

丹参 *BTF3* 基因的克隆及生物信息学分析

何苗, 武雪, 王喆之*

(药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室,
陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

摘要: 采用 PCR 及 RT-PCR 技术分别从丹参基因组 DNA 和 cDNA 水平克隆了通用转录因子 3 (*Basic Transcription Factor3*, *BTF3*) 基因, 运用生物信息学方法对该基因编码氨基酸序列的组成成分、疏水性/亲水性、翻译后修饰、蛋白质高级结构等进行预测, 利用实时荧光定量 PCR 检测丹参不同器官以及脱落酸和干旱诱导下 *BTF3* 的表达情况。结果表明: 丹参 *BTF3* 基因全长为 1510 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子; cDNA 全长 794 bp, 编码蛋白整体表现为亲水性, 二级结构主要由 α -螺旋、不规则卷曲组成, 具有 NAC 结构域, 与其他植物的 *BTF3* 在序列组成、结构及活性位点上有高度的相似性。丹参 *BTF3* 基因在根、茎、叶中均有不同程度的表达, 表达丰度为: 根 > 茎 > 叶; ABA 诱导该基因表达量 24 h 内没有显著的变化; 干旱胁迫下该基因的表达受到抑制。

关键词: 通用转录因子 3; 生物信息学; 丹参

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0582-07

Cloning and Bioinformatics Analysis of *BTF3* Gene from *Salvia miltiorrhiza* Bunge

He Miao, WU Xue, WANG Zhe-Zhi *

(Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry,
National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in
Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: A Basic transcription factor 3 (*BTF3*) gene from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (*SmBTF3*) was cloned by PCR and RT-PCR, named *SmBTF3*. The deduced amino acid sequence of *SmBTF3* were analyzed by the tools of bioinformatics in the following aspects: the chemical composition, hydrophobicity or hydrophilicity, post-translational modification, structural domain and the advanced structure of deduced amino acid sequence. The expressions of *SmBTF3* in different organs and under stress treatments were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that the genomic DNA of *SmBTF3* was 1510 bp long, which contained 5 exons and 4 introns, while its cDNA was 794 bp. The deduced protein were hydrophilic. The second structure prediction indicated α -helix and random coil were the major motifs and NAC domain was included. The sequence composition, structure, and activity sites were highly similar with other *BTF3* proteins in plants. The expression of *SmBTF3* was the highest in root, followed by that in stem, and the least in leaf. Obvious changes of the expression of *SmBTF3* were not observed during 24 h treated by ABA, while under the drought stress, the expression was inhibited at first and then increased to control level.

Key words: Basic transcription factor 3 (*BTF3*); Bioinformatics; *Salvia miltiorrhiza*

NAC (nascent-polypeptide-associated complex) 是由 α 和 β 两个亚基组成的异二聚体, 结合在与核糖体连接的新生多肽链上^[1], 通过阻止初生肽链和信号识别颗粒之间不正确的相互作用, 控制着初生蛋白正确的亚细胞定位, 从而抑制非分泌性蛋白定位到内质网上^[2]。其中 β 亚基就是 *BTF3*, 即通用转

录因子 3, 最初是在 HeLa 细胞的提取物中被鉴定出来的, *BTF3a* 和 *BTF3b* 是它的两个异型体, 由相同 mRNA 的差异剪接而来, *BTF3b* 较 *BTF3a* 缺少了 N 端的 44 个氨基酸, 它们都可结合在 RNA 聚合酶 II 上, 与 RNA 聚合酶 II 相互作用, 参与类型 II 启动子的起始转录, 但只有 *BTF3a* 是有活性的^[3,4]。作为

收稿日期: 2008-12-01, 修回日期: 2009-03-19。

基金项目: “十一五”科技支撑计划(2006BAI06A12)。

作者简介: 何苗(1984-), 女, 博士研究生, 研究方向为植物生物技术。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zzwang@snnu.edu.cn)。

转录因子, *BTF3* 可以调节基因的转录水平, 酿酒酵母中 *BTF3* 的类似物——*EGD1* 和 *BTT1*, 影响某些基因的转录水平^[5]; *BTF3* 基因在胰腺癌组织 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 中过量表达, 并且对参与 PDAC 不同生理病理方面的基因起到转录调控作用^[6]。 *BTF3* 的功能并不局限于调节基因的转录, Brockstedt 等发现 *BTF3* 与细胞凋亡相关^[7], 而后 Bloss 等在线虫中鉴定出一种新的细胞凋亡抑制因子 (inhibitor of cell death-1, ICD-1), 即 *BTF3*^[8]。高等植物中 *BTF3* 的研究较少, 对烟草 *BTF3* 进行基因沉默, 导致其叶片发黄、形态异常; 在细胞水平, 其表达量的下调影响了叶绿体和线粒体的发育及其生理作用^[9]。可见, *BTF3* 不仅可以调节基因的表达、抑制细胞凋亡, 而且对细胞乃至生物体的生长发育以及形态建成也有一定的影响。

本文运用 PCR 和 RT-PCR 技术从丹参基因组 DNA 和 cDNA 水平克隆出了丹参 *BTF3* 基因, 采用生物信息学的方法对其推导的氨基酸序列的组成、理化性质、结构特征及功能等方面进行预测和分析, 并利用实时定量 PCR 的方法对该基因在丹参中的组织特异性表达情况以及不同胁迫诱导下其表达量的变化进行了探讨, 为进一步研究植物 *BTF3* 的功能提供一定的资料。

1 材料与方法

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 种子采自陕西天士力植物药业商洛有限公司商州药源基地, 于蛭石中萌发, 20 d 后进行移栽, 以营养液浇灌, 培养条件为: 培养温度 (25 ± 2) °C, 光暗周期为 16 h/8 h (day/night), 光照强度 2000 lx (日光灯), 长出三对真叶的幼苗用于各种胁迫处理。将丹参幼苗小心取出, 洗净, 分别收集其根、茎、叶, 用于组织特异性表达的研究; 对丹参幼苗进行 ABA 处理, 用 100 μmol/L ABA 溶液浇灌幼苗, 每株 20 mL, 分别于 1、2、4、6、12、24 h 收集材料; 对丹参幼苗进行干旱处理, 将幼苗小心取出, 洗净, 置于干净滤纸上, 分别于 10、30、60、80、100、120 min 收集材料; 所有材料经液氮速冻, -80 °C 保存, 用于总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成。

总 RNA 提取试剂盒 (BIOZOL) 购自于 BioFlux 公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒购自 Fermentas 公司, 丹参总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成严格按照试剂盒说明书完成; 依据本实验室闫亚平等构建的丹参 cDNA 文库中的 EST 序列^[10], 采用 Primer Premier 5.0 在开放阅读框 (open

reading frame, ORF) 两端设计了 RT-PCR 扩增引物 *BTF3s* (5'-CAGAGATGAATGTCGAAAACTAATG-3') 和 *BTF3a* (5'-AATTTATCATGGAAGGTTCACTCAA-3')。丹参 *BTF3* cDNA 序列 PCR 扩增反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。DNA 提取采用 CTAB 法; 丹参 *BTF3* 基因组序列扩增采用降落式 PCR, 程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 退火温度从 57 °C 起每 2 个循环降 1 °C, 直至 53 °C, 退火时间为 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增片段经凝胶回收 (试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司) 插入 T 载体 (购自 Promega 公司) 后转入大肠杆菌 DH5α 送上海捷瑞生物公司测序。采用 Primer Premier 5.0 设计了荧光定量 PCR 扩增引物 R-*BTF3s* (5'-TCAACCCCAAAGTCCAAGCATCTAT-3') 和 R-*BTF3a* (5'-TTCAAACGTCTCACAGCAACAAGT-3'); PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 30 s, 收集荧光, 40 个循环。

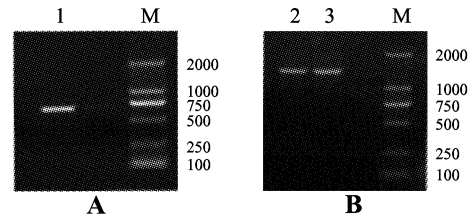
数据资料来源于 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸及蛋白质数据库中已注册的 *BTF3* 的核酸序列及其对应的氨基酸序列: 马铃薯 (*Solanum tuberosum*, DQ241859、ABB87130)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*, DQ307490、ABC24973)、烟草 (*Nicotiana benthamiana*, DQ447646、ABE01085)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NM_101651、NP_173230)、水稻 (*Oryza sativa*, AY224531、AA072645)、小果野蕉 (*Musa acuminata*, AY651062、AAT67244)、百脉根 (*Lotus japonicus*, AJ580824、CAE45592)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *BTT1*: X78724、CAA55370; *EGD1*: X78725、CAA55371)、人 (*Homo sapiens*, a: NP_001032726、NM_001037637; b: NM_001207、NP_001198)。利用 DNASTar 软件分析核酸、氨基酸序列的组成及理化性质、查找 ORF 并进行翻译; 核酸及氨基酸序列的同源性、保守性结构域、多序列比对利用 Blast、ClustalW 在线工具完成; 氨基酸翻译后修饰、亲水性/疏水性的分析用在线工具 NetPhosK 1.0 Server、ProtScale 完成; 蛋白质二级结构的预测用 SOPMA 在线工具完成。

2 结果和分析

2.1 丹参 *BTF3* 基因 cDNA 和基因组 DNA 序列的克隆及对应氨基酸序列的组成成分、理化性质分析
经 RT-PCR 反应从丹参中扩增出一特异性条带

(图 1:A),测序验证该片段长 794 bp,经 DNASTar 软件分析其包含有一 492 bp 的 ORF,编码 163 个氨基酸(图 2),分子量为 17.58 kD,与马铃薯、烟草、番茄、百脉根、小果野蕉、拟南芥、水稻等植物 BTF3 的基本组成存在一定的差异,但编码蛋白均属不稳定类蛋白质(表 1)。

从丹参基因组中扩增出一特异性条带(图 1:B),测序验证该片段全长 1510 bp,与 cDNA 的测序结果比对显示,丹参 *BTF3* 基因包含 5 个外显子和 4 个内含子(图 2)。



M:DL2000 marker; 1:扩增出的丹参 *BTF3* cDNA 条带; 2,3:扩增出的丹参 *BTF3* 基因组 DNA 条带
M:DL2000 marker; 1:cDNA (A) of *BTF3* from *Salvia miltiorrhiza*; 2,3:Genomic DNA (B) of *BTF3* from *S. miltiorrhiza*

图 1 丹参 *BTF3* cDNA 的 RT-PCR 扩增(A)及基因组 DNA 的 PCR 扩增(B)结果

Fig. 1 The result of amplification of cDNA(A) and genomic DNA (B) of *BTF3* from *Salvia miltiorrhiza*

表 1 不同植物 *BTF3* 基因对应氨基酸序列的组成成分及理化性质分析
Table 1 Comparison among deduced amino acid sequences of *BTF3* from different plants in composition, physical and chemical characters

种名 Species	开放阅读框 ORF (bp)	推导氨基酸 残基数 Number of deduced amino acid residues	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point (pI)	氨基酸比例 Amino acid proportion (%)				蛋白 不稳定性 Protein instability
					碱性氨基酸 Basic amino acid	酸性氨基酸 Acidic amino acid	疏水氨基酸 Hydrophobic amino acid	极性氨基酸 Polar amino acid	
<i>S. miltiorrhiza</i>	492	163	17582.9	5.94	12.88	14.11	33.74	22.08	48.35
<i>S. tuberosum</i>	489	162	17482.8	6.31	12.96	13.58	36.42	22.84	46.30
<i>N. benthamiana</i>	483	160	17344.6	6.32	13.75	14.38	33.75	22.50	44.23
<i>L. esculentum</i>	489	162	17407.7	6.85	12.96	12.96	36.42	22.22	44.12
<i>L. japonicus</i>	495	164	17863.1	5.51	13.41	15.24	33.54	23.78	51.61
<i>M. acuminata</i>	474	157	17218.5	6.62	14.65	14.65	33.12	22.29	53.37
<i>A. thaliana</i>	498	165	17946.2	6.62	13.94	13.94	33.33	26.06	48.26
<i>O. sativa</i>	528	175	19207.5	5.26	15.43	17.71	29.71	22.28	49.55

```

1   TCCAACGGTTGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCATGGCGGCCGCGGAATTCAGTAGTGATTGGGGTACCCAGAG
81  ATGAATGTCGAAAACTAATGAAGATGGCGGTTCCGTCGCACAGGAGGGAAGGTACAATGAGAAGgtgtgttcttga
   M N V E K L M K M A G S V R T G G K G T M R R
161 tagacagacctatggcttgggaatagaayatecgtcggctcttttaactttgtctgtttgtgtttcttaataaaagca
241 ttttgggggtttgcagAAAGAAGAGGCTGTGCACAAGACGACCACAACAGACGACAAAAGGCTCAAGTACCTTGAAG
   K K K A V H K T T T T D D K R L Q S T L K
321 AGAATAGGAGTGAATGCCATACCTGCAATTGAGGAAGTAAATATCTTCAAGGAAGATGTAGTTATACAGTTTCAACCC
   R I G V N A I P A I E E V N I F K E D V V I Q F I N P
401 CAAAGtccgaactgctggagtttcagtttgttgatgcttttgcatttctcatctttgtttgtctttttaaactttt
   K
481 gtctgttttttctattttgtctgttttcagTCCAAGCATCTATTGCAGCCAACCTGGGTCTGTAGCGGCACCTCTCAGA
   V Q A S I A A N T W V V S G T P Q
561 ACAAGAgtagctttaacctgaaacctactctttatatagctgaaatggttgaactaagctctaaaagtccatatagcctg
   N K
641 atagtatttctgtcacctgttttagttttctaatctgtgttttctttgtaacacaaatggaagcttcttctcaatttaa
721 ggttcaaacatccctgtcttttaggcaacattacaaatgaaattgtgtacatcttctctttaaattgttaaatctcate
801 atttgttactcttatgttcaactcaagcattttgtatctcatttggatcatcaatgaaagcttgctttgttcaacatttg
881 cctcctagtttaaatatatttagagttgattttatttgaattcttgtatggttatttcagAGTTGCAGGACATCTTCC
   K L Q D I L P
961 GCAAATTATCCACCAAGTTGGGtaagtgtcttttccctttcttttggatcttgaatgtccagttttataaaaaaatct
   Q I I H Q L G
1041 ctaactcaaaaatatcttcttctacataattccaggTCCGGATAACTTGGGAACTTGAAAAAGCTAGCAGAACAAATTC
   P D N L E N L K K L A E Q F
1121 CAGAAGCAGGCACCGCYGATGGCAGTGGTACRGCTTCTGGTGACGAGAAGATGATGATGACGACGTACCGAACTTGT
   Q K Q A P A D G S G T A S G A A E D D D D V P E L V
1201 TGCTGGTGAGACGTTTGAAGCTGCCGACAGGAGGACACGCCCGCCCTCTTGAGGATTCTATTTTCAGTTTGGAAACC
   A G E T F E A A A E E G H A P P S *
1281 AGTGCTTACATTTTCAATGTTTGAAGATCTGTTACATTAATTTGTCGTGATGAACCGTACTTGAAAGCTAGGTCTA
1361 TGTGTCGATTAACTCGCGTGCTTTACCGATTCGTACATCAGTGTGTTTGTAGTGAACCTTCCATGATAAATATC
1441 GATGGAATCACTAGTGAATTCGCCGCGGCCATGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTGG

```

图 2 丹参 *BTF3* 基因序列及其推导的氨基酸序列

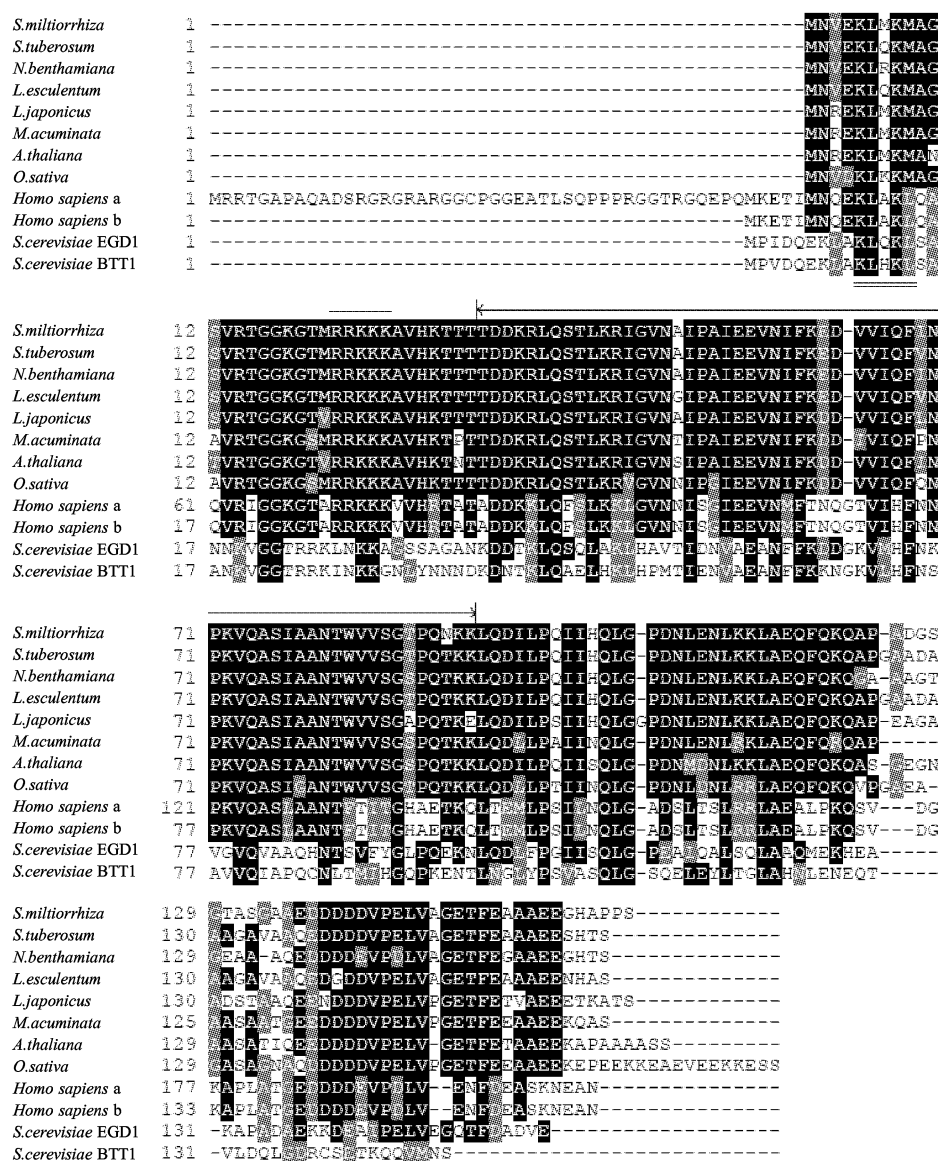
Fig. 2 The DNA sequence and deduced amino acid of *BTF3* from *S. miltiorrhiza*

2.2 丹参 *BTF3* 基因的核酸及其推导氨基酸序列的相似性比对分析

用Blast程序对丹参 *BTF3* 基因的核酸及推导氨基酸序列进行同源性比对,Blastn 比对结果表明,丹参 *BTF3* 基因的核酸序列与马铃薯 (*S. tuberosum*, DQ241859)、番茄 (*L. esculentum*, DQ307490)、烟草 (*N. benthamiana*, DQ447646)、拟南芥 (*A. thaliana*, NM_101651)、水稻 (*O. sativa*, AY224531)、小果野蕉 (*M. acuminata*, AY651062) 相似性较高,分别为 80%、80%、79%、76%、76%、73%;Blastp 比对结果表明,丹参 *BTF3* 与马铃薯 (ABB87130)、烟草

(ABE01085)、番茄 (ABC24973)、百脉根 (*L. japonicus*, CAE45592)、拟南芥 (NP_173230)、水稻 (AA072645)、小果野蕉 (AAT67244) 等有较高的相似性,分别为 89%、89%、88%、85%、83%、81%、81%,此外,丹参 *BTF3* 与人 *BTF3a*、*BTF3b* 的相似度分别为 50% 和 55%,与酿酒酵母 *BTF3* 类似物 EGD1 和 BTT1 也有 42% 和 27% 的相似度。

用 Clustal W 程序对丹参、马铃薯、烟草、番茄、百脉根、小果野蕉、拟南芥、水稻 *BTF3* 以及人 *BTF3a* 和 *BTF3b*、酿酒酵母 *BTF3* 类似物 (EGD1 和 BTT1) 的氨基酸序列进行多序列比对,结果表明 (图 3):丹



氨基酸残基按照其保守性由高到低分别用黑色和浅灰色表示。单划线表示在植物中可能的核定位信号序列。双划线表示酵母中介导 *BTF3* 基因入核的基序。箭头表示 NAC 功能域

The residues conserved among the compared sequences are boxed in black or light gray based on the degree of conservation. The overline indicates a putative nuclear localization signal sequence in plants. The double overline indicates a putative motif (KLXKL) responsible for nuclear import in yeast. The arrow indicates the NAC domain

图 3 *BTF3* 氨基酸序列多重比对
Fig. 3 Multiple sequence alignment of *BTF3*

参与烟草等植物的 BTF3 高度相似,与其他物种的 BTF3 也有较高的相似度,并且含有保守的 NAC 功能域。

Blast-Conserved Domains Search 分析发现(图4),在 34-92 位氨基酸之间含有 BTF3 蛋白特征结构——NAC 功能域,与多序列比对的结果相一致。

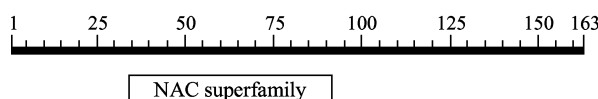
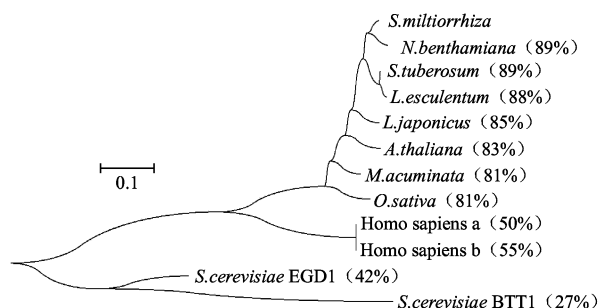


图4 丹参 BTF3 氨基酸序列功能域分析

Fig. 4 Functional domain analysis of BTF3 from *S. miltiorrhiza*

在 MEGA4 软件平台上采用 Neighbor-Joining 方法对不同 BTF3 氨基酸序列进行分子系统进化分析(图5),发现丹参 BTF3 与烟草最为接近,整体来看植物 BTF3 亲缘关系比较接近,先聚为一簇,与人和酵母 BTF3 也有较高的相似度,与多序列比对的结果相吻合。可见 BTF3 在进化过程中相对保守。



括号中数字显示的是丹参 BTF3 与其他物种中 BTF3 的同源蛋白的相似性

The amino acid sequence identity between BTF3 from *S. miltiorrhiza* and the BTF3 homologs from other species is indicated in parentheses

图5 BTF3 氨基酸序列分子系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of BTF3

2.3 疏水性/亲水性的预测和分析

对蛋白质的疏水性/亲水性进行预测和分析可为蛋白高级结构预测提供参考。用 ProtScale 对丹参 BTF3 氨基酸序列进行疏水性/亲水性预测,结果表明(图6:A),多肽链第22位的 Arg 具有最低分值 -2.644,亲水性最强,第50位的 Ala 具有最高的分值 1.756,疏水性最强。整个多肽链前端亲水,中间部位是疏水区域,后端区域为亲水区域,整体上蛋白表现为亲水蛋白。对其他植物 BTF3 氨基酸序列的疏水性/亲水性分析,也得到类似的结果(如拟南芥,见图6:B)。

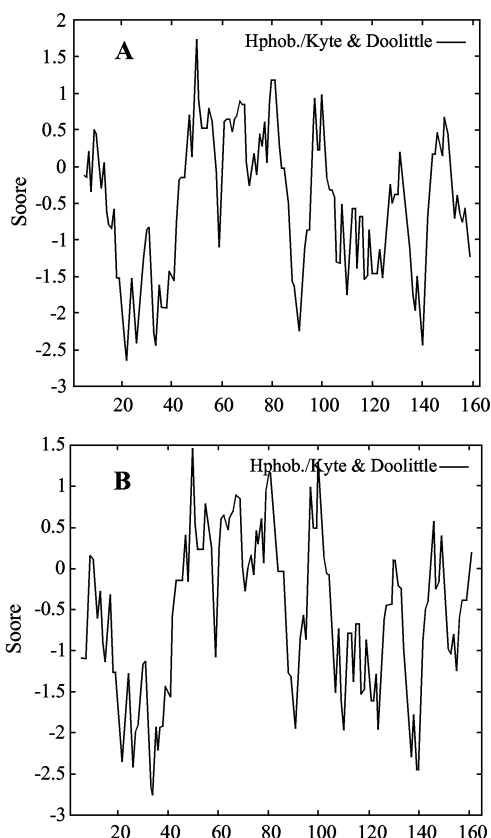


图6 丹参(A)、拟南芥(B) BTF3 氨基酸序列的疏水性/亲水性预测

Fig. 6 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity for BTF3 deduced amino acid from *S. miltiorrhiza* (A) and *A. thaliana* (B)

2.4 翻译后修饰的预测和分析

对氨基酸序列翻译后修饰的预测和分析可为认识蛋白质的亚细胞定位,推测蛋白功能提供帮助。用 NetPhos 2.0 Server 对丹参 BTF3 的翻译后修饰预测结果表明(表2),整个多肽链中分值在 0.5 以上的氨基酸位点有 7 个,依据分值大于 0.5 (threshold) 的氨基酸位点可能是磷酸化位点,可推测丹参 BTF3 的磷酸化位点有 7 个。对其他植物的分析与丹参的分析结果相类似。用 PSORT 对其基因编码产物进行转运肽的预测,表明该基因编码蛋白不具有 N 端信号肽以及线粒体或叶绿体转运肽。

表2 丹参 BTF3 氨基酸序列翻译后磷酸化修饰预测
(Ser:丝氨酸, Thr:苏氨酸)

Table 2 Predicted post-translational phosphorylation for BTF3 deduced amino acid from *S. miltiorrhiza*
(Ser: serine, Thr: threonine)

磷酸化作用位点 Phosphorylation site	12	20	32	33	34	81	132
氨基酸名称 Name of amino acid	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser

2.5 BTF3 二级结构的预测和分析

用 SOPMA 预测丹参 *BTF3* 氨基酸序列的二级结构的结果显示, α -螺旋(42.94%)和不规则卷曲(41.72%)是丹参 *BTF3* 的主要结构元件, β -折叠(11.66%)、 β -转角(3.68%)散布于整个蛋白质中。在马铃薯、烟草、番茄、百脉根、小果野蕉、拟南芥、水稻等 *BTF3* 编码蛋白二级结构预测中也有类似的结果。

2.6 丹参 *BTF3* 的实时定量 PCR 反应

以 *GAPDH* 基因为内参,进行丹参 *BTF3* 基因的定量分析,结果显示(图7),丹参 *BTF3* 基因在根中表达量最高,茎和叶中次之(图7:A);对丹参幼苗浇灌 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液后,其表达量仅在 6 h 略有升高,24 h 内没有显著的变化(图7:B);对丹参幼苗进行干旱处理,该基因的表达整体处于被抑制的状态,2 h 内逐渐恢复至对照水平(图7:C)。

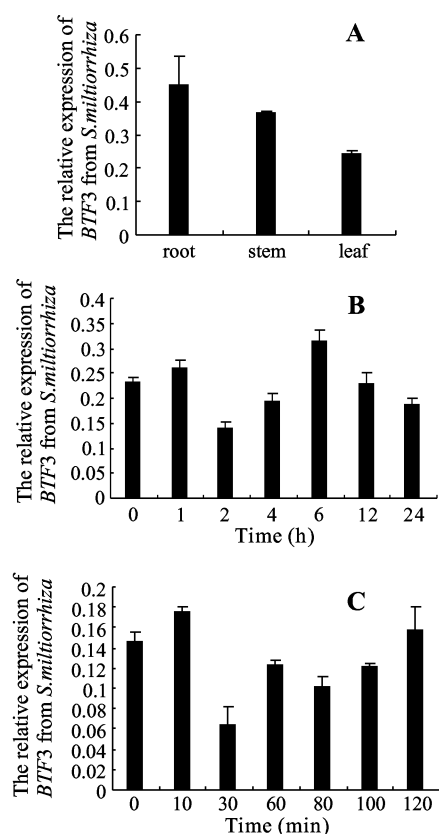


图7 丹参 *BTF3* 基因的表达分析
A: 丹参 *BTF3* 在根茎叶中的表达; B: ABA 诱导丹参 *BTF3* 不同时间后的表达; C: 干旱诱导丹参 *BTF3* 不同时间后的表达
A: Expression of *BTF3* in root, stem and leaf from *S. miltiorrhiza*; B: Expression of *BTF3* after induced by ABA from *S. miltiorrhiza*; C: Expression of *BTF3* after induced by drought from *S. miltiorrhiza*

图7 丹参 *BTF3* 基因的表达分析
Fig. 7 Expression of *BTF3* from *S. miltiorrhiza*

3 讨论

NAC 在植物细胞中的研究比较少,其功能也不十分清楚,然而目前在拟南芥、烟草等模式植物中已经报道了与动物 α 或 β NAC 相似性很高的基因, Freire 等证实了拟南芥中 AtBTF3 可以与翻译起始因子 eIF(iso)4E 相互作用,竞争性的抑制 eIF(iso)4F 复合物的生成,进而影响 mRNA 的起始翻译^[11]; Yang 等利用 RNA 干扰技术证实了 NbBTF3 的生理功能^[9]。本文运用 RT-PCR 的方法克隆了丹参 *BTF3* 基因全长,分析发现该基因长 1510 bp,包含 5 个外显子和 4 个内含子, cDNA 全长 794 bp,包含 492 bp 的开放读码框,编码 163 个氨基酸,丹参 *BTF3* 与其他植物或是动物无论在核酸水平还是在氨基酸水平上都有很高的相似性,这与进化树的分析结果相一致,说明 *BTF3* 在进化过程中相对比较保守,可能与其重要功能有关。亲水/疏水性分析表明整个多肽链前端和后端亲水,中间部位是疏水区域,预测其序列中存在 7 个磷酸化位点,并散布于多肽链中。PSORT 预测丹参 *BTF3* 不具有 N 端信号肽以及线粒体或叶绿体转运肽。多序列比对发现丹参 *BTF3* 同拟南芥、水稻等植物一样,都含有可能的核定位信号序列(RRKKK),而且 Yang 等也证明了烟草 *BTF3* 定位于细胞核中^[9],因此推测丹参 *BTF3* 也在细胞核内发挥作用。功能位点分析显示丹参 *BTF3* 与其他植物在功能活性位点上有高度的保守性(即含有 NAC 功能域),它参与构成了 NAC。SOPMA 分析发现丹参 *BTF3* 二级结构以 α -螺旋和不规则卷曲为主, β -折叠、 β -转角散布其中,与其他植物分析结果相一致。荧光定量分析显示该基因的表达量根 > 茎 > 叶,推测丹参 *BTF3* 基因主要在根中发挥作用,调控根中特异性基因的表达;对 ABA 诱导的响应不是十分的明显;干旱胁迫短时间内明显抑制了该基因的表达,2 h 内又逐渐恢复到了对照的水平,可见干旱诱导抑制该基因表达是暂时的,反馈调节机制促使该基因的表达恢复到了正常水平。

以往对 *BTF3* 的研究显示其具有多种生理功能,它在丹参中的生物学功能有待更深入的探究。本文的研究为 *BTF3* 的后续研究提供了一定的理论参考依据,同时也对深入了解结构与功能之间的相关性有一定的意义。

致谢:感谢本实验室宋婕、化文平博士在实验及论文修改过程中提出的宝贵意见。

参考文献:

- [1] Wiedmann B, Sakai H, Davis T A, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation[J]. *Nature*, 1994, 370: 434 – 440.
- [2] Luring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5411 – 5415.
- [3] Zheng X M, Moncollin V, Egly J M, Chambon P. A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II) [J]. *Cell*, 1987, 50: 361 – 368.
- [4] Zheng X M, Black D, Chambon P, Egly J M. Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3 [J]. *Nature*, 1990, 344: 556 – 559.
- [5] Hu G Z, Ronne H. Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 2740 – 2743.
- [6] Kusumawidjaja G, Kaye H, Giese N, Bauer A, Erkan M, Giese T, Hoheisel J D, Friess H, Kleeff J. Basic Transcription factor 3 (BTF3) regulates transcription of tumor-associated genes in pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6 (3): 367 – 376.
- [7] Brockstedt E, Otto A, Rickers A, Bommert K, Wittmann-Liebold B. Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line [J]. *J Protein Chem*, 1999, 18: 225 – 231.
- [8] Bloss T A, Witte E S, Rothman J H. Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2003, 424: 1066 – 1071.
- [9] Yang K S, Kim H S, Jin U H, Lee S S, Park J A, Lim Y P, Pai H S. Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants [J]. *Planta*, 2007, 225: 1459 – 1469.
- [10] 闫亚平. 基于 EST 技术的丹参大规模基因克隆及其外源基因转化技术研究 [D]. 西安: 陕西师范大学生命科学院, 2005.
- [11] Freire M A. Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex [J]. *Gene*, 2005, 31, 345 (2): 271 – 277.