replication and DNA binding domain [J]. Cell, 1989, 58(4): 741 – 753.

董 斌,陈海超,杨 伦,等. H7 亚型禽流感病毒 HA 基因的原核表达及表达产物的反应原性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):49-52. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.011

H7 亚型禽流感病毒 HA 基因的原核表达及表达产物的反应原性分析

董 斌¹,陈海超¹,杨 伦¹,耿文学¹,熊晓妍¹,孙兴臣¹,李敏捷¹,陈 闻¹,蒋家森^{2,3},许家荣^{1,2,4}

(1. 南京农业大学,江苏南京 210095; 2. 南京千里光生物技术有限公司,江苏南京 210095;

3. 江苏省句容市科兴养殖基地,江苏句容 212400; 4. 句容市浩源农业科技有限公司,江苏句容 212400)

摘要:为构建新型 H7 亚型禽流感 HA 基因的原核表达载体,并在大肠杆菌中进行表达。从 NCBI 数据库下载 H7 亚型禽流感 HA 全基因序列,合成 HA 基因;定向克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 的多克隆位点中,构建重组原核表达质粒 pET-32a(+)-HA;转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 和 Western-blot 法鉴定。结果显示,重组质粒经双酶切及基因测序鉴定构建正确;重组的 HA 融合蛋白约为 84 ku,大小与预期融合蛋白大小一致;重组 HA 融合蛋白可以与 His 标签单克隆抗体特异性结合,与 H7 阳性血清有较强的反应原性。成功构建了 HA 基因原核表达载体,并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得重组 HA 融合蛋白表达。

关键词:H7N9 禽流感病毒;HA 基因;pET32a(+);原核表达;反应原性分析

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0049-04

H7N9 型禽流感病毒感染人事件于 2013 年 3 月底在华东地区(上海和安徽 2 地)率先发生,感染以迅速进展的肺炎、呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和致死性转归为特点^[1]。目前,已经在鸡、鸽子中检测到 H7N9 型禽流感病毒,但这些家禽不表现明显的临床症状。陈化兰团队在《科学通报》的最新研究显示,近期在我国导致人感染的新 H7N9 流感病毒与同一时期存在于活禽市场上的 H7N9 流感病毒高度同源;该新型 H7N9 流感病毒是不同来源病毒的重组病毒,它的 6 个内部基因来源于 H9N2 禽流感病毒,HA 基因来源于浙江鸭 H7N3,NA 基因来自韩国野生鸟类携带的 H7N9;H7N9

病毒的受体结合位点获得了部分人流感病毒特征的突变,病毒再感染人后获得了关键氨基酸位点的适应性突变,这可能与该病毒对人的感染和致死能力有关^[2]。尚未证实此类病毒是否具有人传染人的特性,但已有家族式感染的报道^[3],到目前已有数名患者抢救无效死亡。

禽流感病毒在生物分类学上属正黏病毒科(Orthomyxoviridae)A 型流感病毒属(Influenzavirus A)^[4-5]。A 型流感病毒基因组为 8 个节段的单股负链 RNA,编码 11 种功能蛋白。病毒基因组分节段的特性使流感病毒容易发生基因重排。A 型流感病毒呈多形性,多为球形,然而新分离的主要为丝状。病毒直径 80~120 nm。病毒粒子结构的最外层为来自于宿主细胞的双层类脂囊膜。囊膜上有 3 种蛋白突起(又称纤突):血凝素(hemagglutinin,HA)、神经氨酸酶(neuraminidase,NA)和基质蛋白 2(matrixprotein,M2),这 3 种突起均以疏水性氨基酸锚定在类脂膜上。中间层为基质蛋白 1(M1)。最里层是呈螺旋型对称的核衣壳,含有核蛋白(nucleoprotein,NP)、3 种多聚蛋白酶和病毒基因组 RNA^[6]。迄今为止,已知 A 型流感病毒的 HA 有 16 个亚型(H1-H16)^[7],NA 有 9 个亚型(N1-N10),HA 和 NA 之间的不同组合使 A 型流感病

收稿日期:2015-09-01

基金项目:江苏省句容市科委项目(编号:NY2013029);江苏省镇江市农业科技支撑项目(编号:SBK2014022021);南京农业大学教改项目(编号:2013Y021);南京农业大学动物医学院教育教学改革研究项目;江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:董 斌(1990—),男,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail:1135220155@qq.com。

通信作者:许家荣,教授,硕士生导师,主要从事兽医流行病学研究、畜禽传染病防治、生物制品研制。E-mail:xjr@njau.edu.cn。

[33]陶华平. 核定位信号研究进展[J]. 生物学通报,2014,49(8):5-10.

[34]Kalderon D, Richardson W D, Markham A F, et al. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen[J]. Nature,1984,311(5981):33-38.

[35]Dingwall C, Laskey R A. Nuclear targeting sequences—a consensus?[J]. Trends in Biochemical Sciences,1991,16(12):478-481.

[36]Nogueira F S, Schlögl P S, Camargo S R, et al. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane[J]. Plant Science,2005,169(1):93-106.

[37]李 伟,韩 蕾,钱永强,等. 非生物逆境胁迫相关 NAC 转录因子的生物信息学分析[J]. 西北植物学报,2012,32(3):454-464.

[38]康美玲,周振华,田忠景,等. 抗逆性转录因子 NAC 的生物信息学分析[J]. 湖北农业科学,2014,53(17):4199-4204.

[39]Ernst H A, Olsen A N, Larsen S, et al. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors[J]. EMBO Reports,2004,5(3):297-303.

[40]Chen Q, Wang Q, Xiong L, et al. A structural view of the conserved domain of rice stress-responsive NAC1[J]. Protein & Cell,2011,2(1):55-63.