

小麦 NAC 转录因子 TaNAC14 的原核表达和分离纯化

陈志军^{1#}, 张立坚^{1#}, 池青¹, 吴保为¹, 敖兰吉亚², 赵惠贤^{1*}

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100

陈志军, 张立坚, 池青, 吴保为, 敖兰吉亚, 赵惠贤. 小麦 NAC 转录因子 TaNAC14 的原核表达和分离纯化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4171-4182.

CHEN Zhijun, ZHANG Lijian, CHI Qing, WU Baowei, AO Lanjiya, ZHAO Huixian. Prokaryotic expression and purification of the transcription factor TaNAC14 in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4171-4182.

摘要: 植物 NAC 转录因子参与调控多种生物学过程, 在植物生长发育和逆境适应性方面发挥重要作用。前期研究发现小麦(*Triticum aestivum*) NAC 家族成员 TaNAC14 正向调控幼苗根生长发育并增强其耐旱性。本研究对小麦 TaNAC14 蛋白的理化性质和结构进行了分析预测; 对 TaNAC14 的亚细胞定位和转录激活活性进行了验证; 构建了 TaNAC14 重组蛋白原核表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达菌株 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL, 对 TaNAC14 重组蛋白的诱导表达条件进行了优化, 对重组蛋白的可溶性进行了分析, 并利用镍柱对重组蛋白进行了分离纯化。结果表明, TaNAC14 具有 NAM 家族保守的结构域, 定位于细胞核, 具有转录激活活性。重组蛋白 HMT-TaNAC14 在大肠杆菌中的最佳诱导表达条件为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h; 该重组蛋白主要以可溶性形式存在; 利用镍柱对其进行了分离纯化, 获得了较高纯度的目的蛋白。本研究为后续进行 TaNAC14 调控靶基因的鉴定奠定了基础。

关键词: 小麦; TaNAC14; 载体构建; 原核表达; 分离纯化

资助项目: 国家自然科学基金(32372103, 32072003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372103, 32072003).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: hxzhao212@nwafu.edu.cn

Received: 2024-02-01; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-04-26

Prokaryotic expression and purification of the transcription factor TaNAC14 in wheat (*Triticum aestivum*)

CHEN Zhijun^{1#}, ZHANG Lijian^{1#}, CHI Qing¹, WU Baowei¹, AO Lanjiya², ZHAO Huixian^{1*}

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: The transcription factors (TFs) in the NAC family are involved in regulating multiple biological processes, playing an important role in plant growth, development, and stress adaptation. Our previous studies have demonstrated that TaNAC14, a member of the NAC family in wheat (*Triticum aestivum* L.), positively regulates root growth and development and enhances the drought tolerance of wheat seedlings. In this study, we analyzed the physicochemical properties and structure and verified the subcellular localization and transcriptional activation activity of TaNAC14. The prokaryotic expression vector pET21a-HMT-TaNAC14 was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL. The conditions for inducing the expression of the recombinant protein HMT-TaNAC14 were optimized. The solubility of the recombinant protein was analyzed, and the protein was purified by affinity chromatography on a Ni-nitrilotriacetic acid column. The results indicated that TaNAC14 had a conserved domain of the NAM family. It was located in the nucleus and had transcriptional activation activity. The optimal conditions for expression of the recombinant protein in *E. coli* were induction with 0.2 mmol/L IPTG for 4 h. The recombinant protein mainly existed in the soluble form, and the target protein was obtained after purification. This study lays a foundation for the identification of target genes regulated by TaNAC14.

Keywords: wheat; TaNAC14; vector construction; prokaryotic expression; purification

转录因子(transcription factor, TF)是真核生物细胞内具有调控功能的一大类蛋白质,它可以调控目标基因在生物体内的时空表达。在植物中,TF参与各种不同的生物过程,如发育控制、防御和应激反应的激发,在生长发育和逆境应答过程中发挥着重要作用^[1]。转录因子NAM、ATAF1/2和CUC2(简写NAC)是植物特异性TF家族之一,在陆地植物中广泛存在^[2]。1996年Souer等^[3]在矮牵牛属(*Petunia*)植物中发现首个NAC TF-NAM编码基因,它是胚胎和花模式形成所必需的。随后,在拟南芥中发现

了NAC的另外两个成员CUC和ATAF1/2蛋白调控植物生长发育^[4]。此后的20多年,研究者在植物NAC TF的鉴定、结构及功能研究方面开展了大量的工作。研究表明NAC TF通常都包含一个相对保守的N端NAC结构域和一个高度可变的C端转录调控结构域。经典的NAC结构域由大约150–160个氨基酸残基组成^[2,5–6]。可根据高度保守的N端NAC结构域和可变的C端结构域鉴定NAC TF家族成员^[7–8]。截至2023年12月,植物TF数据库PlantTFDB 3.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/>)已收录了来自150个

物种的 NAC 家族的 19 997 个基因, 每个物种 NAC TF 基因都很丰富, 在拟南芥、水稻、玉米和番茄基因组中分别有 138、328、189、101 个非冗余的 NAC TF 基因。

大量研究表明 NAC TF 参与调控植物生长和发育的许多生物学过程, 包括种子萌发^[9]、茎和根顶端分生组织形成^[3,10]、形态建成^[11]、衰老^[12]、侧根发育^[13]、果实和种子发育^[14-15]、生物防御^[16]及环境非生物胁迫应答^[17-18]。随着研究的不断深入, 许多 NAC TF 参与调控不同生物学过程的分子机制被逐渐阐明。目前, 对 NAC TF 生物学功能及作用机制的了解主要集中在拟南芥、水稻、番茄、玉米等植物。

重要主粮作物小麦(*Triticum aestivum*)因其基因组庞大且复杂, 高质量参考基因组序列获得较晚, 其 NAC 的鉴定和功能及作用机制研究工作相对滞后。基于小麦基因组参考序列, 鉴定出 NAC 家族共包含 453 个成员^[19]。在小麦中仅有少数几个 TaNAC TF 的功能被报道。Feng 等^[20]研究表明 *TaNAC21/22* 负调控转基因小麦条锈病抗性。小麦 TaRNAC1 TF 主要在根中表达, 在根部过表达 *TaRNAC1* 导致小麦苗期和成熟期根长和生物量显著增加, 根部编码赤霉素(gibberellin, GA)-3-氧化酶的 *GA3-ox2* 的表达水平升高, 该酶催化无活性赤霉素向有活性转化; 在限水生长条件下转基因小麦的耐旱性、生物量及籽粒产量比非转基因对照小麦显著提高^[21]。小麦携带 ABRE 启动子基序插入的有利等位基因 *TaSNAC8-6A* (in-313) 可被 TaABF 靶向, 并在耐旱基因型中促进 *TaSNAC8-6A* 干旱诱导表达; *TaSNAC8-6A*, 特别是 *TaSNAC8-6A* (in-313) 等位基因的自然变异对小麦的抗旱性有很大的贡献^[22]。

本课题组前期研究发现小麦 miR164-*TaNAC14* 模块调控幼苗根生长发育和非生物胁迫

(干旱和高盐)耐受性, *TaNAC14* 促进根生长发育并增强耐旱性^[23]。但是, *TaNAC14* 下游的靶基因及其调控小麦生长发育及耐旱性的分子机制尚待揭示。为此, 本研究分析了 *TaNAC14* 蛋白的理化性质和结构; 构建了 *TaNAC14* 的原核表达载体并优化了其在大肠杆菌中的表达条件; 对目的蛋白 *TaNAC14* 进行大量表达、分离及纯化, 以期为进一步开展 *TaNAC14* 的调控靶基因及互作蛋白的鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌株

携带 *TaNAC14* 基因的 pMD19T 质粒(pMD19T-*TaNAC14*)由本实验室构建。改造后的表达载体 pET21a-HMT (带 His 和 MBP 两种标签, 其中 MBP 是助溶蛋白)由西北农林科技大学生命科学院结构生物学研究室馈赠。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株为本实验室保存, BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL 表达菌株购自 KLANG 生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

本研究所用 PCR 引物(表 1)由西安擎科泽西生物有限公司合成。卡那霉素和异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)购自博奥拓达科技有限公司(北京)。PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、DNA Marker、Protein Marker、限制性内切酶 *Xba* I、*Nhe* I、*Nde* I、*EcoR* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、通用型 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。His60 Ni Surperflow Resin 购自 TaKaRa 公司(大连)。

1.2 方法

1.2.1 小麦 *TaNAC14* 蛋白的理化性质分析

TaNAC14 蛋白的理化性质分析按照张立坚^[24]

表 1 本研究所用的 PCR 引物

Table 1 The PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Usage
TaNAC14 (<i>Xba</i> I) F	ctag <u>ctctaga</u> ATGGAGCACGGCGAGCAGGAGCAG	p16318- <i>TaNAC14-GFP</i> vector construction
TaNAC14 (<i>Nhe</i> I) R	ctag <u>ctctagc</u> GTAGCCCCACGGCGCGGGCTC	
TaNAC14 (<i>Nde</i> I) F	cgcc <u>catatg</u> ATGGAGCACGGCGAGCAGGAGCAG	pGBKT7- <i>TaNAC14</i> vector construction
TaNAC14 (<i>Eco</i> R I) R	ccgga <u>attc</u> GTAGCCCCACGGCGCGGGCTC	
TaNAK14 (<i>Eco</i> R I) F	ccgga <u>attc</u> GAGCACGGCGAGCAGGAGCAG	pET21a- <i>HMT-TaNAC14</i> vector construction
TaNAK14 (<i>Xho</i> I) R	ccgctcgaG <u>TAGCCCCACGGCGCGGGCTC</u>	

The lowercase letters underlined in the primer sequences represent the corresponding restriction enzyme cleavage sites.

的方法进行。利用 ExPASy 蛋白分析网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)的 ProtParam 程序预测 TaNAC14 蛋白的等电点和分子量等理化性质;用 SOPMA 在线网站(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测 TaNAC14 的二级结构;利用 Pfam 在线网站(<http://pfam.xfam.org/>)分析 TaNAC14 的保守功能域;用 Phyre 2 在线软件(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>)进行 TaNAC14 三级结构建模。

1.2.2 TaNAC14 的亚细胞定位分析

为了对小麦 TaNAC14 进行亚细胞定位分析,构建了 TaNAC14 的亚细胞定位载体 p16318-TaNAC14-GFP。根据 p16318-GFP 载体和 TaNAC14 的编码序列,设计并合成包含限制性核酸内切酶 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶切位点的引物对 TaNAC14 (*Xba* I) F/TaNAC14 (*Nhe* I) R (表 1)。以重组质粒 pMD19-T-TaNAC14 为模板,用该引物对进行 PCR 扩增。PCR 反应体系见表 2。PCR 程序为: 95 °C 3 min; 98 °C 5 s, 55 °C 5 s, 72 °C 75 s, 30 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Nhe* I 分别对目的片段和表达载体 p16318-GFP 进行酶切、电泳检测和切胶回收。用 T4 DNA 连接酶连接目的片段,将 *TaNAC14* 编码序列亚克隆到 p16318-GFP 载体中 CaMV35S 启动子和 *GFP* 基因之间,使

表 2 扩增 TaNAC14 编码区的 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system for amplifying *TaNAC14* coding region

Reagent	Volume (μL)
dNTPs (2.5 mmol/L each)	4.0
Primer pair (10 μmol/L)	2.0
Template (100 ng/μL)	0.5
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μL)	0.5
5×PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10.0
ddH ₂ O	33.0

TaNAC14 在读码框内与 *GFP* 融合,构建成瞬时表达载体 p16318-TaNAC14-GFP。将瞬时表达载体 p16318-TaNAC14-GFP 通过基因枪(Bio-Rad)轰击洋葱表皮细胞,以 p16318-GFP 作为对照;将转化细胞在 1/2 Murashige and Skoog (MS)培养基^[25]上孵育,在光照或黑暗中 28 °C 孵育 36–48 h。转化细胞中的 GFP、融合蛋白 TaNAC14-GFP 以及细胞核荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)用 Leica 倒置显微镜 DMi8 进行观察。

1.2.3 TaNAC14 的转录活性分析

以重组质粒 pMD19-T-TaNAC14 为 PCR 模板,用含有限制性核酸内切酶酶切位点的引物对 TaNAC14 (*Nde* I) F/TaNAC14 (*Eco*R I) R (表 1)进行 PCR,扩增 TaNAC14 的编码序列。PCR 反应体系见表 2,反应程序同 1.2.2。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,切胶回收目的片段。

用 *Nde* I 和 *Eco*R I 分别对目的片段和酵母表达载体 pGBKT7 进行双酶切,电泳检测两种目的片段并分别切胶回收,再用 T4 DNA 连接酶进行连接,得到重组载体 pGBKT7-TaNAC14。测序确认此重组载体序列正确后,将其转化到酵母菌 Y2HGOLD 菌株中,以空载 pGBKT7 作为阴性对照。按照 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) 使用手册的操作步骤进行酵母单杂交实验,验证 TaNAC14 的自激活活性。

1.2.4 重组表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14 的构建

根据表达载体 pET21a-HMT 序列和 *TaNAC14* 的编码序列,设计并合成带有 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点的引物对 TaNAK14 (*Eco*R I) F/TaNAK14 (*Xho* I) R (表 1)。以重组质粒 pMD19-T-TaNAC14 为模板进行 PCR 扩增,以获得两端携带酶切位点的 *TaNAC14* 目的片段。PCR 反应体系见表 2,反应程序同 1.2.2。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,切胶回收目的片段。用 *Eco*R I 和 *Xho* I 分别双酶切目的片段及表达载体 pET21a-HMT,电泳检测并切胶回收两种目的片段。用 T4 DNA 连接酶将 *TaNAC14* 目的片段与载体 pET21a-HMT 的目的片段连接,得到重组表达载体。用该重组载体遗传转化大肠杆菌菌株 DH5 α ; 随机挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定及酶切鉴定后,将阳性单克隆菌液送西安擎科泽西生物有限公司测序确认;经测序确认的重组表达载体命名为 pET21a-HMT-TaNAC14。

1.2.5 重组蛋白在大肠杆菌中诱导表达条件优化

用重组表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14 质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL, 同时用携带 pET21a-HMT 空载体质粒为阴性对照。按照张立坚^[24]的方法进行重组蛋白诱导表达条件优化。具体步骤如下:用菌落 PCR 鉴定后挑取阳性单菌落,分别接种到

10 mL LB 液体培养基(含 50 μ g/mL 氨苄),37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。将过夜培养的对照菌和重组表达菌以 1:100 的比例分别接种至含 50 μ g/mL 氨苄的 5 mL LB 液体培养基中,继续培养至菌液的 OD_{600} 值为 0.4–0.6。向对照菌液和重组表达菌中分别加入不同 IPTG 使其终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L; 28 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h, 收集不同 IPTG 诱导浓度的菌体进行 SDS-PAGE (浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%), 以确定最适 IPTG 浓度。在 28 $^{\circ}$ C 和最适 IPTG 浓度条件下, 分别设置 0、2、4、6、8、10 h 的诱导表达时间, 在各时间点分别收集对照菌液和重组菌液, 用 10% 的 SDS-PAGE 进行检测, 以确定最适诱导表达时间。

1.2.6 重组蛋白的可溶性分析及纯化

根据上述摸索的目的蛋白最佳诱导表达条件进行重组菌的扩大培养, 诱导表达结束后, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心收集菌体。按照张立坚^[24]的方法进行重组蛋白的可溶性分析。具体步骤如下: 用 1/10 体积的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 溶液(加有蛋白酶抑制剂)重悬沉淀。重悬液用超声仪破碎 (6 mm 变幅杆, 功率 300 W, 3 s 工作/6 s 间歇, 共 10 min, 重复超声 2 次。超声过程在冰上进行)。收集 50 μ L 破碎液, 加入等体积 2 \times SDS Loading Buffer。其余破碎液于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min, 离心结束后取 50 μ L 上清, 加入等体积 2 \times SDS Loading Buffer。另取少许沉淀直接加入 100 μ L 1 \times SDS Loading Buffer 重悬。最后, 将加有 SDS Loading Buffer 的破碎液、上清和沉淀均于 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 分别取 15 μ L 样品, 用 10% 的 SDS-PAGE 进行检测来确定重组蛋白的可溶性。

pET21a-HMT 载体带有 His 标签, 故参照 His60 Ni SurperflowTM Resin (Clontech) 的操作

说明书进行重组蛋白的纯化。具体步骤如下：用 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡，取 10 倍柱体积的破碎上清样品以 0.5 mL/min 上样，收集穿出液，用 15 倍柱体积的平衡缓冲液洗去未吸附的蛋白，用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱、收集目的蛋白(如果上清溶液体积较大，可多次重复上述步骤)。上述纯化过程中分别收集 50 μ L 的上清穿出液和洗脱液，加入等体积 2 \times SDS Loading Buffer，通过 10% 的 SDS-PAGE 检测 TaNAC14 重组蛋白的纯化结果。

2 结果与分析

2.1 小麦 TaNAC14 的理化性质和结构分析

理化性质分析显示，TaNAC14 蛋白包含

373 个氨基酸残基，其理论分子质量为 40.44 kDa，等电点为 5.77，分子式为 $C_{1770}H_{2737}N_{495}O_{563}S_{15}$ 。对 TaNAC14 蛋白亲疏水性分析显示，其总平均亲水性为 -0.474 (大于 0 为疏水，小于 0 为亲水)，为亲水性蛋白。

TaNAC14 蛋白二级结构分析显示，其 N 端含有较多的 α 螺旋和 β 转角，分别占整个蛋白的 19.78% 和 4.88%。C 端无规则卷曲含量最高，占 65.58%。TaNAC14 蛋白的保守功能域分析显示，该蛋白具有 NAM 家族保守的结构域，是 NAC 超家族成员(图 1A)。TaNAC14 蛋白的三级结构建模结果显示，该模型的 N 端主要由 α 螺旋和 β -转角构成，C 端为无规则卷曲，与二级结构预测结果一致(图 1B)。

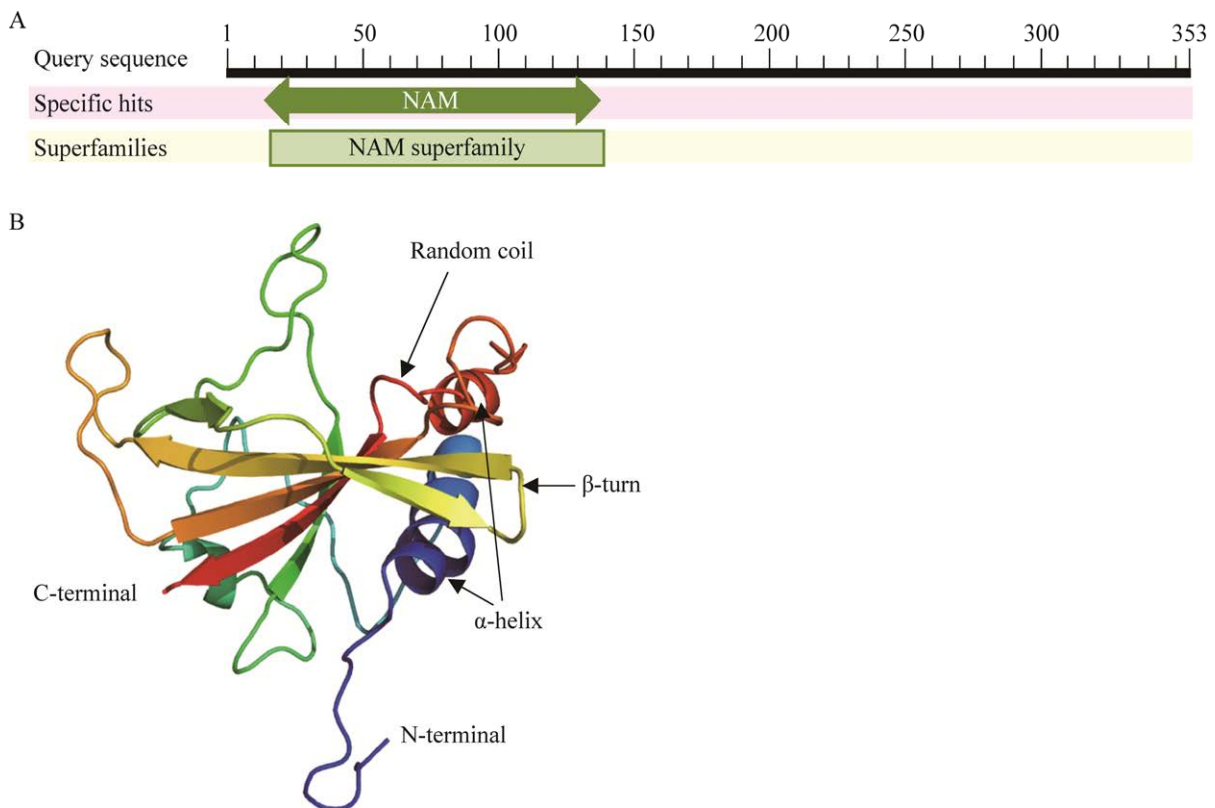


图 1 TaNAC14 蛋白的结构分析

Figure 1 The structural analysis of TaNAC14 protein. A: The conserved domain of TaNAC14 protein. B: Three-dimensional structure of TaNAC14 protein.

2.2 小麦 TaNAC14 的亚细胞定位和转录活性分析

对 p16318-TaNAC14-GFP 在洋葱表皮细胞瞬时表达进行分析,结果显示,在对照组中,整个细胞均观察到 GFP 信号,而 TaNAC14-GFP 融合蛋白的信号只在细胞核中出现,并与核 DNA 荧光染料 DAPI 共定位(图 2A)。这表明 TaNAC14-GFP 融合蛋白定位于细胞核,与 TaNAC14 作为 TF 的特征相符。

将重组载体 pGBKT7-TaNAC14 引入酵母菌株 Y2HGold 中,用非选择性(SD/-Trp)或选择

性(SD/-Trp/-His/-Ade)培养基进行筛选。结果显示,携带 pGBKT7-TaNAC14 的酵母菌落可以在两种培养基中正常生长,但携带 pGBKT7 酵母菌落仅在 SD/-Trp 培养基上生长(图 2B),证明 TaNAC14 具有转录活性。

2.3 TaNAC14 重组蛋白表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14 的构建

分别将从载体 pMD19-T-TaNAC14 上 PCR 扩增得到的目的基因片段(1 062 bp)和表达载体 pET21a 质粒用 *Xba* I 和 *Nhe* I 进行酶切,然后将目的片段与载体进行连接;之后用其转

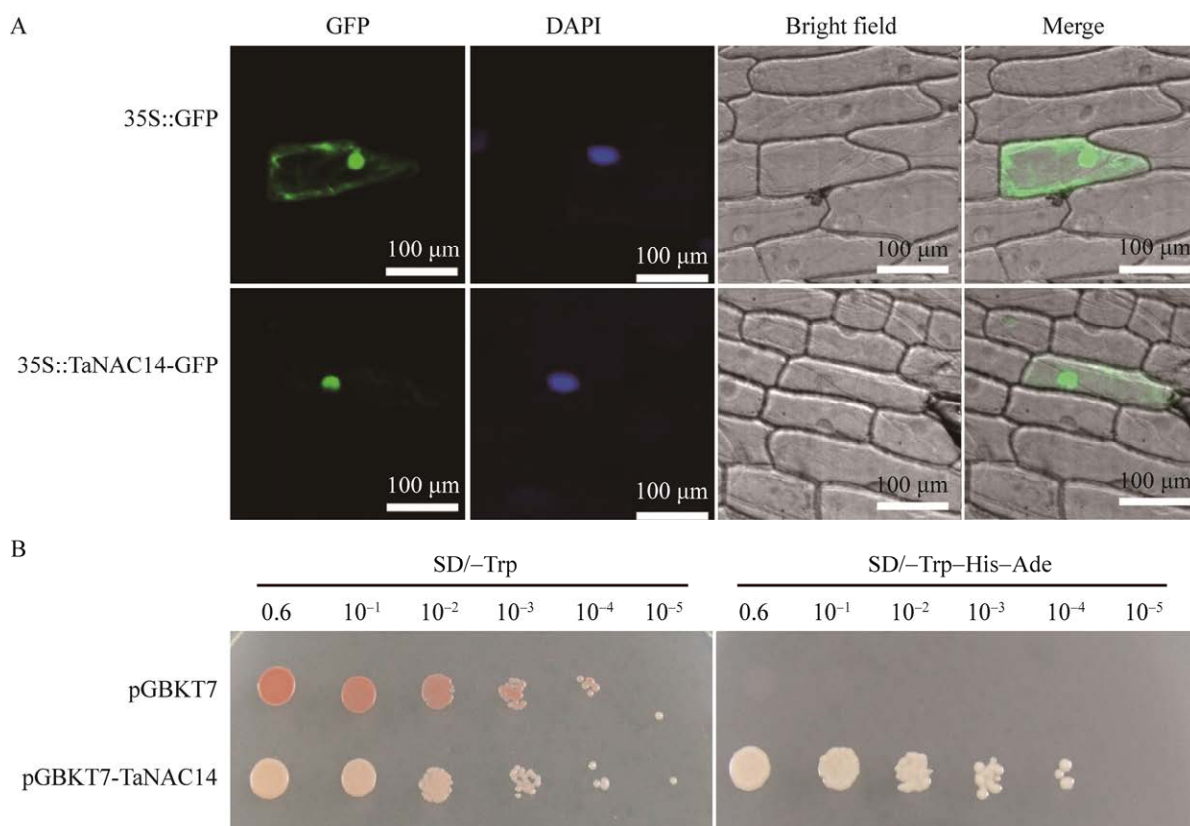


图 2 TaNAC14 的亚细胞定位与转录激活活性分析

Figure 2 Subcellular localization and transcriptional activity assay of TaNAC14. A: Subcellular localization of TaNAC14 in onion epidermal cells. 35S::GFP: p16318-GFP vector control; 35S::TaNAC14-GFP: The recombinant expression vector (p16318-TaNAC14-GFP) of fusion protein TaNAC14-GFP; DAPI: A blue fluorescent DNA dye used to indicate nuclear regions. B: Transcriptional activity assay of TaNAC14. pGBKT7: Empty vector (negative control); pGBKT7-TaNAC14: The recombinant vector carrying *TaNAC14*; 0.6, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} : Six different dilution levels of yeast colony; SD/-Trp: Trp-deficient synthetic medium; SD/-Trp/-His/-Ade: Trp-, Ade-, and His-deficient synthetic medium.

化大肠杆菌 DH5 α ，挑取单菌落进行 PCR 鉴定 (图 3A)。对鉴定到的阳性克隆提取质粒进行酶切鉴定，酶切后电泳检测结果显示酶切后获得约 5 000 bp 的 pET21a-HMT 载体骨架和约 1 060 bp 的目的片段(图 3B)。对重组表达载体质粒进一步测序分析，结果显示重组表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14 序列和读码框正确。

2.4 重组蛋白 TaNAC14 表达条件优化

用构建好的重组表达载体质粒 pET21a-HMT-TaNAC14 转化大肠杆菌 BL21 CodonPlus

(DE3)-RIPL 菌株，同时以空载体 pET21a-HMT 转化 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL 菌株作为对阴性对照。菌落 PCR 鉴定后分别取阳性单克隆扩大培养。首先，设置不同浓度 IPTG (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)，28 °C 诱导 6 h；在诱导表达结束后利用 SDS-PAGE 检测不同 IPTG 浓度诱导条件下重组蛋白 TaNAC14 的表达量。结果显示，IPTG 浓度在 0.2–1.0 mmol/L 范围内时，重组蛋白 TaNAC14 的表达量并未显著增加(图 4A)。考虑到低浓度 IPTG 利于诱

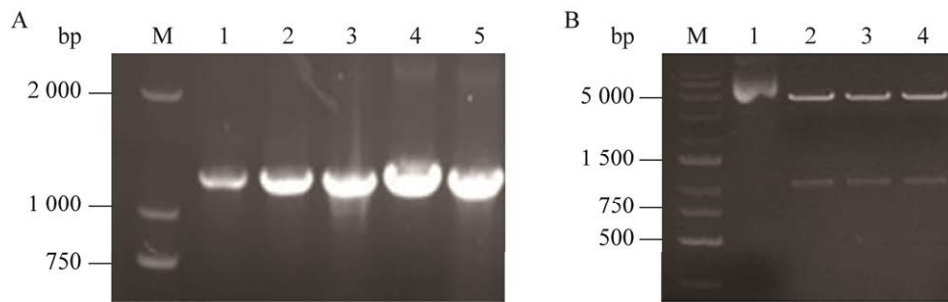


图 3 重组表达载体 pET21a-HMT-TaNAC14 的鉴定

Figure 3 Identification of recombinant expression vector pET21a-HMT-TaNAC14. A: Identification of pET21a-HMT-TaNAC14 by colony-PCR. Lane 1–5: PCR product of different single colony. B: Identification using *EcoR* I and *Xho* I digestion. Lane 1: Recombinant plasmid pET21a-HMT-TaNAC14; Lane 2–4: *EcoR* I and *Xho* I double digestion of pET21a-HMT-TaNAC14. M: 250 bp DNA ladder.

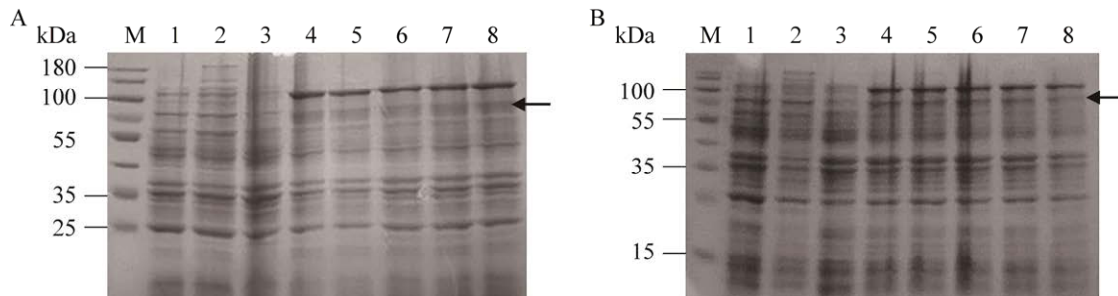


图 4 不同诱导条件下重组蛋白 TaNAC14 表达情况的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein HMT-TaNAC14 under different induction conditions. A: Recombinant protein TaNAC14 in different IPTG concentration (28 °C, 6 h). M: Protein marker; Lane 1 and 2: Un-induced and induced (0.2 mmol/L IPTG) *E. coli* strain containing empty plasmid pET21a, respectively; Lane 3–8: *E. coli* strain containing pET21a-HMT-TaNAC14 induced by IPTG at 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L, respectively. B: Recombinant protein TaNAC14 in different time (28 °C, 0.2 mmol/L of IPTG). Lane 1 and 2: Un-induced and induced (0.2 mmol/L IPTG) *E. coli* strain containing empty plasmid pET21a, respectively; Lane 3–8: *E. coli* strain containing pET21a-HMT-TaNAC14 induced 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, respectively. The arrows indicate the target protein.

导得到更多的可溶性目的蛋白,因此,确定后续重组蛋白诱导表达的 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L。之后在 0.2 mmol/L IPTG 浓度和 28 °C 条件下,设定不同诱导时间(0、2、4、6、8、10 h)进行重组蛋白 TaNAC14 诱导表达,利用 10% 的 SDS-PAGE 检测不同诱导时间重组蛋白 TaNAC14 的表达量。结果显示 TaNAC14 蛋白的表达量在 0-4 h 内随诱导时间的延长而增加,在 4-10 h 之间目的蛋白表达量无明显变化。考虑到诱导表达及纯化实验的时间周期,确定 4 h 为最适诱导时间(图 4B)。

2.5 重组蛋白 TaNAC14 的可溶性分析及纯化

按照上述最佳诱导表达条件,对携带 pET21a-HMT-TaNAC14 质粒的表达菌进行大量诱导表达;再按照 1.2.6 中的方法检测重组蛋白的可溶性。检测结果显示重组蛋白 TaNAC14 以可溶性形式存在于上清液中(图 5)。超声破碎后的上清液经镍柱纯化后进行 SDS-PAGE 检测,结果表明有单一的目的蛋白条带(图5)。这表明本研究纯化获得的目的蛋白可用于后续实验研究。

3 讨论

多种 NAC TF 参与调控不同生物学过程的分子机制已被逐渐阐明。拟南芥转录激活因子 NAC1 受生长素的诱导并能够传导生长素信号而影响侧根的发育;过表达 *AtNAC1* 则会增加拟南芥侧根数量^[26]; *AtNAC1* 通过与 *AtSCR/SCHR* 互动和招募转录共抑制子 *AtTPL* 至细胞周期调节蛋白基因 *CYCD6.1* 的启动子,形成复合物 *AtNAC1-AtSCR/SCHR-AtTPL* 以抑制其转录,从而控制主根的发育^[27-28]; *AtNAC056* 直接与硝酸盐同化基因 *NIA1* 的启动子结合,通过硝酸盐信号上调该基因表达并促进根系的生长^[29]。

拟南芥 *AtNAC016* 和 *AtNAP* 通过负调控 ABA 信号途径降低植物耐旱性^[30]。多项研究表明水稻 *OsNAC2* 对分蘖、茎秆粗细、开花期和穗分枝等都有影响; *OsNAC2* 过表达可通过上调 *OsKO2* 和下调 *OsEATB* 抑制 GA 信号传递,进而导致开花推迟^[31]; *OsNAC2* 还可通过直接调控 ABA 生物合成基因 *NCED* 和 ABA 8'-羟化酶基因 *OsABA8ox1* 诱导 ABA 介导的叶片衰老^[11]。*OsNAC127* 和 *OsNAC129* 可以直接靶向单糖转运蛋白基因 *OsMST6* 和糖运输基因 *OsSWEET4*, 通过形成异源二聚体调控水稻籽粒灌浆^[14]。水稻 *OsNAC5* 和 *OsNAC6* 能够激活 *OsLEA3* 基因的表达使体内保护蛋白含量增加,进而提高水稻抵御非生物胁迫的能力^[32-33]; 水稻多个 NAC 通过正调控或负调控体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累抑制或增强植物耐旱性^[8]。

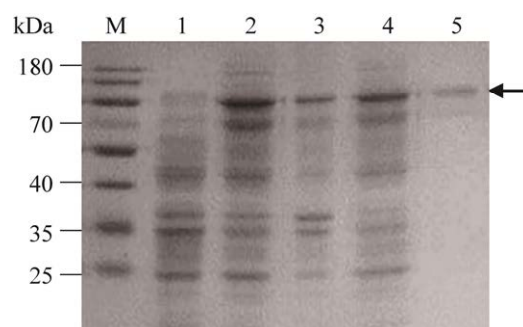


图 5 重组蛋白 TaNAC14 可溶性及分离纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 5 Analysis of the solubility and purification of recombinant protein TaNAC14 by SDS-PAGE. M: Protein marker; Lane 1 and 2: Un-induced and induced (0.2 mmol/L IPTG) *E. coli* strain containing recombinant plasmid pET21a-HMT-TaNAC14, respectively; Lane 3 and 4: Precipitation and supernatant of induced *E. coli* strain containing recombinant plasmid pET21a-HMT-TaNAC14 after ultrasonic lysis, respectively; Lane 5: Recombinant protein TaNAC14 purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography; the arrow indicates the target protein.

本课题组最近在小麦中鉴定到几个 miR164 靶向调控的新 NAC TF 家族成员(*TaNAC1*、*TaNAC11* 和 *TaNAC14*); 小麦转基因过表达研究表明 miR164-*TaNAC14* 模块调控幼苗根发育和耐旱及耐盐性, *tae-miR164* 过表达抑制小麦幼苗根的生长发育、降低耐旱性和耐盐性; 而 *TaNAC14* 过表达促进小麦幼苗根的生长发育并增强小麦耐旱性和耐盐性^[23]。但是, 在小麦体内 *TaNAC14* 究竟与哪些蛋白因子互作以及通过调控哪些靶基因的表达促进根生长、耐旱和耐盐性等问题尚待研究。这些问题的研究在一定程度上依赖于获得 *TaNAC14* 蛋白。由于蛋白原核表达系统操作简单, 且外源蛋白表达量较高, 其在真核基因功能研究及目标蛋白的制备过程中得到广泛应用^[34-36]。本研究对 *TaNAC14* 蛋白的疏水性和亲水性分析显示其总平均亲水性为-0.474, 为亲水蛋白; 蛋白结构分析表明 *TaNAC14* 含有 NAM 家族成员的保守结构域, 是 NAC 超家族成员(图 1); *TaNAC14* 的亚细胞定位分析结果表明其定位于细胞核(图 2A), 这些性质都符合 TF 的特征。进一步用酵母单杂交实验证明 *TaNAC14* 蛋白具有转录激活活性(图 2B)。为了能获得可溶性的 *TaNAC14* 蛋白用于后期 *TaNAC14* 调控靶基因和互作蛋白鉴定的研究, 本研究以改造后同时携带 His 标签和 MBP (助溶蛋白) 标签的原核表达载体 pET21a-HMT 为骨架, 构建了在 *TaNAC14* 的 N-端融合 His-MBP 的重组蛋白的表达载体 pET21a-HMT-*TaNAC14*; 将其转入大肠杆菌表达菌株 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL。对重组菌的目的蛋白诱导表达条件(IPTG 诱导浓度和诱导时间)进行了探索和优化, 确定重组蛋白最适诱导表达条件为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h (图 4A、4B)。原核表达蛋白的可溶性分析结果显示重组蛋白 HMT-*TaNAC14* 为可溶性蛋白; 利用 His60 Ni Surperflow Resin

柱进行目标蛋白的分离纯化, 获得了较高纯度的目的蛋白, 为后续 *TaNAC14* 蛋白特异抗体的制备、利用凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)筛选鉴定 *TaNAC14* 的调控靶基因以及利用 Pull-Down 实验鉴定 *TaNAC14* 的互作蛋白等研究奠定了基础。

4 结论

小麦 TF *TaNAC14* 蛋白属于亲水蛋白, *TaNAC14* 具有 NAM 家族保守的结构域, 定位于细胞核, 且具有转录激活活性。重组蛋白 HMT-*TaNAC14* 在大肠杆菌中最适诱导表达条件为 0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 重组蛋白为可溶性蛋白; 本研究利用镍柱对重组蛋白进行分离纯化, 获得了较高纯度的目的蛋白。

REFERENCES

- [1] SHIU SH, SHIH MC, LI WH. Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 18-26.
- [2] OLSEN AN, ERNST HA, LEGGIO LL, SKRIVER K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79-87.
- [3] SOUER E, van HOUWELINGEN A, KLOOS D, MOL J, KOES R. 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] DELESSERT C, KAZAN K, WILSON IW, VAN DER STRAETEN D, MANNERS J, DENNIS ES, DOLFERUS R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(5): 745-757.
- [5] OOKA H, SATOH K, DOI K, NAGATA T, OTOMO Y, MURAKAMI K, MATSUBARA K, OSATO N, JUN KW, CARNINCI P, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI K, KOJIMA K, TAKAHARA Y, YAMAMOTO K, KIKUCHI S. Comprehensive analysis of NAC family

- genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247.
- [6] YAMAGUCHI M, OHTANI M, MITSUDA N, KUBO M, OHME-TAKAGI M, FUKUDA H, DEMURA T. VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2012, 22(4): 1249-1263.
- [7] SINGH S, KOYAMA H, BHATI KK, ALOK A. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement[J]. Journal of Plant Research, 2021, 134(3): 475-495.
- [8] HAN KJ, ZHAO Y, SUN YH, LI Y. NACs, generalist in plant life[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(12): 2433-2457.
- [9] PARK J, KIM YS, KIM SG, JUNG JH, WOO JC, PARK CM. Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2011, 156(2): 537-549.
- [10] KIM YS, KIM SG, PARK JE, PARK HY, LIM MH, CHUA NH, PARK CM. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2006, 18(11): 3132-3144.
- [11] KATO H, MOTOMURA T, KOMEDA Y, SAITO T, KATO A. Overexpression of the NAC transcription factor family gene *ANAC036* results in a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(7): 571-577.
- [12] MAO CJ, LU SC, LV B, ZHANG B, SHEN JB, HE JM, LUO LQ, XI DD, CHEN X, MING F. A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence *via* ABA biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2017, 174(3): 1747-1763.
- [13] YANG XF, KIM MY, HA J, LEE SH. 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.
- [14] REN Y, HUANG ZQ, JIANG H, WANG Z, WU FS, XIONG YF, YAO JL. A heat stress responsive NAC transcription factor heterodimer plays key roles in rice grain filling[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(8): 2947-2964.
- [15] LIU GS, LI HL, GRIERSON D, FU DQ. NAC transcription factor family regulation of fruit ripening and quality: a review[J]. Cells, 2022, 11(3): 525.
- [16] YUAN X, WANG H, CAI JT, LI DY, SONG FM. NAC transcription factors in plant immunity[J]. Phytopathology Research, 2019, 1(1): 3.
- [17] SHEN JB, LV B, LUO LQ, HE JM, MAO CJ, XI DD, MING F. The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40641.
- [18] KUROWSKA M, DASZKOWSKA-GOLEC A. Molecular mechanisms of SNAC1 (stress-responsive NAC1) in conferring the abiotic stress tolerance[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2023, 337: 111894.
- [19] BORRILL P, HARRINGTON SA, UAUY C. Genome-wide sequence and expression analysis of the NAC transcription factor family in polyploid wheat[J]. G3: Genes|Genomes|Genetics, 2017, 7(9): 3019-3029.
- [20] FENG H, DUAN XY, ZHANG Q, LI XR, WANG B, HUANG LL, WANG XJ, KANG ZS. The target gene of *tae-miR164*, a novel NAC transcription factor from the NAM subfamily, negatively regulates resistance of wheat to stripe rust[J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(3): 284-296.
- [21] CHEN DD, CHAI SC, McINTYRE CL, XUE GP. Overexpression of a predominantly root-expressed NAC transcription factor in wheat roots enhances root length, biomass and drought tolerance[J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(2): 225-237.
- [22] MAO HD, LI SM, WANG ZX, CHENG XX, LI FF, MEI FM, CHEN N, KANG ZS. Regulatory changes in TaSNAC8-6A are associated with drought tolerance in wheat seedlings[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(4): 1078-1092.
- [23] CHI Q, DU LY, MA W, NIU RY, WU BW, GUO LJ, MA M, LIU XL, ZHAO HX. The miR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance in wheat seedlings[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2023, 22(4): 981-998.
- [24] 张立坚. *TaNAC14* 和 *TaRZ2* 基因的体外表达分析及其转基因过表达小麦株系的鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018.
- ZHANG LJ. Expression analysis of *TaNAC14* and *TaRZ2* *in vitro* and identification of wheat overexpressing-transgenic lines[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).
- [25] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for

- rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497.
- [26] XIE Q, GUO HS, DALLMAN G, FANG SY, WEISSMAN AM, CHUA NH. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals[J]. *Nature*, 2002, 419: 167-170.
- [27] XIE CT, DING ZJ. NAC1 maintains root meristem activity by repressing the transcription of *E2Fa* in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12258.
- [28] XIE CT, LI CL, WANG FX, ZHANG F, LIU JJ, WANG JX, ZHANG XS, KONG XP, DING ZJ. NAC1 regulates root ground tissue maturation by coordinating with the SCR/SHR-CYCD6;1 module in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(4): 709-725.
- [29] XU PP, MA W, HU JB, CAI WM. The nitrate-inducible NAC transcription factor NAC056 controls nitrate assimilation and promotes lateral root growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(3): e1010090.
- [30] SAKURABA Y, KIM YS, HAN SH, LEE BD, PAEK NC. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing AREB1 transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(6): 1771-1787.
- [31] CHEN X, LU SC, WANG YF, ZHANG X, LV B, LUO LQ, XI DD, SHEN JB, MA H, MING F. *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.
- [32] TAKASAKI H, MARUYAMA K, KIDOKORO S, ITO Y, FUJITA Y, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, NAKASHIMA K. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284(3): 173-183.
- [33] SAAD ASI, LI X, LI HP, HUANG T, GAO CS, GUO MW, CHENG W, ZHAO GY, LIAO YC. A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses[J]. *Plant Science*, 2013, 203/204: 33-40.
- [34] 陈德鑫, 李雯雯, 李思斌, 李宁, 郭豪, 龙月, 杨永霞, 贾红昉, 张洪映, 崔红, 张松涛. 烟草 NteIF2 α 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备和应用[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(1): 50-57.
- CHEN DX, LI WW, LI SB, LI N, GUO H, LONG Y, YANG YX, JIA HF, ZHANG HY, CUI H, ZHANG ST. Prokaryotic expression, purification of NteIF2 α and preparation and application of polyclonal antibody in *Nicotiana tabacum*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(1): 50-57 (in Chinese).
- [35] 黄传臻, 刘香利, 曹汝菲, 赵惠贤. 小麦 CWI-B1 的原核表达、纯化与多克隆抗体制备[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(7): 1102-1110.
- HUANG CZ, LIU XL, CAO RF, ZHAO HX. Prokaryotic expression, purification and preparation of polyclonal antibody for wheat (*Triticum aestivum*) CWI-B1[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(7): 1102-1110 (in Chinese).
- [36] 张文静, 陈海超, 郭利建, 刘香利, 赵惠贤. 小麦 TaWTG1 的原核表达、纯化及去泛素化酶活性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(10): 1711-1719.
- ZHANG WJ, CHEN HC, GUO LJ, LIU XL, ZHAO HX. Prokaryotic expression, purification and deubiquitinase activity assay of TaWTG1 in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(10): 1711-1719 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)