

酵母单杂交系统分离胡萝卜生长素 应答元件结合因子*

齐眉^{①②} 黄美娟^② 陈凡^{①**}

(①中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080; ②北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 高等植物胚根发育过程中, 生长素是植物细胞进行分裂、延伸和分化的信号, 对根的形成等起着不可缺少的促进作用。生长素应答元件(AuxRE)存在于很多生长素诱导基因的启动子中, 并具有对生长素作用的应答活性。本研究构建了特定发育时期的胡萝卜体细胞胚cDNA-AD融合表达文库, 同时构建了含有生长素应答元件的重组报告质粒。以生长素应答元件为诱饵, 通过酵母单杂交系统筛选获得1个阳性克隆, 该阳性克隆在酵母中表达的AxRF1蛋白能够在体外结合实验中与生长素应答元件结合, 对AxRF1是否有可能参与胡萝卜体细胞胚中生长素诱导基因的表达调控进行了讨论。

关键词 生长素应答元件 转录调控 酵母单杂交系统

基因表达的程序、时间和部位是在不同层次上受不同的调控元件联合控制。生物体的正常发育和分化都是由于基因受控而有序表达的结果。现已知道, 基因表达的调节作用主要发生在转录水平, 转录因子通过同靶基因启动子或增强子区域中的顺式作用元件结合和相互作用, 成为调节靶基因转录效率的决定因素^[1]。

生长素是一类植物激素, 对植物的生长和发育具有重要的调节作用。生长素显著地影响细胞的膨胀、延伸、分裂和分化, 是植物形态建成的决定因素之一。对生长素诱导基因的启动子序列研究表明, 至少有4类早期生长素诱导基因(*PS-IAA4/5, GH3, SAUR, ACS*)的启动子区域内存在相似的顺式作用元件, 该元件中含有一段保守的核苷酸序列TGTCTC^[2]。有实验表明, 这段被称为生长素应答元件(Auxin response element, AuxRE)的寡核苷酸序列能够表现出显著的生长素诱导效应, 在该实验中, 将TGTCTC元件设计成反向重复, 并以串联四聚体的形式与*GUS*报告基因相连, 转化至胡萝卜原生质体中, 报告基因的本底表达水平很低。如果在实验系统中加入生长素, 报告基因的表达活性在短时间内就会迅速提高30倍以上^[3]。由于这种生长素应答元件在很多受生长素诱导的基因中非常保守, 而且它对生长素表现出如此显著的效应, 所以有理由推测在胡萝卜发育过程中可能存在特异的转录因子。该转录因子能够对生长素产生应答, 进而与生长素应答元件结合, 激活靶基因的表达。

黄美娟等人^[4]建立了胡萝卜体细胞胚胎发育调控体系, 为研究高等植物胚胎发育的分子控制提供了良好的条件。研究表明, 植物内源激素可能对胡萝卜胚胎发育进程起着重要的调

2001-04-08 收稿, 2001-09-24 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30000014)和国家蛋白质与植物基因工程重点开放实验室资助项目

** 联系人, E-mail: fchen@genetics.idb.ac.cn

控作用^[5,6]。酵母单杂交系统是近年发展起来用于分离能结合顺式作用调节元件的蛋白基因的体内分析系统^[7]。目前，国外采用单杂交系统从植物材料中已经分离得到了 ARF-1^[3], DPBF-1, 2^[8], DREB-1, 2^[9], ABF^[10]等转录因子，国内也在进行相应的尝试^[11]。本研究成功地构建了胡萝卜体细胞胚 cDNA-AD 融合表达文库，以生长素应答元件为诱饵，利用酵母单杂交系统分离得到一个全长 cDNA 片段，该片段在酵母中表达的 AxRF1 蛋白能够在体外结合实验中与生长素应答元件结合。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 化学制剂和酶制剂：MATCHMAKER One Hybrid System, Yeast Transformation System 购自 Clontech 公司。HybriZAP-2.1 XR Library Construction Kit 购自 Stratagene 公司。Quick-PrepTM Micro mRNA Purification Kit, Sepharose CL-4B 柱购自 Amersham Pharmacia 公司。限制性内切酶和基因工程用工具酶购自 Promega 公司和华美公司。其他试剂均为国产分析纯。

(2) 材料、酵母菌株和质粒：胡萝卜(*Daucus carota L. var. Sativa DC.*)选用日本的国分大长人参品种。胡萝卜体细胞胚的制备按照文献[4]的方法进行。以解调控 48 h 的胡萝卜体细胞胚为材料，构建 cDNA-AD 融合 λ 噬菌体文库。实验中使用的酵母菌株为 YM4271(MATA, *ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, I12, trp1-901, tyr1-501, gal4-D512, gal80-D538, ade5::hisG*)。pHISi 和 pLacZi 为 Clontech 公司报告质粒载体，分别以 *HIS3* 和 *URA3* 为筛选标记。

(3) 寡核苷酸链的合成：两条寡核苷酸链(各 26 个核苷酸)由赛百盛公司合成，即 5'-agt-AAGG[GAGACA]ACT[TGTCTCCCA-3' 和 3'-TTCC[CTCTGT]TGA[ACAGAGGGTtcga-5'，其中大写字母示含有一个回文结构的 AuxRE 保守序列(图框内序列)，小写字母示附加的位点。

1.2 实验方法

(1) 含有 AuxRE 靶 DNA 报告质粒的构建：两条寡核苷酸链在 70℃ 处理 5 min 后缓慢冷至室温，退火形成双链 DNA 分子。利用 T₄ 多聚核苷酸激酶和 ATP 对双链 DNA 分子粘性末端进行加磷反应，通过 T₄ DNA 连接酶完成双链 DNA 分子的多聚体连接反应。进行 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，分离和回收四聚体连接产物。将 pBluescript II SK⁺ 质粒载体通过 *Hind* III 限制性内切酶完成线性化，并对线性化载体进行去磷酸化反应，然后和 AuxRE 四聚体片段连接形成 pBSII-AuxRE4。通过测序鉴定证明，四聚体 AuxRE 已经成功地插入在 pBluescript II (SK⁺) 的 *Hind* III 位点上。采用 *Eco*R I 和 *Bss*H II 限制性内切酶将 AuxRE 四聚体目的片段从 pBSII-AuxRE4 上切下，克隆至已用 *Eco*R I / *Mlu* I 双酶消化的 pHISi 载体上。采用 *Eco*R I / *Sal* I 切下 AuxRE 四聚体目的片段，克隆至已用相同双酶消化的 pLacZi 载体上，由此构建形成重组报告质粒 pHISi-AuxRE4 和 pLacZi-AuxRE4。

(2) 酵母质粒转化和筛选：酿酒酵母的转化采用乙酸锂法^[12]。将 pHISi 的重组报告质粒转化至酵母菌株中，转化产物涂布于 SD/-His 营养缺陷型培养基上筛选阳性克隆。同法转化 pLacZi 重组报告质粒，用 SD/-Ura 筛选培养基筛选阳性克隆。

(3) 报告基因的本底表达活性检测：参照 Clontech 公司提供的用户手册，利用 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole)的竞争性实验和 β-半乳糖苷酶显色反应分别对含有 pHISi 和 pLacZi 的重组报告质粒菌株进行本底表达活性检测，证明其均可用于酵母单杂交系统的筛选。

(4) HybriZAP-2.1 λ 噬菌体 cDNA 文库的构建: 选用多个公司的产品, 经改进后完成 λ 噬菌体 cDNA 文库的构建。采用 QuickPrepTM Micro mRNA 纯化试剂盒(Amersham Pharmacia), 并参照其使用说明分离实验材料的 mRNA。以 mRNA 为模板, 含有 *Xho* I 位点的 Oligo(dT)——衔接子为逆转录引物, 利用逆转录酶和 dNTP 来合成 cDNA 第 1 链。在 4 种 dNTP 中, dCTP 被 5-甲基 dCTP 取代, 这样合成的 cDNA 第 1 链被甲基化了, 可保证其不被后续步骤中的内切酶(如 *Xho* I)消化。在完成 cDNA 第 2 链合成后, 在 cDNA 末端连接上 *Eco*R I 接头, 然后进行 *Xho* I 限制性内切酶消化, 从而形成两端带有不同粘性末端的双链 cDNA。采用 Sepharose CL-4B(Amersham Pharmacia)柱除去分子量小于 400 bp 的片段和 DNA 接头。选用 Stratagene 公司生产的已进行 *Eco*R I / *Xho* I 预消化的 HybriZAP-2.1 λ 噬菌体载体为文库构建载体, 将纯化后的 cDNA 与载体进行连接和体外包装, 形成 HybriZAP-2.1 λ 噬菌体 cDNA 文库。

(5) 噬菌体 cDNA 文库的体外删除及筛选: 参照 Stratagene 公司提供的用户手册, 对 HybriZAP-2.1 λ 噬菌体 cDNA 文库进行体内删除, 转变形成 pAD-GAL4-2.1 噬菌粒 cDNA 文库。按照碱法提取噬菌粒 DNA, 并转化含重组报告质粒的酵母菌株。参照 Clontech 公司提供的用户手册进行酵母单杂交系统的筛选。

(6) AuxRE 的体外结合与凝胶阻滞实验: 参照 Kim 等人^[13]的方法, 以同位素标记 DNA 分子, 在体外进行与蛋白质的结合反应, 然后进行凝胶阻滞实验, 以获取 DNA 与蛋白质发生结合的证据。

2 结果

2.1 pHISi-AuxRE4 和 pLacZi-AuxRE4 质粒的构建和鉴定

许多研究发现, 与调控蛋白相结合的受体 DNA 元件常常是一个天然存在的回文结构, 因此生长素应答元件的保守序列 TGTCTC 被设计为 GAGACAnnnTGTCTC 的回文结构, 并在体外进行重组, 形成多聚体形式(图 1)。选用长度在 100 bp 左右的 AuxRE 四聚体作为酵母单杂交系统中的诱饵, 可保证生长素应答元件能够通过 4 个串联的反向重复来完成于之相结合的蛋白因子的筛选。

pHISi 是由 Clontech 公司为单杂交系统设计的一种能够整合到酵母基因组中的报告质粒载体, 含有 *HIS3* 微型启动子(minimal promoter, *p*_{minHIS})。当 pHISi 重组报告质粒中的顺式元件和反式调控因子结合时, 由于酵母 GAL4 转录激活子可以启动相应报告基因的转录, 在 *p*_{minHIS} 作用下, *HIS3* 基因得以组成性表达, 使得不能在组氨酸缺陷选择培养基上生长的酵母菌株(His⁻)得以生长。pLacZi 也是由 Clontech 公司为单杂交系统设计的重组报告质粒载体, 只是启动子和报告基因分别为 *p*_{cycl} 和 *lacZ*。当报告基因 *lacZ* 被激活时, 其表达产物 β -半乳糖苷酶可以使生色底物 X-gal 变蓝, 从而达到筛选的目的。

选择合适的限制性内切酶位点进行酶切和重组连接, 将四聚体 AuxRE 片段分别亚克隆到报告质粒 pHISi 和 pLacZi 上, 得到重组报告质粒 pHISi-AuxRE4 和 pLacZi-AuxRE4。将重组

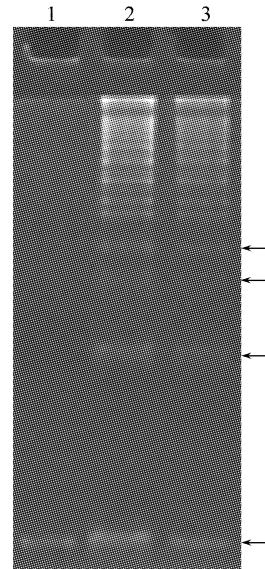


图 1 AuxRE 的分子间连接

1 示单体 AuxRE; 2 和 3 示连接混合物。箭头所指南至上分别为一至四聚体 AuxRE

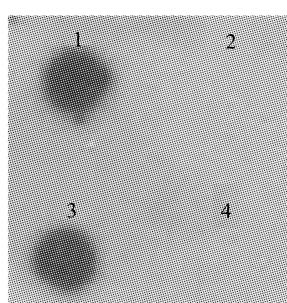


图 2 重组质粒 pHISi-AuxRE4, pLacZi-AuxRE4 点杂交鉴定
1 示 pHISi-AuxRE4; 2 示 pHISi 质粒对照;
3 示 pLacZi-AuxRE4; 4 示 pLacZi 质粒对照. 每种质粒点样量均为 20 ng

mmol/L 3-AT 培养皿上只长出 10 余个克隆;而在 SD/-His + 45 mmol/L 3-AT 培养皿上,没有酵母克隆长出,说明 *HIS3* 的本底表达活性是低的.

同法转化 pLacZi-AuxRE4 质粒,用 SD/-Ura 培养基筛选获得 YM4271(pLacZi-AuxRE4)菌株. 利用 β -半乳糖苷酶显色反应对 YM4271(pLacZi-AuxRE4)菌株进行本底表达活性检测,结果显示,含有 pLacZi-AuxRE4 质粒的酵母克隆在显色过夜后仍没有变蓝,说明 lacZ 的本底表达活性是低的.

实验证明两种重组报告质粒均可用于酵母单杂交系统的筛选. 将 pHISi-AuxRE4 质粒转化 YM4271(pLacZi-AuxRE4)菌株,采用 SD/-His 固体培养基来筛选阳性克隆,由此获得带有诱饵报告质粒的酵母菌株,并将其命名为 YM4271(pHISi-AuxRE4 + pLacZi-AuxRE4).

2.3 胡萝卜 cDNA 表达文库的构建和酵母单杂交系统筛选

特有的胡萝卜体细胞胚胎发育调控体系可以为高等植物胚胎发育的研究提供各个时期的实验材料. 形态学观察显示,解调控 48 h 的体细胞胚已经开始胚后发育,表现为胚根迅速延伸,胚体开始膨胀,子叶逐渐变绿. 据文献报道^[14],分裂迅速、代谢旺盛的组织中生长素的活性较高,于是我们选用解调控 48 h 的体细胞胚为材料来构建 cDNA 表达文库.

按照改进的方法,以 HybriZAP-2.1 λ 噬菌体为载体成功构建了胡萝卜 cDNA 表达文库. 表达文库的滴度为 1.2×10^6 pfu/mL. 随机挑选克隆,对文库插入片段大小进行鉴定表明,插入片段长度在 400 bp 到 2.3 kb 之间,证明该 cDNA 文库的质量完全达到了要求.

分取约 4×10^5 pfu 噬菌体文库,通过体内删除作用将其转变成 pAD-GAL4-2.1 噬菌粒文库. 提取噬菌粒 DNA,转化到酵母菌株 YM4271(pHISi-AuxRE4 + pLacZi-AuxRE4)中. 取少量转化混合物涂布于 SD/-Leu 固体培养基上以鉴定转化效率,余下的转化混合物涂布于 SD/-Leu/-His/ + 45 mmol/L 3AT 培养基上筛选阳性克隆. 在约 3×10^6 个转化子中,共有约 300 个直径大于 1.5 mm 的克隆能够在选择培养基上生长. 对这些克隆进行 β -半乳糖苷酶显色反应,其中有 15 个克隆呈阳性反应. 从酵母阳性克隆中提取噬菌粒 DNA,并重新转化回酵母 YM4271(pHISi-AuxRE4 + pLacZi-AuxRE4)中,采用 SD/-Leu/-His/ + 45 mmol/L 3-AT 培养基和 β -半乳糖苷酶显色反应进行进一步鉴定. 结果显示,这 15 个克隆的中,共有 11 个克隆在显色反应中仍呈现阳性.

质粒 pHISi-AuxRE4, pLacZi-AuxRE4 以及对照质粒 pHISi, pLacZi 分别点于杂交膜上,用放射性同位素 32 P 标记单体 AuxRE 作为探针,对重组质粒进行点杂交鉴定. 结果显示,重组质粒处显示出清楚的杂交信号,而对照质粒处无杂交信号(图 2),说明目的片段已经成功地插入报告质粒中.

2.2 获得带有诱饵报告质粒的酵母菌株

采用乙酸锂法,将质粒 pHISi-AuxRE4 转化至酵母菌株 YM4271 中,转化产物涂布于 SD/-His 营养缺陷型培养基上来筛选阳性克隆. 将获得的新酵母菌株命名为 YM4271(pHISi-AuxRE4). 利用 3-AT 竞争性实验对 YM4271(pHISi-AuxRE4) 进行本底表达活性检测,结果显示,在 SD/-His + 0 mmol/L 3-AT 培养皿上,酵母生长良好(数百个克隆);在 SD/-His + 15

2.4 阳性克隆插入序列编码产物与 AuxRE 的体外结合效应

提取含有重组噬菌粒的阳性酵母克隆的总蛋白, 将 AuxRE 四聚体进行放射性同位素³²P 标记作为探针, 与蛋白提取物进行体外结合反应, 然后通过凝胶阻滞实验进一步验证阳性克隆插入序列编码蛋白质是否能够与 AuxRE 序列相结合, 结果发现一个阳性克隆的酵母蛋白提取物能够与标记 AuxRE 产生结合(图 3), 在凝胶阻滞实验中形成滞后的条带, 该克隆中所带有的 cDNA 片段被命名为 AxRF1。

2.5 编码 AxRF1 蛋白的核苷酸序列和推导的蛋白功能域分析

从表达 AxRF1 蛋白的阳性酵母克隆中分离得到噬菌粒 DNA, 并对 cDNA 插入序列进行核苷酸序列测定, 结果显示编码 AxRF1 蛋白的 cDNA 插入片段为 1413 bp, 根据核苷酸序列推导认为 AxRF1 蛋白由 383 个氨基酸组成(图 4)。

将推导的 AxRF1 蛋白的氨基酸序列通过 BLAST 软件同 GenBank/EMBL/DDBJ 核酸蛋白数据库进行了序列比较, 发现 AxRF1 与欧芹(*Petroselinum crispum*)中真菌激活子诱导基因 *ELI*(elicitor induced gene)家族具有 80% 以上的同源性。该基因家族的转录激活和表达多由病原体感染和诱导产生, 同时在植物体中表现出与环境胁迫和刺激引起的分子调控有关, 因此认为该基因家族参与植物体自身防御途径的信号转导^[15]。

通过国际互联网络对 AxRF1 蛋白的氨基酸序列进行基序分析, 发现 AxRF1 中含有脂肪酸去饱和酶以及 G 蛋白结合受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)的基序, 其中 G 蛋白, 即鸟嘌呤核酸结合蛋白, 是一类通过配体激活而介导信号转导的蛋白质^[16]。研究认为, GPCR 参与由环境变化产生的植物应答信号转导, 其中包括赤霉素和生长素等植物激素所引发的信号途径, 由此推测 AxRF1 可能通过与核酸相结合而参与胡萝卜胚根发育过程中的基因表达调控。

3 讨论

基因表达调控对于植物生长、发育、分化、代谢调节等一系列重要过程是不可缺少的。转录是基因表达调控的中心环节, 由众多介导胞内和胞外信号的转录因子控制, 所以转录因子的研究不仅对基因表达机制的了解, 而且对于植物科学的各个领域都是十分重要的^[11]。酵母单杂交系统与其他分离转录因子方法相比, 具备一定的优越性: (i) 利用单杂交筛选的是能够特异识别顺式作用元件的 DNA 结合蛋白, 而这类蛋白质可能就是转录因子。与突变体分析和差别筛选相比, 其目的性明确。(ii) 酵母单杂交系统是一种利用酵母细胞来进行的体内遗传分析系统, DNA 和蛋白质的相互作用发生在体内, 与 Southwestern 相比, 它解决了体外和体内的环境差异, 保证了 DNA-蛋白质相互作用的进行和功能的实现。(iii) 通过单杂交系统可以直

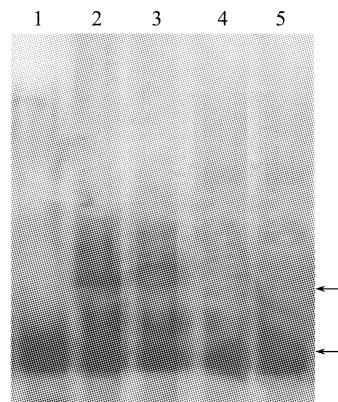


图 3 AxRF1 蛋白与 AuxRE 的体外结合效应

1 示标记 AuxRE; 2 示标记 AuxRE + 含有 AxRF1 蛋白的酵母蛋白提取物; 3 示标记 AuxRE+含有 AxRF1 蛋白的酵母蛋白提取物 +20 倍非标记 AuxRE; 4 示标记 AuxRE + 含有 AxRF1 蛋白的酵母蛋白提取物 +200 倍非标记 AuxRE; 5 示标记 AuxRE+含有 pAD-GAL4-2.1 噬菌粒的酵母蛋白提取物。箭头所指出下至上分别为自由 DNA 和结合 DNA

接分离 DNA 结合蛋白的基因，与亲和层析纯化特定蛋白质、再克隆其编码基因相比，步骤更为简捷。(iv) 通过单杂交系统筛选获得的蛋白质，可以从它与诱饵 DNA 的相互作用入手分析该蛋白质的功能，使基因分离后的功能鉴定不再难以进行。

当然，酵母单杂交系统也存在自身弱点：(i) 酵母是一种低等真核生物，缺乏一些高等生物特有的修饰过程。在酵母中能够发生的 DNA-蛋白质相互作用，能否在植物的细胞核内同样发生？目前已经发展出了一些哺乳动物单杂交系统，但是尚未见植物体系中相关系统的报道。(ii) 酵母单杂交系统由于其特定的筛选方式和本底表达的存在，使得假阳性无法避免，必须通过进一步的实验来验证。(iii) 通过单杂交系统筛选得到的蛋白质是否对含有顺式作用元件的基因表达产生影响，还需要进行相应的功能鉴定，而目前对于非突变体的方法分离得到的高等植物基因进行功能鉴定还是一个难题。

酵母单杂交系统是分离转录因子的有效手段，目前国外利用此技术已成功分离获得数个转录因子，国内也在进行相应的尝试，但尚未完整地建立该项技术。本研究意在建立自己的酵母单杂交系统，并用以分离参与调控生长素应答基因表达的转录因子。我们成功地构建了胡萝卜体细胞胚 cDNA-AD 融合表达文库，并利用酵母单杂交系统分离得到了与生长素应答元件相结合的 AxRF1 蛋白，经过序列和结构域分析，推测 AxRF1 可能通过与核酸相结合而参与胡萝卜胚根发育过程中的基因表达调控。至于 AxRF1 是否参与调控生长素应答基因的表达，尚需通过转基因分析来获得证实。

```

1   GTTCTAAGGAAATACAGAGCAACTCAACTAAACACACAACAAAAACCAAGAGTGAGGG
61  ACAATGGGTGCAGGTGGCGAATGTCGGATCCTCCATCAGCCAAAAAAACTGAAACAGAA
1      M G A G G R M S D P P T A K K T E T E
121 GCACCTCGACCGCGCTCCTCATGAGAAACCTCCTTTACCATTGGTGACCTCAAGAAAGCC
20  A L R R A P H E K P P F T I G D L K K A
181 ATTCCTGCCCATTGCTTGAAAATCACTCATAACTCTTTCGTTACCTCATTCAAGAT
40  I P A H C F E K S L I T S F R Y L I Q D
241 CTCCTCATGGCCTATGCCCTCTACTTTGTTGCTACTAATTACATTGACCAGTATCTCCCC
60  L L M A Y A L Y F V A T N Y I D Q Y L P
301 CATCCAATCAACTACTTGGGTGGGCAGTTACATTGCTGTTCAAGGTTGTCTGACG
80  H P I N Y L G W A V Y I A V Q G C V L T
361 GGAGCTTGGTTGTAGGCCATGAATGTGATCATGACGCCCTTAGCGATTATGGTTGGGTG
100 G A W V V G H E C D H D A F S D Y G W V
421 AACGACCTTGTGGCCTTATTGTCCACTCTCTCATGGTCCCTTATTCTCTGGAAA
120 N D L V G L I V H S S L M V P Y F S W K
481 ATTAGCCACAGACGTCAACGCCAACACCCAGTCGCTTGAGAATGATGAAGTTATGTT
140 I S H R R H H A N T Q S L E N D E V Y V
541 CCCAGATTCAAGTCCAACATCAGGAACACTACACAAATTCTCAACAACCCACCCGGTCGT
160 P R F K S N I R N Y Y K I L N N P P G R

```

601 GTACTTGTCTGGGTTACCACTTCTCATAGGTTCCCTTATTTGATGTTAATGTT
 180 V L V W V T T L L I G F P L Y L M F N V
 661 TCTGGACACAAGTATGAGAGGTGGACTTCCCACTATGATCCCCATAGCCCACTTACACA
 200 S G H K Y E R W T S H Y D P H S P L Y T
 721 GAACGTGAGCGCAAGCAGATCATTGTGTCGATCTGCCATTCTGCTGTTATCTATGGG
 220 E R E R K Q I I V S D L A I L A V I Y G
 781 CTGTACAATCTAGTATTAGCAAAGGATTGTCGTTCTGTGTTATGGAGGTCCA
 240 L Y N L V L A K G F V W V F C V Y G G P
 841 CTGCTCGTTGTCACCGATGGTCACATTGATCACCATCCTCAACCATACTCATCCTCT
 260 L L V V N G W F T L I T I L N H T H P S
 901 GTGCCCTACTACGATTCACTGAATGGACTGGTGGAGGCTCTATGACTGTTGAC
 280 V P Y Y D S T E W D W L R G A L C T V D
 961 AGAGACTATGGAATATTGAAACAAGGTGTTCCACAATGTCGCAATGCTCATGTCAC
 300 R D Y G I L N K V F H N V C N A H V C H
 1021 CACATTTCTCCATGATCCCACATTACACGGACTTGAAAGCCACAGAGGCCATGAAGCCT
 320 H I F S M I P H Y H G L E A T E A M K P
 1081 GTATTGGGTGATTATTATCAGTATGATGGAACCTCCTATTCTTAAGGCAATGTACAGAGAA
 340 V L G D Y Y Q Y D G T P I L K A M Y R E
 1141 ATGAAGGAATGCATTACGTGGAGAAGGATGAAGCGAGACCAAAGGAGTCTACTGGTAC
 360 M K E C I Y V E K D E G E T K G V Y W Y
 1201 AGAAAGGATATTAGCTCATGTTAGAGATTACCTGATTTAATTCTTCACTTATT
 380 R K D I *
 1261 CTGCATTGTCTTGTATTCTTAGTAACCTTAGATTGTCATAATGTGATGTTGACAAAT
 1321 AAGGATAAGAAGTTGAAAACAAATTCAATGCAATACAGAGAATTTCAGAAAAAAA
 1381 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图4 胡萝卜AxRF1蛋白的cDNA核苷酸序列及其推导的氨基酸序列
下划线示G蛋白结合受体(GPCR)的基序

参 考 文 献

- 吴乃虎, 刁丰秋. 植物转录因子与发育调控. 科学通报, 1998, 43(20): 2133~2138
- Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, et al. How does auxin turn on genes? Plant Physiol, 1998, 118: 341~347
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. Science, 1997, 276: 1865~1868
- 黄美娟, 黄绍兴, 苏都莫日根, 等. 采用调控培养方法提供胡萝卜体细胞胚活力的研究. 科学通报, 1993, 38(6): 550~553
- 程玉兰, 刁丰秋, 吴乃虎, 等. 蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞胚内源ABA水平的效应. 植物学报, 1999, 41: 761~765
- 齐眉, 陈凡, 黄美娟, 等. 胡萝卜*lea*基因cDNA片段的克隆及其表达特性分析. 科学通报, 1999, 44(18): 1959~1963
- Kumar R, Chen S, Scheurer D, et al. The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. J Biol Chem, 1996, 271: 29612~29618
- Kim S Y, Chung H J, Thomas T L. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive

- and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J*, 1997, 11: 1237~1251
- 9 Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391~1406
- 10 Choi H, Hong J, Ha J, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, 2000, 275: 1723~1730
- 11 姚泉洪, 邢彦彦, 王宗阳, 等. 以酵母单杂交体系克隆水稻 RAPB 基因 cDNA 及其序列测定. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(4): 389~396
- 12 Gietz D, St Jean A, Woods R A, et al. Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 1425
- 13 Kim S Y, Wu R. Multiple protein factors bind to a rice glutelin promoter region. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6845~6852
- 14 Bandurski R S, Cohen J D, Slovin J P, et al. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies P J, ed. *Plant Hormones*. Dordrechcht: Kluwer, 1995. 39~65
- 15 Kirsch C, Takamiya-Wik M, Schmelzer E, et al. A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley ELI7 gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *J Mol Plant Pathol*, 2000, 1: 243~251
- 16 Attwood T K, Findlay J B C. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering*, 1994, 7: 195~203