

山豆根 *StNAC46* 基因的克隆及功能验证

梁细妹^{1,2}, 秦双双¹, 韦 范¹, 韦桂丽¹, 陈 浩¹, 韦树根^{1,2*}, 梁 莹^{1*}

1. 广西壮族自治区药用植物园, 国家中医药传承创新中心, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室/广西壮族自治区中药资源智慧创制工程研究中心, 广西 南宁 530023
2. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 克隆山豆根 *Sophora tonkinensis* *StNAC46* 基因, 并对其进行生物信息学、亚细胞定位及功能验证分析, 探究 *StNAC46* 基因在山豆根中的作用。方法 以山豆根总 RNA 反转录得到的 cDNA 作为模板, 通过 PCR 技术克隆 *StNAC46* 基因。利用生物信息学分析、融合报告基因定位、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)、农杆菌介导的遗传转化以及高效液相色谱电喷雾串联质谱法 (ESI-HPLC-MS/MS) 等方法, 分析 *StNAC46* 蛋白的结构特性、启动子序列、亚细胞定位以及转基因功能。结果 *StNAC46* 基因全长 1 083 bp, 编码 360 个氨基酸, 其蛋白质相对分子质量为 39 800, 等电点为 8.67, 属于亲水性蛋白, 含有 32 个丝氨酸磷酸化位点。*StNAC46* 包含 1 个 NAM 结构域, 与毒羊豆、相思子以及密花豆等多种植物中的 NAC (NAM、ATAF1/2、CUC1/2) 蛋白显示出较高的同源性。*StNAC46* 基因启动子包含核心元件 (CAAT-box 和 TATA-box) 以及响应植物激素一脱落酸 (abscisic acid, ABA)、赤霉素 (gibberellic acid, GA) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 的特定反应元件。亚细胞定位结果显示, *StNAC46* 蛋白定位于细胞核与细胞质中。酵母单杂交验证发现, *StNAC46* 与 *StCAO* 基因启动子区域存在相互作用。与野生型 (wide type, WT) 相比, *StNAC46* 转基因烟草中苦参碱和氧化苦参碱含量增加。结论 山豆根 *StNAC46* 基因能够促进植物的生物碱合成, 为山豆根的品种选育以及深入解析山豆根生物碱生物合成途径的分子机制奠定了重要基础。

关键词: 山豆根; *StNAC46* 基因; 蛋白特征; 表达分析; 生物碱

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5190-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.022

Cloning and functional validation of *StNAC46* gene in *Sophora tonkinensis*

LIANG Ximei^{1,2}, QIN Shuangshuang¹, WEI Fan¹, WEI Guili¹, CHEN Hao², WEI Shugen^{1,2}, LIANG Ying¹

1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement/ Guangxi Engineering Research Center of TCM Resource Intelligent Creation, National Center for TCM Inheritance and Innovation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China
2. College of pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To clone the gene *StNAC46* from *Sophora tonkinensis* followed by bioinformatics, subcellular localization and functional verification were performed, so as to explore the role of *StNAC46* gene. **Methods** The *StNAC46* gene was cloned by polymerase chain reaction (PCR) using the cDNA obtained by reverse transcription of total RNA from *S. tonkinensis* as a template. Subsequently, the structural characteristics, promoter sequence, subcellular localization, and transgenic function of *StNAC46* protein were analyzed by bioinformatics analysis, fusion reporter gene localization, quantitative real-time PCR (qRT-PCR), transgenic technology, and High performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (ESI-HPLC-MS/MS). **Results** The full length of *StNAC46* gene was 1083 bp, encoding 360 amino acids. The molecular weight of *StNAC46* protein was 3.98×10^4 , and the isoelectric point was 8.67. It was a hydrophilic protein with 32 serine phosphorylation sites. The *StNAC46* protein contained a NAM domain, which showed high homology with NAC proteins from a diversity of plants such as *Gastrolobium bilobum*, *Abrus precatorius*, and *Spatholobus suberectus*. The *StNAC46* gene promoter had core elements (CAAT-box and TATA-box), as well as specific response elements in response to phytohormones abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA) and methyl Jasmonate (MeJA). Subcellular localization results demonstrated that *StNAC46* protein

收稿日期: 2025-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82260747); 广西自然科学基金项目 (2025GXNSFAA069971); 广西中药材品质创新研究团队 (GZKJ2305)

作者简介: 梁细妹 (1994—), 硕士研究生, 主要从事从事药用植物保育学原理与技术研究。E-mail: 977554193@qq.com

*通信作者: 韦树根 (1961—), 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事药用植物栽培与遗传育种研究。E-mail: weishugen2@163.com

梁 莹 (1985—), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事药用植物资源可持续利用研究。E-mail: 198yingzi@163.com

was localized in the nucleus and cytoplasm. Yeast one-hybrid assay indicated that StNAC6 protein could interact with *StCAO* gene promoter. Moreover, matrine and oxymatrine were increased in transgenic tobacco compared to wild type (WT). **Conclusion** *StNAC46* gene in *S. tonkinensis* could stimulate alkaloid synthesis in plants. It lays a foundation for the selection of varieties of *S. tonkinensis* and further analyzing the molecular mechanism of alkaloid biosynthesis pathway in *S. tonkinensis*.

Key words: *Sophora tonkinensis* Gagnep.; *StNAC46* gene; protein characteristics; expression analysis; alkaloid

山豆根来源于豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎, 主产于广西、广东、贵州及云南等地, 是广西“桂十味”道地药材以及常用中药材^[1]。山豆根中含有 20 多种生物碱, 包括苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱及金雀花碱等^[2], 其中苦参碱和氧化苦参碱是其主要的药用活性成分, 已被证明具有抗炎、抗菌、抗氧化、免疫调节和抗癌作用^[3]。苦参碱和氧化苦参碱均属于喹诺里西啶类生物碱 (quinolizidine alkaloid, QA), QA 的生物合成起始于赖氨酸在赖氨酸脱羧酶 (lysine decarboxylase, LDC) 的作用下脱羧成尸胺, 然后经铜氨氧化酶 (copper amine oxidase, CAO) 氧化脱氨, 产生 5-氨基戊醛, 继而自发环化形成 Δ^1 -哌啶^[4]。苦参碱的生物合成同样以 Δ^1 -哌啶为中间体, 但后续的具体步骤尚未明确^[5]。

NAC (NAM、ATAF1/2 和 CUC1/2) 转录因子是植物特有的转录因子家族, 其名称来源于矮牵牛的 *NAM* 基因、拟南芥的 *ATAF1/2* 和 *CUC2* 基因^[6]。该家族的转录因子广泛参与植物的生长发育、次生代谢物合成及胁迫反应的调控, 因而引起了研究者的广泛关注^[7-10]。已有研究表明, NAC 转录因子通过调控次生代谢通路关键酶基因的表达, 在生物碱合成代谢中发挥重要作用。例如, 在烟草中, NtNAC-R1 通过激活尼古丁合成途径的 *PMT* 基因, 提升尼古丁的积累^[11]。同样的, 茶树转录因子 CsNAC7 正向调控酶基因 *yhNMT1*, 促进愈伤组织咖啡因积累^[12]。此外, NAC 蛋白还能够形成二聚体, 进而调节植物代谢过程。例如, 烟草转录因子 NtNAC028 和 NtNAC080 形成的异二聚体通过茉莉酸途径影响烟草尼古丁的生物合成和降解^[13]。目前, 有关研究已表明 LDC 和 CAO 是苦参碱和氧化苦参碱合成途径的关键酶基因^[14], 但调控该途径基因表达的转录因子还尚未见报道。

基于前期山豆根转录组数据^[15], 挖掘出生物碱生物合成通路上 7 个编码 LDC 蛋白和 8 个编码 CAO 蛋白的差异基因。通过 PlantTFDB 数据库预测发现, *StCAO* 基因靶向 NAC 转录因子 StNAC46。进一步共表达分析表明, *StCAO* 与候选转录因子 StNAC46 在不同干旱胁迫下的表达趋势高度一致。因此, 推测

StNAC46 能够通过影响 *StCAO* 基因表达调控山豆根苦参碱等生物碱成分的生物合成。为了探究 StNAC46 转录因子在山豆根中的作用, 本研究克隆了山豆根 *StNAC46* 基因, 并进行了生物信息学分析、融合报告基因定位分析、酵母单杂验证及遗传转化功能验证。研究旨在阐明 *StNAC46* 基因在山豆根苦参碱等生物碱生物合成途径中的生物学功能, 为深入解析山豆根生物碱合成代谢通路的分子机制提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

山豆根材料种植于广西药用植物园科研基地, 经广西药用植物园梁莹副研究员鉴定为豆科植物越南槐 *S. tonkinensis* Gagnep.。采集山豆根的幼苗, 液氮速冻后放入 -80°C 冰箱, 用于总 RNA 的提取。

1.2 仪器

LC-30AD 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SCIEX-6500Qtrap (MS/MS) (美国 AB 公司); PS40A 超声清洗仪 (东莞康世洁有限公司); CV-200 型真空浓缩仪 (北京吉艾姆有限公司); PowerPac™ 通用电泳仪 (Bio-Rad 公司); 440~485 nm 蓝光切胶仪 (上海生工有限公司); FV1000 型激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司); Quant Studio3 型定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Nano Drop 2000c 仪器 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 试剂

苦参碱 (批号 BWC9032-2016, 质量分数 $\geq 98\%$)、氧化苦参碱 (批号 110780, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自北方伟业计量集团有限公司。色谱级甲醇、甲酸 (德国默克公司), 三氯甲烷、浓氨水 (国药集团药业股份有限公司), $2\times$ Phanta Flash Master Mix、RNA 提取试剂盒 FastPure Plant Total RNA Isolation Kit、克隆试剂盒 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 反转录试剂盒 Transscript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix TransScript、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞 (北京全式金有限公司), 胶回收试剂盒 StarPrep Gel Extraction Kit (上海生工有限公司), 酵母 Y1HGold 菌株 (上海唯地有限公司)。

2 方法

2.1 引物设计

利用在线网站 (<https://primer3.ut.ee>)

Primer 3.0 设计引物, 引物合成服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供, 所有引物序列见表 1。

表 1 所用引物及其用途

Table 1 Primers used in this study and their purposes

引物名称	引物序列 (5'-3', 小写字体为同源臂序列)	用途
<i>StNAC46</i> -F	ATGGACAGCACAGATTCATC	基因克隆
<i>StNAC46</i> -R	TCAGTTCCAATTTATGCCTGGAAG	
<i>StNAC46q</i> -F	TCCTCTGGCTGCTGGTCCTC	
<i>StNAC46q</i> -R	TCTCCGTAGAAAGCTCCTTGTCATC	表达量分析
<i>NbEF1α</i> -F	AGAGGCCCTCAGACAAAC	
<i>NbEF1α</i> -R	TAGGTCCAAAGGTCACAA	
<i>E3129</i> -F	aacacgggggactttgcaacATGGACAGCACAGATTCATCATCATGCTC	亚细胞定位
<i>E3129</i> -R	cctgaagcggcgctgtacaGTTCCAATTTATGCCTGGAAGTTGAAATTGTTGC	
<i>E228</i> -F	gccatggagggcagtgattcATGGACAGCACAGATTCATCATCATCTC	
<i>E228</i> -R	cagctcgagctcgatggatccTCAGTTCCAATTTATGCCTGGAAGTTGAAATTGTTG	载体构建
<i>E292</i> -F	ttgaattcgagctcgatggatccGTTGTCAAAAACAAGTTTCACATTGTATCATATAAATAGTTG	
<i>E292</i> -R	acagagcacatgcctcgagGTTGCACTGTGTCCAGAAATCATGG	
<i>D12814</i> -F	aacacgggggactttgcaacATGGACAGCACAGATTCATCATCATGCTC	构建过表达载体
<i>D12814</i> -R	tgaagacagagctagtacaTCAGTTCCAATTTATGCCTGGAAGTTGAAATTGTTG	

2.2 山豆根总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit (货号 RC411) 试剂盒提取山豆根总 RNA, 然后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的质量, 使用 Thermo NanoDrop 2000 仪器测定 RNA 的浓度及纯度, 利用 cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

2.3 *StNAC46* 基因的克隆

通过 RT-PCR 技术克隆山豆根 *StNAC46* 基因全长。使用基因特异性引物(表 1), 以反转录的 cDNA 为模板进行扩增。反应体系为: 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 补充 Nuclease-free Water 至 50 μ L 总体积。反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 35 个循环 (95 °C、15 s, 55 °C、15 s, 72 °C、1.5 min); 最后 72 °C 终延伸 5 min。反应完成后, 使用 DNA 凝胶试剂盒 (批号 B518131, 上海生工有限公司) 将 PCR 产物切胶回收。将回收产物与 5×TA/Blunt-Zero Cloning Mix 载体进行连接, 接着转化至大肠杆菌 DH5 α 中。通过 PCR 鉴定阳性菌落, 然后将样本送至上海杰李生物技术有限公司进行测序。随后, 在 DNAMAN 软件中进行比对, 以确认正确的 *StNAC46* 基因序列。

2.4 *StNAC46* 基因的生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件对 *StNAC46* 基因进行序列分析。利用 ExPASy 软件 (<http://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>) 分析 *StNAC46* 蛋白的基本理化性质。在 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 完成保守结构域的预测。利用 MEGA 11 软件构建系统进化树, 分析山豆根 *StNAC* 基因的进化特征。通过 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 工具预测蛋白质的二级结构。利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 进行蛋白质三级结构的预测。采用 NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 来预测 *StNAC46* 蛋白的磷酸化位点。从山豆根基因组序列中提取 *StNAC46* 基因上游 2 000 bp 的区域作为启动子序列, 利用 PlantCARE 在线网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区域中的顺式作用元件。

org/resources/compute-pi-mw) 分析 *StNAC46* 蛋白的基本理化性质。在 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 完成保守结构域的预测。利用 MEGA 11 软件构建系统进化树, 分析山豆根 *StNAC* 基因的进化特征。通过 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 工具预测蛋白质的二级结构。利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 进行蛋白质三级结构的预测。采用 NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 来预测 *StNAC46* 蛋白的磷酸化位点。从山豆根基因组序列中提取 *StNAC46* 基因上游 2 000 bp 的区域作为启动子序列, 利用 PlantCARE 在线网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区域中的顺式作用元件。

2.5 亚细胞定位

2.5.1 基因克隆 采用无缝克隆方法扩增目标基因 *StNAC46*, 以山豆根 cDNA 为模板, 使用 E3129-F/R 进行 PCR 扩增。反应体系包含: Biorun Pfu PCR Mix 25 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 补充 Nuclease-free Water 至 50 μ L 总体积。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 30 个循环 (94 °C、30 s, 50 °C、45 s, 72 °C、65 s); 72 °C 延伸 10 min, 16 °C 保存 30 min。扩增产物进行胶回收, 得到 *StNAC46* 扩增纯化产物。

2.5.2 亚细胞定位质粒构建 使用限制性内切酶 *Bsa*I 和 *Eco*3I 对 pBWA (V) HS-ccdb-GLosgfp 载体进行双酶切, 载体酶切产物利用 PCR 试剂盒纯化, 然后与 *StNAC46* 扩增纯化产物进行重组, 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, Kan 抗性平板, 37 °C 培养 12 h, 进行菌斑 PCR 鉴定后测序。

2.5.3 农杆菌转化 对测序结果正确的菌液提取质粒并转化至农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, 含 50 mg/L Kan LB 液体培养基中扩播。

2.5.4 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 瞬时表达 挑选生长状况良好的本氏烟草植株, 用去针头的 1 mL 注射器从烟草叶片下表皮注射菌液, 瞬时侵染烟草叶片, 然后于室温 20 °C, 相对湿度 30% 的气候室内暗培养 48 h, 撕下表皮, 装片置于激光共聚焦显微镜下观察荧光信号并观察 *StNAC46* 蛋白在烟草叶片细胞的定位。

2.6 酵母单杂交

以特异性引物 E228-F/R (表 1) 扩增 *StNAC46* 全长 CDS, 插入 pGADT7 载体中, 构建猎物载体 pGADT7-*StNAC46*。通过引物 E292-F/R (表 1) 将 *StCAO* 的启动子片段克隆到 pAbAi 载体中, 构建诱饵载体 pAbAi-*StCAO*。构建 p53-ABAi 质粒为阳性对照。参考 Yang 等^[16]酵母单杂实验方法, 制备酵母感受态细胞, 将线性化的 p*StCAO*-AbAi 和阳性对照质粒 p53-ABAi 分别转化至 Y1H 酵母菌株, 确定金担子素 (aureobasidin A, AbA) 质量浓度为 100 ng/mL 为抑制酵母细胞的 AbA 浓度。分别将质粒 pGADT7 和 pGADT7-*StNAC46* 转化至 p*StCAO*-AbAi 酵母感受态细胞, 转入 pGADT7 空载的为阴性对照, pGADT7-Rec53 转化至 p53-AbAi 酵母感受态细胞为阳性对照。获得实验组 Y1H (pGADT7-*StNAC46*×p53-AbAi)、阴性对照 Y1H (p*StCAO*-AbAi×pGADT7)、阳性对照 Y1H (p53-AbAi×pGADT7-Rec53)。将实验组和对照组分别涂布于对照 (SD/-Ura/-Leu) 和筛选 [SD/-Ura/-Leu/ABA (100 ng/mL)] 培养基上, 30 °C 培养 4~5 d。分别挑取 6 个单克隆加入到 100 μL 0.9% NaCl 振荡混匀, 稀释后滴加至对照和筛选培养基上, 30 °C 培养 4~5 d, 观察互作情况。

2.7 转基因本氏烟草获得

通过引物 D12814-F/R 将克隆得到的 *StNAC46* 编码区序列与 pBWA (V) HS-ccdB 载体进行连接, 获得 pBWA (V) HS-O-*StNAC46* 重组载体, 并转化进农杆菌 GV3101 中。通过叶盘法, 将目的基因转

化进本氏烟草, 再生芽和健康抗性芽生长在含有 25 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基上成功生长。将根系发育良好的植株转移到土壤中, 然后在 (25±2) °C 的组培室生长, 相对湿度为 65%~70%。通过 RT-PCR 鉴定阳性烟草植株, 获得 4 个独立的转基因株系 OE1、OE3、OE4 和 OE6。收集生长约 8 周的野生型 (WT) 和转基因烟草植株的根、茎和叶, 每个样品 3 个生物学重复用于后续实验。用于 qRT-PCR 分析的所有样品置于液氮中冷冻并储存在 -80 °C 下。

2.8 生物碱含量的测定

收集的烟草样品于 50 °C 烘干, 采用高效液相色谱电喷雾串联质谱法 (ESI-HPLC-MS/MS) 检测样品苦参碱和氧化苦参碱的含量。生物碱提取和定量方法参照《中国药典》2020 年版^[1]。准确称取 0.1 g 样品, 加入 10 mL 三氯甲烷-甲醇-浓氨溶液 (40:10:1) 提取溶液, 静置 30 min, 超声提取 30 min; 12 000×g 离心 5 min, 取上清 5 mL; 真空离心浓缩至干, 加入 0.6 mL 色谱级甲醇复溶, 过 0.22 μm 滤膜。色谱条件: 采用 poroshell 120 SB-C₁₈ 反相色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 柱温 30 °C; 流动相为甲醇 (A)-1% 甲酸水 (B); 梯度洗脱 (0~1 min, 30% A; 1~10 min, 30%~10% A; 10~11 min, 10%~30% A; 11~12 min, 30% A); 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 2 μL。质谱条件: 采用电喷雾离子化源 (ESI), 在正离子扫描下以多反应检测 (MRM) 模式下进行分析; 雾化气体为氮气, 喷雾电压 +5 500 V, 气帘气 35 psi (1 psi=6.89 kPa), 雾化气压力 50 psi, 辅助气压力 55 psi, 雾化温度 500 °C。分别称取苦参碱和氧化苦参碱对照品, 加甲醇溶解配制梯度为 1、5、10、50、100 和 200 ng/mL 的混合对照品溶液, 分别进样, 以峰面积为横坐标 (X), 质量浓度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线方程, 分别得到苦参碱标准曲线 ($Y=1.35748 \times 10^6 X + 15113.80886$, $r=0.99681$) 和氧化苦参碱 $Y=1.08315 \times 10^6 X + 23839.24054$, $r=0.99524$), 根据标准曲线计算苦参碱和氧化苦参碱质量浓度, 按照公式计算含量 (W)。

$$W=C \times V \times n/M$$

C 为样品浓度, V 为样品最终溶解时所用的溶液体积, n 为稀释倍数, M 为称取样品质量

2.9 qRT-PCR 分析

利用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit 试剂盒, 分别从 WT 和 *StNAC46* 转基

因烟草植株的根、茎、叶中提取总 RNA，并使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。接着构建一个 20 μ L 的反应体系，采用 qPCR SYBR Green 预混液，并使用实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 检测。以 *NbEF1 α* 作为内参引物，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 WT 和转基因本氏烟草中 *StNAC46* 基因的相对表达量。

2.10 统计分析

通过单因素方差分析对数据进行统计学处理，在 GraphPad Prism 9 软件中执行 One-way ANOVA 分析并绘制图表，当 $P < 0.05$ 时，认为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

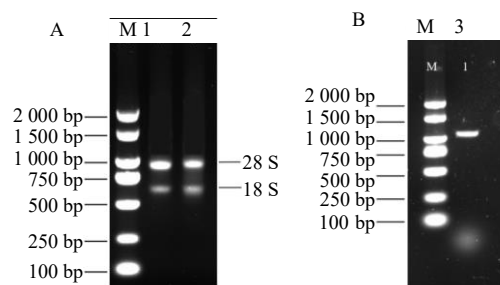
3.1 *StNAC46* 基因克隆和序列分析

通过提取的山豆根总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析，结果显示 28 S 和 18 S 的条带尤为明亮（图 1-A）。进一步使用 Nano Drop 2000c 仪器对 RNA 样品进行定量分析，发现其 *A* 值（ A_{260}/A_{280} ）在 2.11~2.18，表明 RNA 结构完整，纯度较高，可用于下一步实验。经 PCR 扩增和凝胶电泳检测观察，获得的基因片段符合目的基因的预期大小（图 1-B）。胶回收后进行测序，结果利用 DNAMAN 软件比对后，认为与目的基因的编码序列一致。对 *StNAC46* 进行

测序并确定长度为 1 083 bp，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TGA。核苷酸含量分别为 A (28.53%，309)、T (25.95%，281)、G (21.42%，232) 和 C (24.10%，261)。

3.2 *StNAC46* 蛋白理化性质

将 *StNAC46* 蛋白氨基酸序列提交到 NCBI 网站进行保守结构域预测，结果表明 *StNAC46* 在 16~142 氨基酸位点含有 NAC 基因家族成员典型的 NAM 保守结构域（图 2-A）。*StNAC46* 的长度为 360

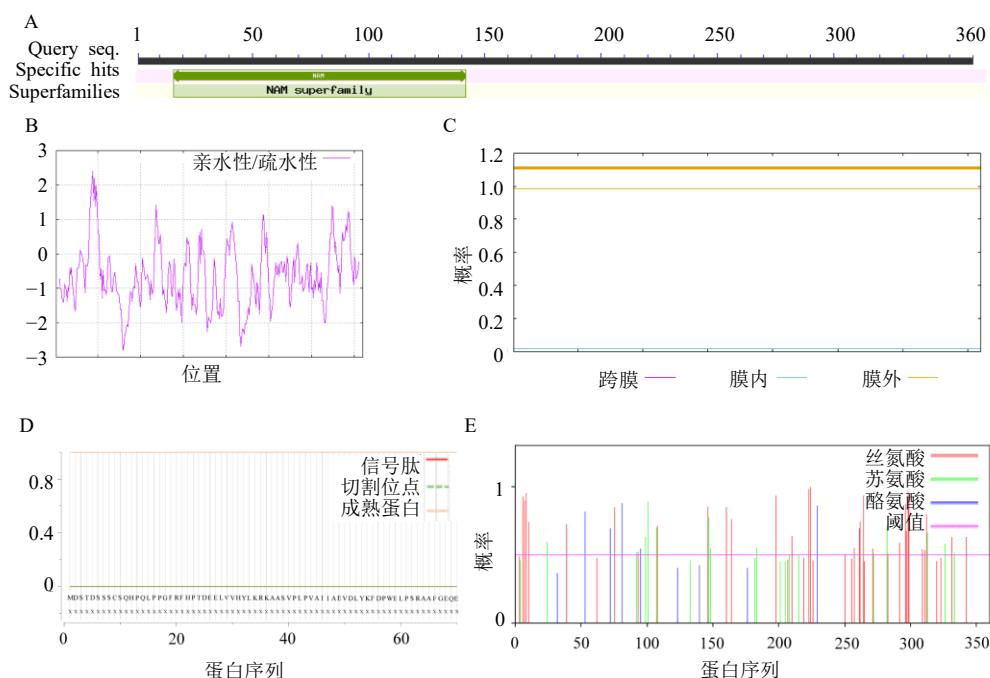


M-Maker; 1~2-山豆根总 RNA 条带; 3-目的基因条带。

M-maker; 1—2-total RNA bands of *S. tonkinensis*; 3-target gene band.

图 1 山豆根总 RNA 提取 (A) 和 *StNAC46* 基因扩增产物 (B) 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *S. tonkinensis* (A) and *StNAC46* PCR amplification products (B)



A-结构域分析; B-疏水性分析; C-跨膜结构域预测; D-信号肽预测; E-磷酸化位点预测。

A-structural domain analysis; B-hydrophobicity analysis; C-transmembrane structural domain prediction; D-signal peptide prediction; E-phosphorylation site prediction.

图 2 *StNAC46* 蛋白结构分析
Fig. 2 Structural analysis of *StNAC46* protein

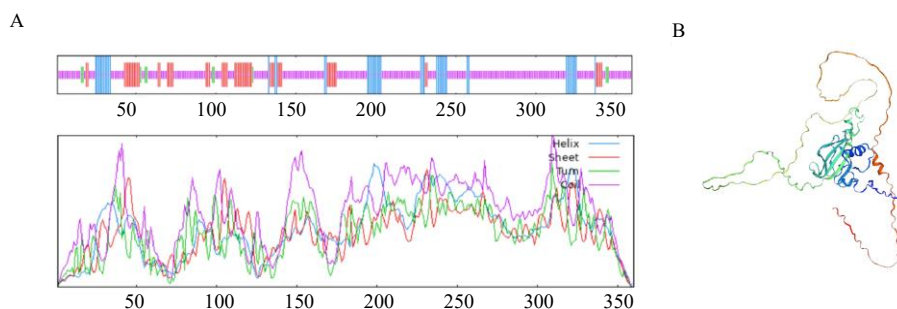


图 3 StNAC46 蛋白二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 3 Prediction of secondary (A) and tertiary (B) structures of StNAC46 protein

个氨基酸 (aa), 相对分子质量为 39 800, 等电点为 8.67。采用 ProtScale 分析 StNAC46 的亲水性和疏水性, 其总平均亲疏水性 (GRAVY) 为 -0.663 (图 2-B)。因此, 推测 StNAC46 是一种亲水性蛋白质。用 TMpred 软件预测该蛋白的跨膜区域, 发现该氨基酸无跨膜区域 (图 2-C)。采用 SignalP 5.0 软件预测该蛋白质的信号肽, 结果发现其不含信号肽, 推测其不是分泌型蛋白 (图 2-D)。用 NetPhos3.1 预测了 StNAC46 中的磷酸化位点, 发现该蛋白质含有 32 个丝氨酸磷酸化位点, 13 个苏氨酸磷酸化位点和 5 个酪氨酸磷酸化位点 (图 2-E)。

3.3 预测 StNAC46 蛋白的二级和三级结构

采用 SOPMA 和 Phyre2 预测 StNAC46 蛋白在二级和三级结构。StNAC46 的二级结构预计为 12.22% 的 α 螺旋 (44 aa)、70.00% 的随机卷曲 (252 aa)、15.00% 的延长链 (54 aa) 和 2.78% 的 β 转角 (10 aa) (图 3-A)。StNAC46 蛋白的三级结构主要由不规则卷曲、 α 螺旋和延伸链组成 (图 3-B), 与二级结构预测分析一致。

3.4 StNAC46 蛋白的系统发育分析

将山豆根 StNAC46 编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对后, 根据氨基酸序列同源性超过 50% 的作为筛选标准, 从中筛选出 25 个物种 NAC 蛋白的氨基酸序列进行深入分析, 发现其与毒羊豆 *Gastrolobium bilobum* R.Br.、相思子 *Abrus precatorius* L.、密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn、绿豆 *Vigna radiata* var. *radiata* Roxb. 和赤豆 *Vigna angularis* Ohwi & H. Ohashi 等植物的 NAC 基因编码氨基酸的同源性较高 (>80%)。相比之下, 与锦葵科的榴莲、桦木科的欧洲桤木及杨梅科的杨梅等植物的 NAC 基因编码氨基酸的同源性较低 (<70%) (图 4)。进一步的系统发育树分析表明, 山豆根

StNAC46 与毒羊豆 (XP 06149396.1) 形成同一支, 与刀豆 (KAK7362895.1) 和相思子 (XP 027346666.1) 在系统发育树中处于较近的分枝 (图 5), 这暗示了 StNAC46 与这些物种之间较近的亲缘关系。

3.5 StNAC46 基因启动子的序列分析

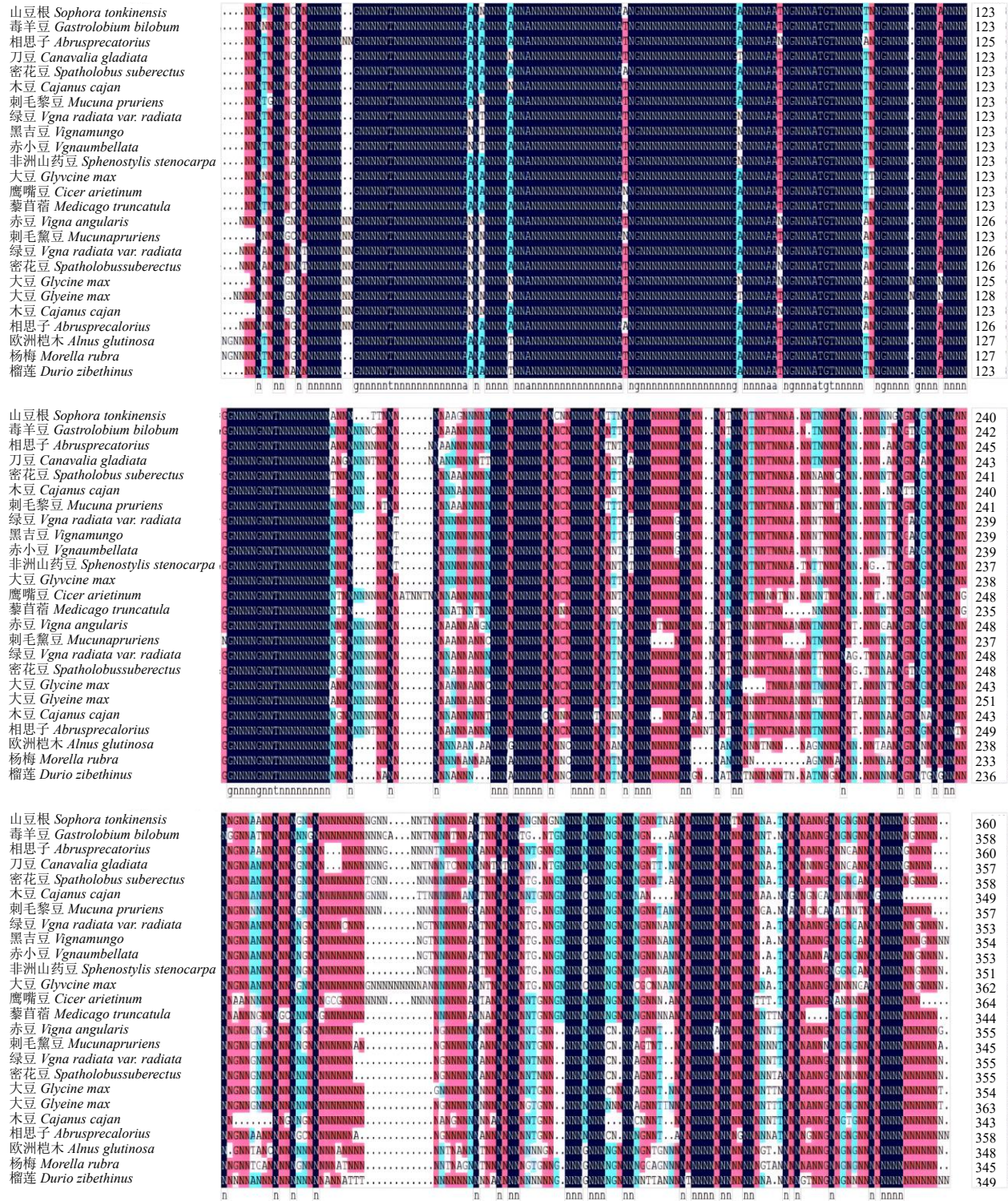
使用在线工具 PlantCARE 对 StNAC46 上游 2 000 bp 的启动子序列进行了顺式作用元件分析。结果显示, 启动子序列不仅包含核心元件 (CAAT-box 和 TATA-box), 还包含多种与激素响应相关的顺式作用元件, 包括脱落酸响应元件 (ABRE 元件)、赤霉素响应元件 (P-box 和 GARE-motif) 以及茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif)。此外, 还预测到胁迫响应元件 (ARE, MBS 和 ARE)、植物生长发育相关元件 (GCN4-motif 和 O2-site) 以及光响应元件 (G-Box、Box 4 和 GT1-motif) 等 (图 6)。

3.6 StNAC46 的亚细胞定位

依据植物蛋白亚细胞定位预测网站 (Plant-mPLoc) 的预测结果, StNAC46 蛋白被定位在细胞核内。为了验证这一预测, 通过亚细胞定位实验进行分析。结果显示含有对照绿色荧光蛋白 (GFP) 空载体绿色荧光均匀分布在烟草叶表皮细胞的细胞核和细胞质且强度较高, 含 pBWA(V)HS-StNAC46-GFP 融合载体的烟草叶片细胞在细胞核和细胞质中也显示荧光信号。试验表明, StNAC46 蛋白定位于细胞核和细胞质中 (图 7)。

3.7 酵母单杂验证 StNAC46 与 StCAO 基因启动子区域的相互作用

分别将猎物质粒、空载质粒及阳性质粒分别转化酵母感受态细胞后, 涂布于对照培养基 (SD/-Ura/-Leu) 和筛选培养基 [SD/-Ura/-Leu/ABA (100 ng/mL)] 上。结果显示, 在对照培养基上, 阳性对照 (p53-



黑色、红色和浅蓝色分别代表 100%、75%和 50%的同源性。

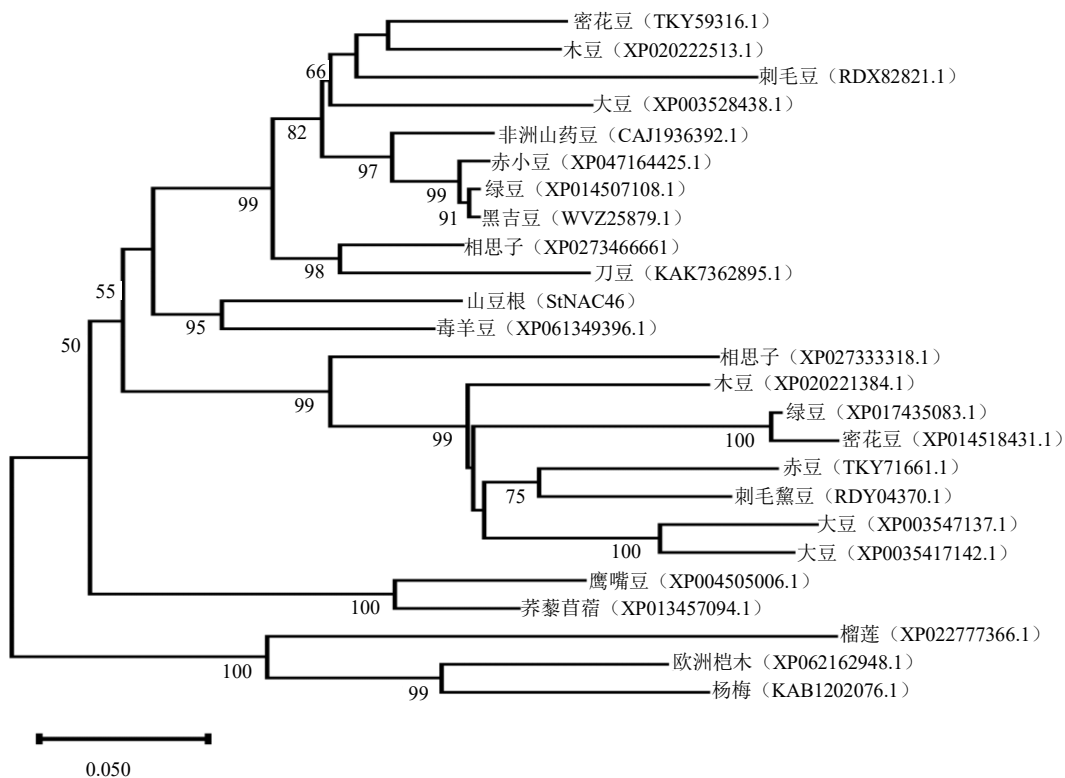
Black, red, and light blue represent 100%, 75%, and 50% homology, respectively.

图 4 StNAC46 与其他物种 NAC 蛋白的序列比对

Fig. 4 Multisequence alignment of StNAC46 and NAC proteins from other species

AbAi×pGADT7-Rec5)、阴性对照(p*StCAO*-AbAi×pGADT7)和实验组(p*StCAO*-AbAi×pGADT7-*StNAC46*)均有明显菌落长出,说明质粒转化成功。

在筛选培养基上,阴性对照 Y1H 未长出菌落,阳性对照 Y1H 能正常生长,表明阴性和阳性对照 Y1H 在该体系下正常工作。此外,实验组 Y1H 后续检测



系统发育树枝上的数值为 Bootstrap 值，用来评估该分支的可信度。数值越高，表明该分支的可靠性越高。

The numerical values on the branches of the phylogenetic tree represent Bootstrap values, which are used to assess the reliability of the branches. The higher the value, the greater the reliability of the branch.

图 5 StNAC46 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of StNAC46

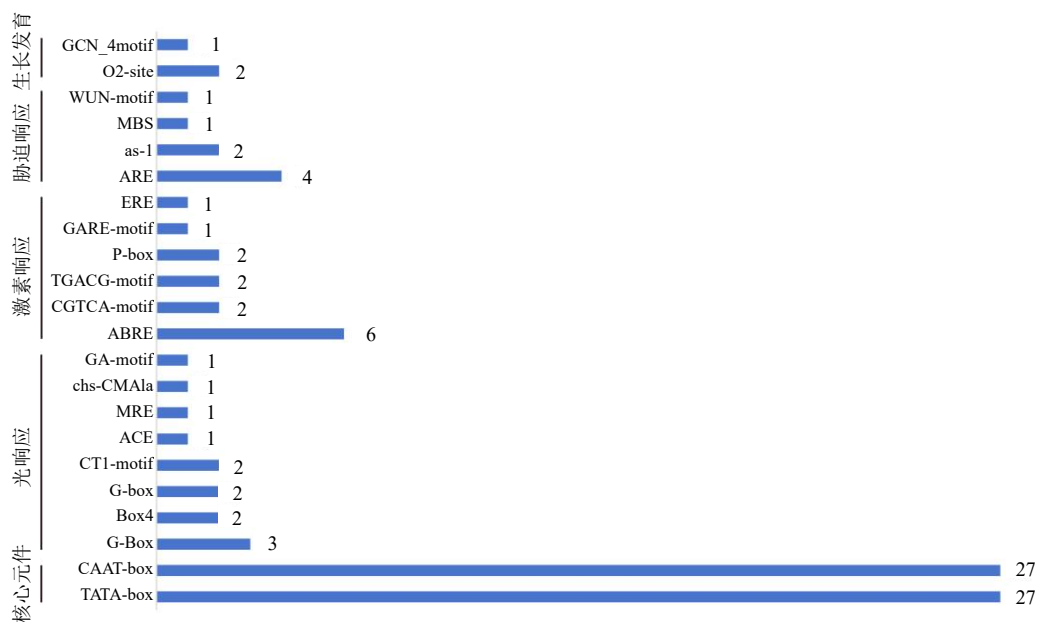


图 6 StNAC46 启动子序列中的顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of StNAC46 promoter sequence

可以在筛选培养基上生长，而阴性对照 Y1H 则无法生长（图 8）。这些结果说明猎物蛋白 StNAC46 激活

诱饵报告基因的表达，证明 StNAC46 与 StCAO 基因启动子区域存在相互作用。

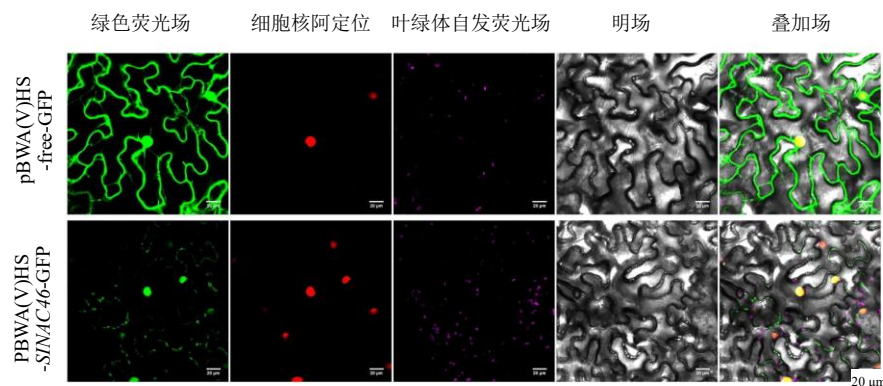
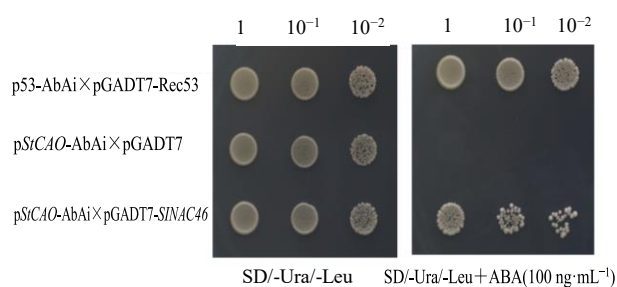


图 7 StNAC46 蛋白亚细胞定位分析

Fig. 7 Analysis of subcellular localization of StNAC46 protein



pStCAO-AbAi x pGADT7 为阴性对照 Y1H 菌株, p53-AbAi x pGADT7-Rec5 阳性对照 Y1H 菌株。

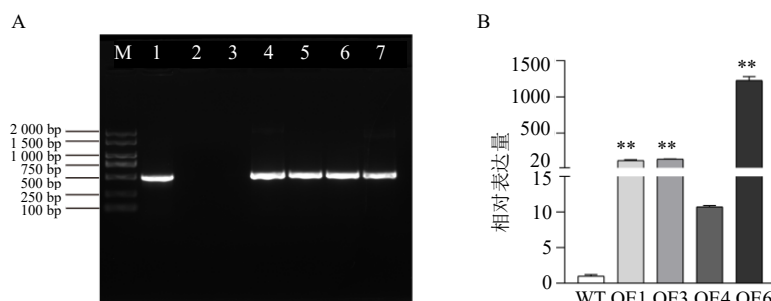
pStCAO-AbAi x pGADT7 and p53-AbAi x pGADT7-Rec5 were used as negative and positive controls of Y1H strain, respectively.

图 8 StNAC46 与 StCAO 启动子区域互作验证

Fig. 8 Verification of interaction between StNAC46 and StCAO promoter region

3.8 StNAC46 转录因子对烟草生物碱积累的调控分析

为了进一步验证转录因子 StNAC46 在生物碱合成过程中的作用, 本研究构建了 pBWA(V)HS-O-StNAC46 过表达载体, 并通过农杆菌侵染法将其转化至本氏烟草。经 PCR 阳性鉴定, 最终获得了 4 株过表达阳性烟草苗, 分别命名为 OE1、OE3、OE4 和 OE6 (图 9-A)。利用 qRT-PCR 过表达 StNAC46 基因烟草与野生型烟草 (WT) 中 StNAC46 基因的表达量, 结果显示, 过表达植株 (OE1、OE3、OE4 和 OE6) 中 StNAC46 表达量为 WT 的 11~1229 倍 (图 9-B), 证明了 StNAC46 基因在转基因烟草中上调。参考柴文娟等^[17]的方法, 选取表达水平较高的 3 个的株系 (OE1、OE3 和 OE6) 进行实验。为



M-Marker; 1-阳性对照; 2-阴性对照; 3-水; 4~7-过表达植株; 与 WT 相比: ** $P < 0.01$, 下同。

M-marker; 1-positive control; 2-negative control; 3-water; 4~7-overexpression plants; ** $P < 0.01$ vs WT, same as below.

图 9 过表达植株阳性鉴定 (A) 和 StNAC46 基因的表达水平 (B)

Fig. 9 Positive identification (A) and expression level of StNAC46 gene in overexpression plants (B)

进一步探讨 StNAC46 基因的表达是否与烟草中苦参碱和氧化苦参碱的积累相关, 本研究选取了上述用于后续实验的过表达株系进行分析。结果显示, 过表达 StNAC46 增加了转基因植株中苦参碱和氧化苦参碱的含量。与 WT 相比, 过表达株系 OE1、OE3

和 OE6 的根部苦参碱含量分别提高了 36.70%、56.78%和 224.91%, 茎部的苦参碱含量分别显著增加了 19.41%、7.56%和 28.39%, 叶片中的苦参碱含量分别显著增加了 28.90%、32.61%和 1161.21% (图 10-A)。同样地, OE1、OE3 和 OE6 的根部氧化苦

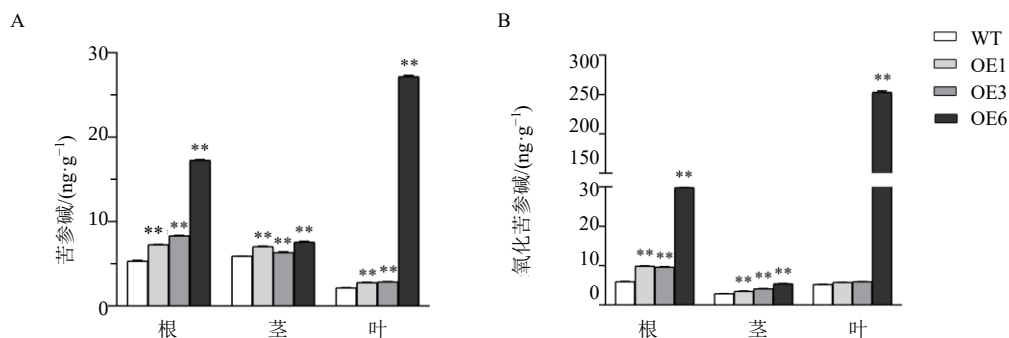


图 10 过表达烟草中苦参碱 (A) 和氧化苦参碱 (B) 的含量

Fig. 10 Contents of matrine (A) and oxymatrine (B) in overexpression tobacco

参碱含量分别显著增加了 66.55%、63.24% 和 403.82%，茎部的氧化苦参碱含量分别显著增加了 22.30%、45.18% 和 89.08%，叶片中的氧化苦参碱含量分别增加了 9.82%、13.71% 和 4741.39% (图 10-B)。上述结果表明，*StANC46* 促进转基因烟草苦参碱和氧化苦参碱的积累。

4 讨论

NAC 转录因子广泛存在于植物界中，第一个 NAC 转录因子 NAM 首次发现于矮牵牛属植物中，该基因可调控胚胎和花模式的形成^[18]。该家族的蛋白共有的结构特点是 N 端有 1 个高度保守的 NAM 结构域，主要参与 DNA 与其他蛋白质结合，而 C 端则是高度变异的转录激活区^[19-20]。本研究以山豆根 cDNA 为模板克隆得到基因 *StNAC46*，保守结构域分析显示其蛋白质序列也存在保守的 NAM 结构域，符合 NAC 转录因子家族结构特征。基因序列分析结果显示，*StNAC46* 长度为 1 083 bp，编码 360 个氨基酸。磷酸化位点预测结果表明 *StNAC46* 蛋白中丝氨酸磷酸化位点占比最大，推测该蛋白质的磷酸化修饰主要以丝氨酸磷酸化为主，同时苏氨酸和酪氨酸磷酸化也发挥重要作用，这些磷酸化修饰在不同的激素信号通路和胁迫耐受性中充当分子开关，参与调节山豆根的代谢和生理过程^[21]。

启动子区域是调控基因表达的重要部分，顺式作用元件是启动子与转录因子结合的特定序列，其中顺式作用元件的类型、数量、序列和与其他顺式元件的距离会影响它们调节基因表达的效率和强度^[22]。对 *StNAC46* 启动子区域进行分析，结果显示存在许多与非生物胁迫和对激素反应相关的顺式作用元件，包括 ABA、MeJA 和 GA。有研究发现，ABA 和 MeJA 是能够提高生物碱合成与积累的激素诱导子。周浩等^[23]发现，外施 ABA 有助于钩藤

活性成分钩藤碱和异钩藤碱的合成与积累。Zhou 等^[24]发现，外施 MeJA 可以促进长春花悬浮细胞中文多灵和长春碱等生物碱含量的积累。因此，推测 ABA 和 MeJA 可能作为 *StNAC46* 基因上游信号分子，通过介导关键基因的表达，从而参与调控山豆根生物碱的合成和积累。

酵母单杂交实验表明，*StNAC46* 能够直接结合 *StCAO* 基因启动子 (图 8)，这与 Hao 等^[25]在短小蛇根草中提出的 OpNAC1 转录因子通过与 *OpLAMT1* 基因启动子结合调控喜树碱合成的机制相似。本研究结果证明调控机制存在蛋白和 DNA 的相互作用，首次在山豆根中揭示了 NAC 转录因子通过结合靶基因启动子驱动次生代谢物合成的分子基础。此外，实验验证 *StNAC46* 蛋白定位于细胞核和细胞质 (图 7)，与以往的研究中调控刺五加皂苷含量的 EsNAC098 和 EsNAC047 蛋白的亚细胞定位结果一致^[26]。暗示其可能通过核-质穿梭机制动态调节靶基因表达。通过 qRT-PCR 检测发现，*StNAC46* 在过表达株系中的表达量显著高于野生型，如 OE6 株系中表达量提升 1 229 倍 (图 9-B)，且过表达株系的根、茎、叶中苦参碱和氧化苦参碱含量均增加 (图 10)。其中，叶片中苦参碱和氧化苦参碱的积累量增加最高可达 1 161.21% 和 4 741.39%，而茎部增幅相对较小 (如茎部苦参碱增加 7.56%~28.39%，氧化苦参碱增加 22.30%~89.08%)，表明 *StNAC46* 的调控作用具有组织特异性。这一特征与 Zhu 等^[27]对转入丹参 *SmNAC1* 基因的拟南芥植株 Zn 分布的组织特异性表达模式相似。具体而言，与野生型拟南芥相比，转 *SmNAC1* 基因植株在根部和芽部积累了更多的 Zn，而在种子中的 Zn 含量与野生型植株无显著差异。此外，本研究发现代谢调控效应在叶片中尤为显著，提示豆科植物生物碱在特

定组织中的合成和积累受到调控,如在窄叶羽扇豆中,喹诺里西啉类生物碱在叶片、茎和豆荚的分布和合成具有组织特异性,具体表现为酯化 QAs 主要在表皮中积累,而核心 QAs (如羽扇豆碱)则在表皮中合成并运输到其他组织^[28]。

综上,本研究成功克隆了山豆根 *StNAC46* 基因并在本氏烟草中对其基因功能进行初步验证。研究表明, *StNAC46* 基因是 NAC 基因家族成员,可与生物碱合成结构基因 *CAO* 启动子区域相互作用,对苦参碱和氧化苦参碱的积累具有重要作用。本研究仍存在一些不足之处,因此,未来可在山豆根中开展 *StNAC46* 基因的同源表达研究,结合多组学分析、基因编辑技术以及不同环境条件下的功能验证,进一步探索其更深层次的调控机制和生物学功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 26.
- [2] 聂安政, 赵雪睿, 高梅梅, 等. 山豆根安全问题探讨与合理用药思考 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4152-4161.
- [3] Sun T, Li X D, Hong J, *et al.* Inhibitory effect of two traditional Chinese medicine monomers, berberine and matrine, on the quorum sensing system of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2584.
- [4] Leistner E, Spenser I D. Biosynthesis of the piperidine nucleus. Incorporation of chirally labeled (1-3H) cadaverine [J]. *J Am Chem Soc*, 1973, 95(14): 4715-4725.
- [5] Mancinotti D, Frick K M, Geu-Flores F. Biosynthesis of quinolizidine alkaloids in lupins: Mechanistic considerations and prospects for pathway elucidation [J]. *Nat Prod Rep*, 2022, 39(7): 1423-1437.
- [6] Ooka H, Satoh K, Doi K, *et al.* Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Res*, 2003, 10(6): 239-247.
- [7] Han G H, Huang R N, Hong L H, *et al.* The transcription factor NAC102 confers cadmium tolerance by regulating WAKL11 expression and cell wall pectin metabolism in *Arabidopsis* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65(10): 2262-2278.
- [8] Yan P S, Du Q G, Chen H, *et al.* Biofortification of iron content by regulating a NAC transcription factor in maize [J]. *Science*, 2023, 382(6675): 1159-1165.
- [9] Meng L, Yang H P, Xiang L, *et al.* NAC transcription factor TgNAP promotes tulip petal senescence [J]. *Plant Physiol*, 2022, 190(3): 1960-1977.
- [10] Wang L X, Zhang M, Li J, *et al.* VqNAC44 enhances stilbene synthesis and disease resistance in Chinese wild grape by interacting with VqMYB15 [J]. *Plant Sci*, 2024, 341: 111994.
- [11] Duan Y Y, Wu J Q, Wang F F, *et al.* Transcriptomic and metabolomic analyses provide new insights into the appropriate harvest period in regenerated bulbs of *Fritillaria hupehensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1132936.
- [12] Ma W H, Kang X, Liu P, *et al.* The NAC-like transcription factor CsNAC7 positively regulates the caffeine biosynthesis-related gene yhNMT1 in *Camellia sinensis* [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhab046.
- [13] Lu M Y, Fu B Y, Meng X, *et al.* Transcription factors NtNAC028 and NtNAC080 form heterodimers to regulate jasmonic acid biosynthesis during leaf senescence in *Nicotiana tabacum* [J]. *J Exp Bot*, 2024, 75(8): 2351-2371.
- [14] Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K. Lysine-derived alkaloids: Overview and update on biosynthesis and medicinal applications with emphasis on quinolizidine alkaloids [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17(12): 1002-1012.
- [15] Liang Y, Wei K H, Wei F, *et al.* Integrated transcriptome and small RNA sequencing analyses reveal a drought stress response network in *Sophora tonkinensis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1): 566.
- [16] Yang G Z, Chao D, Ming Z H, *et al.* A simple method to detect the inhibition of transcription factor-DNA binding due to protein-protein interactions *in vivo* [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 684.
- [17] 柴文娟, 杨杞, 李国婧, 等. 中间锦鸡儿 CiMYB15 基因正调控拟南芥黄酮代谢 [J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(10): 8-19.
- [18] 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.
- [19] 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 Rep*, 2004, 5(3): 297-303.
- [20] 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.
- [21] Zhang W J, Zhou Y W, Zhang Y, *et al.* Protein phosphorylation: A molecular switch in plant signaling [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(7): 112729.
- [22] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of *Cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-

- responsive promoters [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 88-94.
- [23] 周浩, 强玮, 敖雯雯, 等. 外源脱落酸对钩藤中生物碱合成的影响 [J]. *分子植物育种*, 2024, 22(15): 5091-5097.
- [24] Zhou P F, Yang J Z, Zhu J H, *et al.* Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(17): 7035-7045.
- [25] Hao X L, Wang C, Zhou W, *et al.* OpNAC1 transcription factor regulates the biosynthesis of the anticancer drug camptothecin by targeting loganic acid O-methyltransferase in *Ophiorrhiza pumila* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65(1): 133-149.
- [26] Dong J, Zhao X L, Song X, *et al.* Identification of *Eleutherococcus senticosus* NAC transcription factors and their mechanisms in mediating DNA methylation of EsFPS, EsSS, and EsSE promoters to regulate saponin synthesis [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 536.
- [27] Zhu B, Huo D A, Hong X X, *et al.* The *Salvia miltiorrhiza* NAC transcription factor SmNAC1 enhances zinc content in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 2019, 688: 54-61.
- [28] Frick K M, Lorensen M D B B, Micic N, *et al.* The aerial epidermis is a major site of quinolizidine alkaloid biosynthesis in narrow-leaved lupin [J]. *New Phytol*, 2025, 245(5): 2052-2068.

[责任编辑 时圣明]