

植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件的研究方法

郑晓瑜¹, 郭晋艳¹, 张毅², 李秋莉^{1,*}

¹ 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029; ² 大连市育明高级中学, 辽宁大连 116023

摘要: 非生物胁迫严重影响植物生长发育, 降低作物产量。植物通过各种途径忍受或抵抗非生物胁迫, 主要表现是各种抗非生物胁迫基因的表达。基因表达受其上游启动子及转录因子的调控, 目前对抗非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件及转录因子的研究成为热点。本文综述了植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件及转录因子的研究方法, 并展望了顺式作用元件及转录因子研究的方向及前景。

关键词: 非生物胁迫; 启动子; 顺式作用元件; 转录因子

Research Methods of *cis*-Acting Elements in Plant Abiotic Stress Inducible Promoters

ZHENG Xiao-Yu¹, GUO Jin-Yan¹, ZHANG Yi², LI Qiu-Li^{1,*}

¹College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China; ²Dalian Yuming Senior High School, Dalian, Liaoning 116023, China

Abstract: Abiotic stress seriously affects plant growth and development, reduces crop yields. Plants endure or resist abiotic stress via many ways, mainly by expressing abiotic stress-induced genes. Gene expression is regulated by upstream promoter and transcription factors. Abiotic stress-induced promoter *cis*-acting element and transcription factors become one focus of study now. This paper reviews the research methods of plant abiotic stress inducible promoter *cis*-acting elements and transcription factors and looks into their prospect.

Key words: abiotic stress; promoter; *cis*-acting elements; transcription factors

植物非生物胁迫是指对植物施加有害的环境因子, 主要有高盐、干旱、低温等。非生物胁迫会影响植物生长发育, 严重降低作物产量。植物为了生存, 在遭遇非生物胁迫时, 必须通过形态及生理生化代谢等方面的调整, 以适应或忍耐环境胁迫。近年来的研究表明, 许多植物基因的表达都受逆境胁迫的诱导, 抗逆基因的表达又是依靠其上游启动子的调控来实现的。启动子是起始基因转录的一段 DNA 序列, 是基因表达调控的关键点。启动子中存在着很多顺式元件, 可分为以下 4 种类型: (1) 核心启动子成分, 如 TATA 框; (2) 上游启动子成分, 如 CAAT 框、GC 框、ATF 结合位点; (3) 远端上游元件: 如增强子、沉默子等; (4) 特殊启动子成分, 该成分为不同的转录因子识别和结合来调节转录。其中特殊启动子成分在植物非生物胁迫诱导基因的表达中起主要作用。

目前有关植物调控逆境胁迫的研究重点逐渐从功能基因转到顺式作用元件的鉴定、功能分析及转录因子的分离等方面。精确定位关键功能区和调控区对研究启动子的调控很重要, 因为不同基因启动子间有很大的变异性, 启动活性大小也有差

别。研究顺式作用元件及转录因子既可以从分子水平探讨胁迫诱导基因表达的机制, 又可以为利用启动子进行作物遗传改良提供新的策略。

研究启动子顺式作用元件及转录因子通常是先确定启动子的功能区段, 然后分析功能区段中的功能元件, 最后分离与功能元件相互作用的转录因子。常采用的方法有: 生物信息学分析与预测、突变分析法、凝胶阻滞分析法、DNA 足迹分析法、酵母单杂交法等(图 1)。这几种方法并不是单独存在的, 而是根据具体研究中的不同需要, 有选择地交叉使用。本文介绍顺式作用元件及转录因子的研究方法及其在植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件研究中的应用。

1 生物信息学分析与预测

生物信息学分析与预测是目前研究启动子最常用的方法。获得启动子序列后, 首先通过生物信息学方法对启动子序列进行初步的预测和分析, 分

收稿 2010-10-12 修定 2010-11-08

资助 国家自然科学基金(30871389)和辽宁省教育厅重点实验室项目(LS2010093)。

* 通讯作者(E-mail: skyliquli@163.com; Tel: 0411-84258681)。

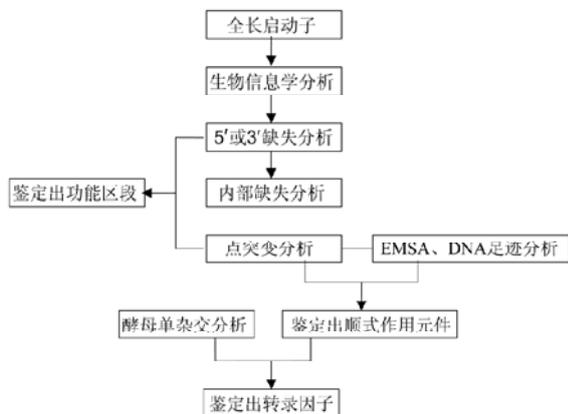


图1 顺式作用元件及转录因子研究流程图

Fig.1 Research flowchart of *cis*-acting elements and transcription factors

析序列中含有的可能的相关顺式作用元件。目前常用的植物启动子预测相关数据库和软件资源有下面5个。(1) EPD (eukaryotic promoter database): 真核生物启动子数据库,这是目前惟一一个源自实验数据的真核生物启动子数据库,该库现有1500多个启动子序列数据,是常用的预测软件测评的手段之一;(2) TRRD (transcription regulatory regions database): 转录调控区域数据库,是在不断积累的真核生物基因调控区结构与功能特性信息基础上构建的,其数据均来源于已发表的科学论文,包含特定基因各种结构与功能特性,包括转录因子的结合位点,启动子、增强子、沉默子的位置,以及基因表达调控模式等;(3) TRANSFAC (transcriptional regulation from patterns to profiles): 转录因子数据库,这是一个真核顺式作用元件和反式作用因子的数据库,数据搜集的对象包括从酵母到人类,该库由SITE、GENE、FACTOR、CLASS、MATRIX、CELLS、METHOD和REFERENCE等数据表构成;(4) PLACE (plant *cis*-acting regulatory DNA

elements): 植物DNA顺式作用调控元件数据库,只包括维管植物的信息,其他与植物顺式作用元件同源的非植物模体也同时被收录,并且所收录信息根据实验最新进展随时得到更新;(5) PlantCARE (plant *cis*-acting regulatory elements): 植物顺式作用调控元件数据库,该数据库收录了植物顺式作用元件、增强子和抑制子,并提供调控元件的位置、一致序列和在特异启动子序列上的独立位点等信息。各数据库网址见表1。

杨英军和周鹏(2005)采用PCR技术从番木瓜(*Carica papaya*)基因组中克隆了proteinase omega基因的部分序列及其5'侧翼序列,用PlantCARE软件对其进行分析发现,在翻译起始密码子上游存在着多个可能的TATA-box和CAAT-box;利用Berkeley Drosophila Genome Project软件进一步对该5'上游远端调控序列分析发现,其存在多个G-box、I-box和AT1模序等光响应元件,另外还发现许多明显的逆境应答调控元件ERE、ABRE、HSE等。Zhang等(2008)利用PLACE和PlantCARE软件对已获得的辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)BADH基因启动子序列(1993 bp)进行分析,发现该序列具有启动子的基本组成元件TATA-box、CAAT-box,且包含多个胁迫诱导元件,如3个盐诱导元件GT-1模序(GAAAAA),6个缺水、抗脱落酸、抗冻、抗寒元件MYC识别位点(CANNTG),9个伤害诱导元件WUN-motifs (ANATTNCNN),11个热激元件HSE (ATAAATGT)等。

2 突变分析法

突变分析法是鉴定顺式作用元件最可靠的方法,多数突变分析包括缺失突变和取代突变,此方法能分析各种类型的调控区域中的顺式作用元件。首先通过缺失突变分析确定功能启动子的调控区边界,然后通过一系列的6~10 bp的取代突变扫描此

表1 植物启动子预测相关数据库和软件资源

Table 1 Databases and softwares of plant promoter predicting

名称	网址	参考文献
EPD	http://www.epd.isb-sib.ch	Christoph 等 2004
TRRD	http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/trrd	Kolchanov 等 2002
TRANSFAC	http://www.gene-regulation.com	Matys 等 2003
PLACE	http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE	Higo 等 1999
PlantCARE	http://www.plantcare.com	Stephane 等 1999

调控区的重要顺式作用元件,最后对每个元件进行更为精确的点突变,以此来确定每个元件的边界和分析每个元件是否代表某一结合蛋白的结合位点或多种蛋白的共同作用位点(Carey 和 Stephen 2001)。突变分析法包括 5' 端缺失法、3' 端缺失法、内部缺失法和点突变法。

2.1 5' 端缺失法

5' 端缺失分析是用于确认启动子功能区段的一种常用的有效方法。这种方法是通过核酸外切酶、限制性内切酶酶切或 PCR 扩增,把已知的启动子缺失成 5' 端不同长度的片段,然后将这些缺失片段与报告基因连接,构建融合表达载体,转化受体后,通过测定报告基因的瞬时表达或稳定表达来确定启动子的不同缺失片段的功能(图 2)。

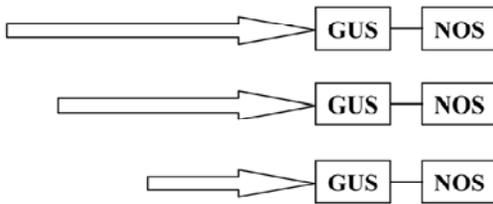


图 2 5' 端缺失法原理图

Fig.2 Diagram of 5'-flanking region deletion

GUS: β -glucuronidase, β -葡萄糖苷酸酶; NOS: nopaline synthase, 胭脂碱合成酶。

Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki (1994)分析拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *rd29A* 基因启动子,通过 5' 端缺失分析发现一个 162 bp (-274~-113 bp) 的区域含有脱水响应序列。Nazmul 等(2007)对所分离的 1.6 kb 苋属植物 *Amaranthus tricolor* 的 *CMO* 基因(*AmCMO*)上游启动子片段进行 5' 端缺失分析,发现翻译起始点上游 410 bp 片断中含有盐胁迫响应元件,该区段可以作为盐诱导启动子。Zhang 等(2008)分析盐生植物辽宁碱蓬 *BADH* 基因启动子盐诱导表达功能区段,通过 5' 端缺失构建植物表达载体、转化烟草等一系列实验发现, -300~+62 bp 启动子区段具有启动子活性,是一个强的盐诱导表达启动子。Chen 等(2009)分离了大豆(*Glycine max*)的 *GmDREB3* 启动子,进行 5' 端缺失分析发现,该启动子 -1 058~-644 bp 区段含有低温响应序列。Sun 等(2010)在研究盐芥(*Thellungiella halophila*)的 *TsVPI* 基因启动子时,采用 5' 端缺失法分析,发现

一个 856 bp (-2 200~-1 344 bp) 的区域中含有增强子,当缺失该区域时, GUS 报告基因的活性明显降低,该区域能够提高 *TsVPI* 基因表达水平。进一步的 5' 端缺失法分析,确定了一个 130 bp (-667~-538 bp) 的区域为盐胁迫响应的关键序列。

2.2 3' 端缺失法

3' 端缺失法也是用于确认启动子功能区段的一种有效方法,该方法的应用没有 5' 端缺失法那样普遍。同 5' 端缺失法相类似,该方法也是通过核酸外切酶、限制性内切酶酶切或 PCR 扩增,把已知的启动子缺失成 3' 端不同长度的片段,通过驱动报告基因的表达来确定不同缺失片段的功能(图 3)。

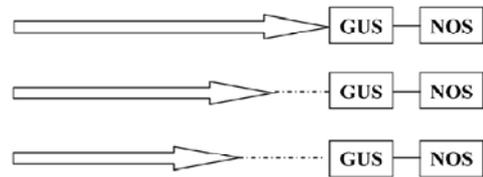


图 3 3' 端缺失法原理图

Fig.3 Diagram of 3'-flanking region deletion

Yin 等(2009)分离了西瓜(*Citrullus vulgaris*)叶片 1.8 kb 的 *AGPL1* 启动子,利用 3' 端缺失法对其进行分析发现,位于启动子下游 UTR 区的 323 bp (+136~+459 bp) 的区域为正调控区,缺失该区域会导致启动子活性降低。Park 等(2004)在研究大豆 *CAM* 亚型 *SCaM-4* 基因启动子时,通过一系列 3' 端缺失分析,发现 -858~-728 bp 区段为 NaCl 诱导表达功能区段。

2.3 内部缺失法

内部缺失法是将全长启动子中的某一具有启动子活性的区段作为研究对象,缺失其内部某一序列,产生一系列不同大小的内部缺失的启动子突变体,再通过植物转化研究不同缺失突变体的功能(图 4)。

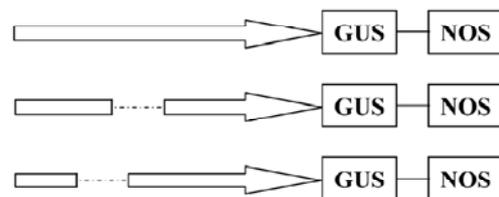


图 4 内部缺失法原理图

Fig.4 Diagram of internal deletion

Shen等(1996)采用内部缺失法研究发现,大麦(*Hordeum vulgare*) *Lea* 基因启动子的 ABA 诱导活性需要两个ACGT元件或者一个ACGT元件和一个CE元件,且ACGT元件和一个CE元件的旁侧序列对启动子的活性也有一定的影响。Park等(2004)通过内部缺失分析发现,缺失-1 065~-858 bp区段不影响大豆 *SCaM-4* 基因启动子 NaCl 诱导表达活性。Yang等(2009)在研究裂叶牵牛(*Pharbitis nil*) *PNZIP* 基因启动子时发现, *PNZIP* 启动子含有 G-box、box-II、GAAATA、GATACT、AT-1 box 等光应答相关元件,通过内部缺失分析,发现 box-II、GAAATA、GATACT 和 AT-1 box 元件在响应 *PNZIP* 基因特异表达中均起到一定作用,其中 G-box 起到关键作用。

2.4 点突变法

点突变分析是研究启动子的特定核苷酸序列常用的方法,启动子中重要的元件被确定后,要确定启动子活性的关键性核苷酸碱基,就要采用几个碱基的部分取代甚至是单个碱基的点突变法,一般是利用转座子插入突变或限制性酶切除去某一特定启动子元件,并把该突变启动子转化植物或通过凝胶阻滞分析来确定特定序列的功能(图5)。TATA框、CAT框、CAAT框的结构及功能即是应用此方法研究确定的(夏江东等2006)。

Rouster等(1997)在大麦脂氧化酶基因(*Lox1*)

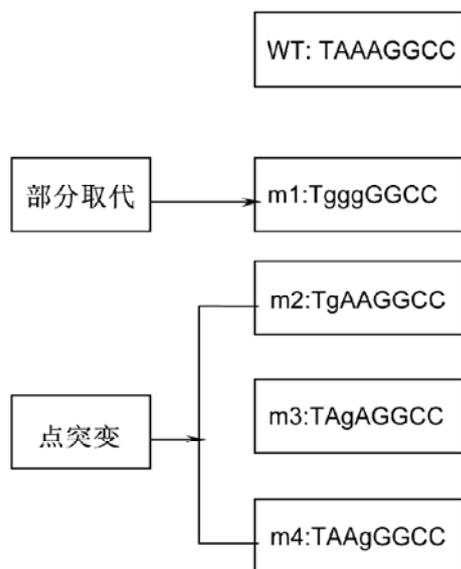


图5 点突变原理图(小写碱基为突变碱基)

Fig.5 Diagram of site-directed mutagenesis

启动子中发现了一段36 bp的序列(CAATCGTCA-TGAATGAAGTCATGTGACGGCTACACA),该序列受MeJA(茉莉酸甲酯)诱导。对该序列中CGTCA和TGACG任一元件或两个元件同时进行突变,打乱TGACG模序(用TtcCt取代TGACG),突变启动子片段不受MeJA诱导,表明TGACG模序是受MeJA诱导的顺式作用元件。Brown等(2001)研究冬大麦低温响应的*blt101.1*基因启动子发现,-168~-275 bp之间107 bp区域在低温下驱动的GUS活性较高,该序列包含一高度保守的序列CR I,点突变和凝胶阻滞分析发现,在CR I内存在一个10 bp低温响应元件(AGAAGATGC),命名为TCA-like element。Park等(2004)为了证明SCaM-4启动子中的GT-1元件在应答NaCl及病原体胁迫中的作用,将GAAAAA突变为CCAAAA,转化拟南芥并检测GUS活性,元件突变后,GUS活性降低了30%,表明GAAAAA是响应NaCl及病原体胁迫的顺式作用元件。

3 凝胶阻滞分析法

凝胶阻滞实验(gel retardation assay, GRA),又称电泳迁移率变动实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA),是一种体外检测蛋白质与DNA特异性结合的技术。这一技术最初是用来对纯化的原核调控蛋白与DNA的互作进行动力学分析的(Fried和Crothers 1984),随后人们发现它可以用于检测蛋白粗提物中的DNA结合蛋白(Singh等1986)。凝胶阻滞依据的原理就是在凝胶电泳中,由于电场的作用,小分子DNA片段比其结合了蛋白质的DNA片段向阳极移动的速度快,依据电泳迁移率的变化可以确定蛋白质与核酸分子的结合情况。凝胶阻滞实验常用于研究启动子功能元件与核蛋白的结合情况,从而鉴定新的顺式作用元件或验证已知顺式作用元件与转录因子的相互作用(图6)。

Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki(1994)发现在拟南芥脱水诱导的*rd29A*基因启动子中含有2个20 bp的正向重复序列(ACTACCGACATGAGTT-CCAA),该序列为脱水响应元件,通过凝胶阻滞分析发现该序列中的9个碱基序列(TACCGACAT)为功能序列,命名为DRE元件,核心序列为CCGA,可被脱水、高盐和低温所诱导。Dunn等(1998)对大麦冷诱导基因*blt4.9*启动子(1 938 bp)中42 bp序列(-218~-177 bp)进行凝胶阻滞分析,在该区域鉴定

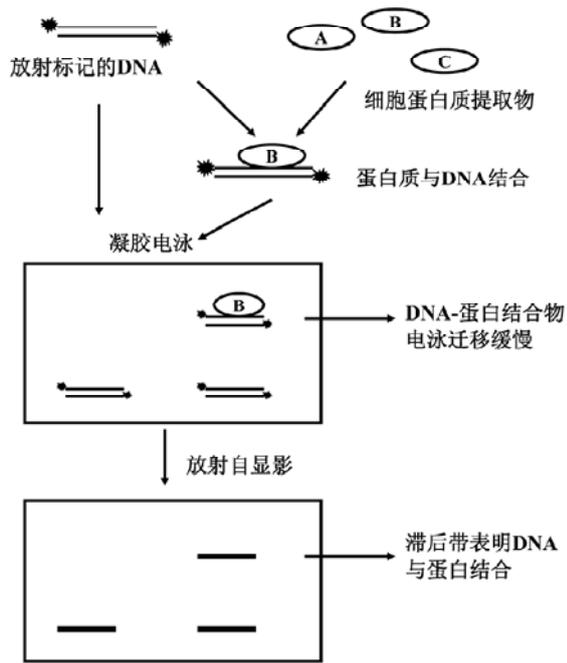


图6 凝胶阻滞实验原理图

Fig.6 Diagram of electrophoretic mobility shift assay

引自 http://www.cnviagene.com/EMSA_subject/faq_emsas_methods.htm.

出一个六聚核苷酸序列: CCGAAA, 可作为低迁移率结合蛋白复合体结合位点, CCGAAA 模序突变会降低该基因对低温响应的水平。Bastola 等(1998)从苜蓿(*Medicago sativa*)根中分离得到受NaCl诱导的*PMsPRP2*基因启动子, 经凝胶阻滞分析发现, 该启动子存在 G-rich 序列: GNGGTG 或 GTGGNG。Park 等(2004)通过凝胶阻滞分析鉴定出SCaM-4启动子-858~-728 bp区域中6 bp保守序列GAAAAA (GT-1 cis-element)为NaCl和病原体诱导的顺式作用元件。

除了鉴定新的顺式作用元件外, 凝胶阻滞实验在验证非生物胁迫启动子顺式作用元件与转录因子的相互作用方面也有广泛的应用。魏刚等(2005)通过凝胶阻滞实验分析拟南芥受干旱胁迫表达的蛋白QRAP2 (glutamine-rich AP2), 结果显示QRAP2蛋白能够与DRE顺式元件特异结合, 但不能与*mDRE*和GCC等非相关元件结合。Huang等(2007)从棉花中分离出了DREB1/CBF-like蛋白(GhDREB1L), 并采用凝胶阻滞实验对其进行分析, 发现GhDREB1L能够与DRE元件(核心序列, ACCGAC)和DRE-like元件(核心序列, GCCGAC)特异结合,

DRE-like元件是棉花LEA蛋白*D113*基因启动子中响应低温、干旱、高盐的顺式作用元件。Chen等(2009)用凝胶阻滞法研究大豆受低温诱导表达的GmDREB3蛋白与DRE顺式作用元件的相互作用, 发现GmDREB3蛋白能与DRE顺式作用元件(CCGAC)特异结合。

4 DNase I 足迹分析法

DNase I 足迹分析法(DNase I footprinting)也是研究顺式作用元件与蛋白质结合的一种方法, 该方法能确定与蛋白质结合的DNA的长度及序列。其基本原理是用DNase I部分消化已进行单链末端标记的待测双链DNA, 在变性聚丙烯酰胺凝胶上形成以相差一个核苷酸为梯度的DNA条带; 当DNA片段与其特异性结合的蛋白结合后, 结合蛋白的区域受到蛋白的保护, 免受DNase I的攻击, 因此形成切割梯中的空白区域。再结合DNA化学测序法, 就可知该结区的碱基序列(图7)。

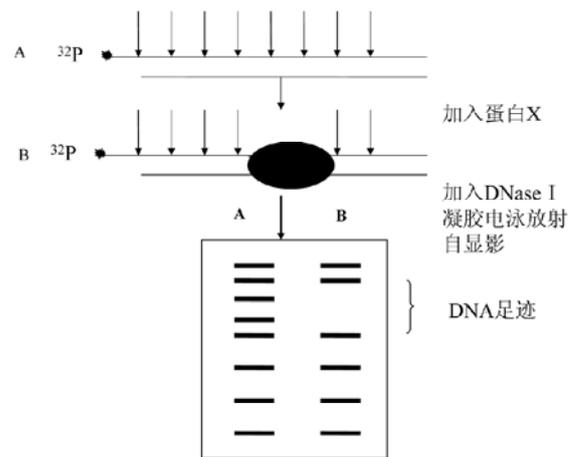


图7 DNase I 足迹实验原理图

Fig.7 Diagram of DNase I footprinting

引自 <http://www.doc88.com/p-79559361893.html>.

DNase I 足迹法由Galas和Schmitz于1978年首次运用于DNA序列特异性结合蛋白的研究中。Boter等(2004)利用足迹分析, 发现LAP启动子T/G-box的邻近位置存在GAGTA元件的重复模序, 通过删除该元件的突变实验显示, 启动子JA(茉莉酸)诱导活性丧失, 表明这一重复元件对于启动子JA响应是必须的。Rawat等(2005)在研究编码茄子(*Solanum melongena*)半胱氨酸蛋白酶基因*SmCP*的表达时发现, 该基因是受昼夜节律调控的, 利用DNase I足

迹分析实验和凝胶阻滞实验找到了和昼夜节律相关的顺式作用元件 EEs (AAAATATCT)。目前 DNase I 足迹法在启动子顺式作用元件研究中的应用较少,在植物非生物胁迫启动子顺式作用元件的研究中尚未见报道。

5 酵母单杂交体系

酵母单杂交体系(yeast one-hybrid system)是由 Li 和 Herskowitz (1993)从酵母双杂交技术发展来的。该方法根据 DNA 结合蛋白(即转录因子)与 DNA 顺式作用元件结合调控报告基因表达的原理来克隆编码目的转录因子的基因、鉴别已知转录因子的 DNA 结合位点,是一种利用酵母细胞来进行的体内遗传分析系统。其原理是:转录因子通常由一个 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, BD)和一个转录激活结构域(activation domain, AD)组成。理论上,任何一个 AD 都可以与任何一个 BD 结合并激活转录,而且只要二者能够通过一定方式在空间上足够靠近,就可激活转录。在酵母单杂交系统中,用特异的 DNA 序列(顺式作用元件, *cis*)取代 GAL4 (一种典型的转录因子)的 DNA 结合位点,只要文库蛋白编码基因表达的蛋白能与目标序列(*cis*)相互作用,就可通过转录激活结构域激活 RNA 聚合酶,启动下游报告基因的表达。其基本操作过程为:将已知顺式作用元件构建到最小启动子(minimal promoter, P_{min})的上游,把报告基因连接到 P_{min} 下游。将编码待测转录因子的 cDNA 与 AD 融合表达载体导入酵母细胞,该基因产物如果能够与顺式作用元件相结合,就能激活 P_{min} 启动子,使报告基因得到表达,从而筛选出与已知顺式作用元件相互作用的转录因子的编码基因(图 8)。

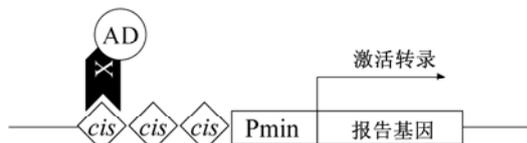


图 8 酵母单杂交体系原理图

Fig.8 Diagram of yeast one-hybrid system

AD: 转录激活域; *cis*: 顺式作用元件; X: 待测转录因子; P_{min}: 最小启动子。

Liu 等(1998)通过酵母单杂交技术从拟南芥 cDNA 文库中得到了与脱水响应元件 DRE 特异结合

的转录因子 DREB1A 和 DREB2A, DREB1A 受低温诱导表达, DREB2A 受干旱诱导表达。Lu 等(2002)从水稻(*Oryza sativa*)悬浮细胞 cDNA 文库中分离到 3 个新的 MYB 基因, 分别命名为 *OsMYBS1*、*OsMYBS2* 和 *OsMYBS3*。酵母单杂交实验表明, *OsMYBS1* 和 *OsMYBS2* 可以在体内与 TATCCA 元件结合, 转录激活含 TATCCA 元件的启动子的表达。Shen 等(2003)利用酵母单杂交实验, 在干旱诱导的小麦中发现一个能与 DRE 元件结合的转录因子(TaDREB1), 该转录因子基因在不同的小麦品系中可被低温、干旱和高盐所诱导。Boter 等(2004)采用酵母单杂交技术, 分离得到 2 个含有 HTL 的碱性亮氨酸拉链结构的转录因子: JAMYC2 和 JAMYC10, 它们可以特异地与 *LAP* 基因启动子的 -317~-78 bp 区域中的 T/G-box (AACGTG) 结合。Tran 等(2004)利用酵母单杂交技术分离了拟南芥 3 个 NAC 家族的蛋白: ANAC019、ANAC055 和 ANAC072, 它们在体内和体外均能与包含 CATGTG 模序的 63 bp 启动子特异结合, 且均受干旱、高盐以及脱落酸的诱导。

6 结语

植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件及转录因子的研究是目前研究的热点, 受到广泛关注, 本文介绍了该研究领域的经典方法, 其中凝胶阻滞分析法和酵母单杂交法应用比较广泛, 凝胶阻滞分析法主要用于鉴定新的顺式作用元件, 酵母单杂交法主要用于鉴定与已知顺式作用元件相互作用的转录因子。随着生物技术的发展, 越来越多的新技术已应用于 DNA-蛋白质相互作用的研究中, 如: 染色质免疫共沉淀、核酸适体技术、荧光技术、扫描探针显微镜技术、等离子共振技术、质谱技术和分子模拟等。随着这些新技术的发展和应用, 将会鉴定出更多的顺式作用元件及转录因子, 为抗逆基因表达调控的研究奠定基础。

参考文献

- 魏刚, 雷娟, 巩威, 朱玉贤(2005). 拟南芥 *QRAP2* 基因的克隆、表达、DNA 结合能力及体外转录活性分析. 科学通报, 50 (17): 1863~1868
- 夏江东, 程在全, 吴渝生, 季鹏章(2006). 高等植物启动子功能和结构研究进展. 云南农业大学学报(自然科学版), 21 (1): 7~14
- 杨英军, 周鹏(2005). 番木瓜 proteinase omega 基因启动子的克隆及功能初步研究. 云南植物研究, 27 (5): 545~551
- Bastola DR, Pethe VV, Winicov I (1998). Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene. Plant Mol Biol, 38:

- 1123~1135
- Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 18: 1577~1591
- Brown APC, Dunn MA, Goddard NJ, Hughes MA (2001). Identification of a novel low-temperature-response element in the promoter of the barley (*Hordeum vulgare* L.) gene *blt101.1*. *Planta*, 213: 770~780
- Carey M, Stephen TS (2001). *Transcriptional Regulation in Eukaryotes Concepts, Strategies, and Techniques*. New York: Cold Laboratory Press
- Chen M, Xu ZS, Xia LQ, Li LC, Cheng XG, Dong JH, Wang QY, Ma YZ (2009). Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.). *J Exp Bot*, 60 (1): 121~135
- Christoph DS, Viviane P, Mauro D, Rouaida P, Philipp B (2004). The Eukaryotic Promoter Database EPD: the impact of *in silico* primer extension. *Nucleic Acids Res*, 32: 82~85
- Dunn MA, White1 AJ, Vural S, Hughes MA (1998). Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol*, 38: 551~564
- Fried MG, Crothers DM (1984). Kinetics and mechanism in the reaction of gene regulatory proteins with DNA. *J Mol Biol*, 172 (3): 263~282
- Galas DJ, Schmitz A (1978). DNAase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 5 (9): 3157~3170
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 27 (1): 297~300
- Huang B, Jin LG, Liu JY (2007). Molecular cloning and functional characterization of a DREB1/CBF-like gene (*GhDREB1L*) from cotton. *Sci China Ser C-Life Sci*, 50 (1): 7~14
- Kolchanov NA, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Stepanenko IL, Merkulova TI, Pozdnyakov MA, Podkolodny NL, Naumochkin AN, Romashchenko AG (2002). Transcription regulatory regions database (TRRD): its status in 2002. *Nucleic Acids Res*, 30 (1): 312~317
- Li JJ, Herskowitz I (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*, 262: 1870~1874
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). 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*, 10: 1391~1406
- Lu CA, Ho TH, Ho SL, Yu SM (2002). Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression. *Plant Cell*, 14 (8): 1963~1980
- Matys V, Fricke E, Geffers R, Göbling E, Haubrock M, Hehl R, Hornischer K, Karas D, Kel AE, Kel-Margoulis OV et al (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res*, 31 (1): 374~378
- Nazmul HB, Akira H, Nana Y, Vandna R, Takashi H, Teruhiro T (2007). Regulation of betaine synthesis by precursor supply and choline monooxygenase expression in *Amaranthus tricolor*. *J Exp Bot*, 58 (15-16): 4203~4212
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH et al (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 135 (4): 2150~2161
- Rawat R, Xu ZF, Yao KM, Chye ML (2005). Identification of *cis*-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant Mol Biol*, 57: 629~643
- Rouster J, Leah R, Mundy J, Mundy J, Cameron-Mills V (1997). Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J*, 11 (3): 513~523
- Shen Q, Zhang P, Ho THD (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 8: 1107~1119
- Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q, Chen SY (2003). An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theor Appl Genet*, 106: 923~930
- Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp PA (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, 319: 154~158
- Stephane R, Patrice D, Marc VM, Pierre R (1999). PlantCARE: A plant *cis*-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res*, 27 (1): 295~296
- Sun QH, Gao F, Zhao L, Li KP, Zhang J (2010). Identification of a new 130 bp *cis*-acting element in the *TsVPI* promoter involved in the salt stress response from *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol*, 10: 90
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell*, 16: 2481~2498
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in all *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251~264
- Yang YT, Yu YL, Yang GD, Zhang JD, Zheng CC (2009). Tissue-specific expression of the *PNZIP* promoter is mediated by combinatorial interaction of different *cis*-elements and a novel transcriptional factor. *Nucleic Acids Res*, 37 (8): 2630~2644
- Yin T, Wu HY, Zhang SL, Liu JM, Lu HY, Zhang LX, Xu Y, Chen DM (2009). Two negative *cis*-regulatory regions involved in fruit-specific promoter activity from watermelon (*Citrullus vulgaris* S.). *J Exp Bot*, 60 (1): 169~185
- Zhang Y, Yin H, Li D, Zhu WW, Li QL (2008). Functional analysis of *BADH* gene promoter from *Suaeda liaotungensis* K. *Plant Cell Rep*, 27 (3): 585~592