



植物转录因子与DNA互作研究技术

杨立文, 刘双荣, 李玉红, 林荣呈*

中国科学院植物研究所光生物学重点实验室, 北京 100093

摘要 转录通过调控下游基因的时空特异性表达影响植物生长发育。在转录调控机制的解析过程中, 转录因子与DNA的相互作用是关键的一环。近年来, 研究者利用酵母单杂交(Y1H)和凝胶阻滞迁移率实验(EMSA)检测转录因子能否直接结合DNA; 而瞬时表达技术则是一种检测转录因子对下游基因调控作用的便捷方式。该文对Y1H、EMSA和瞬时表达技术的原理、实验方法和相关注意事项进行详细阐述, 以期对转录因子与DNA的互作研究提供参考方法。

关键词 转录因子, DNA, Y1H, EMSA, 瞬时表达技术

杨立文, 刘双荣, 李玉红, 林荣呈 (2020). 植物转录因子与DNA互作研究技术. 植物学报 55, 468–474.

植物按照中心法则完成遗传信息的转录和翻译。不同基因型的个体通过将DNA转录为RNA, RNA进一步翻译为蛋白质, 从而表现出不同的表型。其中, 起始转录步骤的成功与否影响着后续步骤(如RNA的可变剪接以及翻译)的进行(Latchman, 2005)。因此, 转录在植物生命过程中发挥至关重要的作用。此外, 转录还能调控基因的组织特异性表达以及基因表达对特定信号的响应, 进而影响器官的分化以及植物对环境的适应性。转录过程一直是生命科学中的热点问题。近年来, 大量研究从转录调控的角度解析了植物对热、冷和干旱等胁迫信号以及对外源光信号的响应机制(Pu and Brady, 2010; Nakashima et al., 2014; Ohama et al., 2017; 杨立文等, 2019)。在转录调控机制的解析过程中, 酵母单杂交(yeast one hybrid, Y1H)、凝胶阻滞迁移率检测(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)和瞬时表达是行之有效的技术手段。

Y1H和EMSA是检测转录因子能否直接结合DNA的常用技术。Y1H是酵母双杂交的衍生技术, 用于分析转录因子与DNA之间的相互作用, 以研究真核细胞中的基因表达调控(Li and Herskowitz, 1993)。在Y1H分析系统中, 将特定顺式作用元件构建到

pLacZ2 μ 酵母表达载体上, 将编码转录因子的cDNA构建到pB42AD酵母表达载体上。将上述2种融合表达载体共转化至酵母细胞中, 此时转录因子若能结合在顺式作用元件上, 则会启动下游报告基因的表达。目前, Y1H技术主要用于鉴定DNA结合位点, 筛选潜在的DNA结合蛋白(转录因子), 因操作简单且耗时短受到研究者的青睐。然而, 在利用Y1H分析转录因子与DNA的结合时可能受到酵母内源表达激活物的影响, 即存在假阳性问题。此外, 由于融合蛋白对酵母细胞有毒性或者在酵母系统中不能稳定表达等原因, Y1H会产生假阴性结果。在实际操作中, 可通过设置严格的对照实验减少假阳性和假阴性结果的干扰。EMSA是另一种研究转录因子与DNA结合的实验技术, 可用于定性和定量分析。通常将纯化的蛋白和同位素或生物素标记的DNA探针共同孵育, 然后在非变性聚丙烯酰胺上电泳, 从而将DNA-转录因子复合物与不结合的探针分离。由于分子量变大, DNA-转录因子复合物比不结合的探针迁移速度慢, 因此转录因子结合标记探针后使自由探针含量减少。研究者通常按照上述2个标准判断转录因子是否结合DNA。然而, EMSA很难鉴定低亲和力的结合元件; 也无法鉴定蛋白复合体与DNA之间的结合。此外, 作为体外检测手段,

收稿日期: 2020-04-04; 接受日期: 2020-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(No.31870213)

* 通讯作者。E-mail: rclin@ibcas.ac.cn

EMSA不能反映体内蛋白与DNA的结合。

瞬时表达体系是检测转录因子对下游基因调控作用(促进或抑制)的技术方法。通常包括本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)原生质体2种操作体系。利用本氏烟草瞬时表达体系分析转录因子对基因的表达调控时,将融合编码转录因子cDNA的双元表达载体以及融合特异基因启动子-LUC报告基因的表达载体共同转化烟草叶片。若转录因子调控该基因的表达,那么下游报告基因LUC的表达将发生变化,进而导致其编码的荧光素酶活性改变,可通过体外喷施荧光素酶底物进一步检测这种变化。利用拟南芥原生质体瞬时表达体系分析转录因子对基因的表达调控时,首先将编码转录因子的cDNA构建至pUC18-3HA载体上,然后将特异基因启动子序列构建至pGreenII0800-LUC载体上。pGreenII0800-LUC载体含有编码萤火虫荧光素酶(LUC)以及海肾荧光素酶(REN)的基因序列。REN基因由35S启动子驱动,其编码的REN与底物反应产生的荧光读数(LUC_{Renilla})作为内参。LUC基因由外源插入的基因启动子驱动,其催化底物产生的荧光值读数为LUC_{Firefly}。以LUC_{Firefly}/LUC_{Renilla}比值表示转录因子对基因的转录调控作用。目前,瞬时表达体系由于其操作简便和表达效率高等优点备受研究者青睐。此外,相比获得永久性的转基因材料,瞬时表达的外源基因不会遗传给下一代,因而生物安全性很高。

1 实验材料

Y1H: 包括酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) EGY48菌株(Clontech)、pLacZ2 μ 和pB42AD酵母表达质粒(图1A, B)。其中, pLacZ2 μ 连接增强复制的特异元件; pB42AD连接转录因子的编码区序列。

EMSA: 包括表达质粒(图1C)、携带表达质粒的BL21大肠杆菌菌株和DNA探针序列。

瞬时转化体系: 包括3—4周苗龄的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* D.)叶片以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)莲座叶片。在烟草体系中,利用双元表达载体质粒以及连接启动子片段或特异元件的植物表达载体(图1D, E)进行瞬时转化。在拟南芥原生质体体系中, pUC18-3HA连接编码转录因子的cDNA; pGreenII0800-LUC连接特异基因启动子片段或特异元件

(图1F, G),用于原生质体瞬时转化。

2 试剂及配方

(1) Y1H所需试剂包括YPD酵母全营养培养基、One-step溶液、酵母缺陷型培养基(SD)、棉子糖、半乳糖、10 \times BU盐以及5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)。相关试剂的配方如下。

- YPD酵母全营养培养基: 20 g \cdot L⁻¹ Difco peptone、10 g \cdot L⁻¹酵母抽提物和20 g \cdot L⁻¹葡萄糖。相关试剂均购自OXOID公司。
- SD培养基: 6.7 g \cdot L⁻¹ YNBOXOID、20 g \cdot L⁻¹葡萄糖(Cat No.GAO188)、20 g \cdot L⁻¹琼脂以及缺少色氨酸和尿嘧啶的氨基酸混合物(DO/Trp-Ura)(Cat No.630427)。
- 显色SD培养基: 在SD培养基(不包含葡萄糖)中加入1 \times BU盐、2%半乳糖、1%棉子糖和80 μ g \cdot mL⁻¹ X-gal。其中, 10 \times BU盐: 37.1 g \cdot L⁻¹ Na₂HPO₄和30 g \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄。相关试剂均购自Sigma公司。
- One-step溶液(现用现配): 2 mL 1 mol \cdot L⁻¹ LiAc (Sigma)、8 mL 50% PEG3350 (Cat No.BCBX-6102) 以及 76.9 μ L β -巯基乙醇 (Cat No. M8210)。

(2) EMSA所需试剂包括: 5 \times TBE、6% TBE凝胶、生物素标记试剂盒(Thermo Scientific, Cat No.89818)、EMSA试剂盒(LightShift, Cat No.20148)和化学发光核酸检测试剂盒(Thermo Scientific, Cat No.89880)。其中,相关试剂的配方如下。

- 5 \times TBE: 54 g \cdot L⁻¹ Tris、27.5 g \cdot L⁻¹硼酸以及0.5 mol \cdot L⁻¹ EDTA (pH8.0)。
- 6% TBE凝胶(25 mL): 2.5 mL 5 \times TBE、5 mL 30% 丙烯酰胺 (Cat No.A3291)、17.325 mL ddH₂O、150 μ L 10% APS (Cat No.MKCG5404) 和25 μ L TEMED (Cat No.T22500)。

(3) 瞬时表达体系包括本氏烟草和拟南芥原生质体2种转化系统。

- 本氏烟草系统所需试剂: LB液体培养基、注射缓冲液(10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、10 mmol \cdot L⁻¹ MES pH5.7)、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)、Triton X-100和荧光素(D-luciferin)。

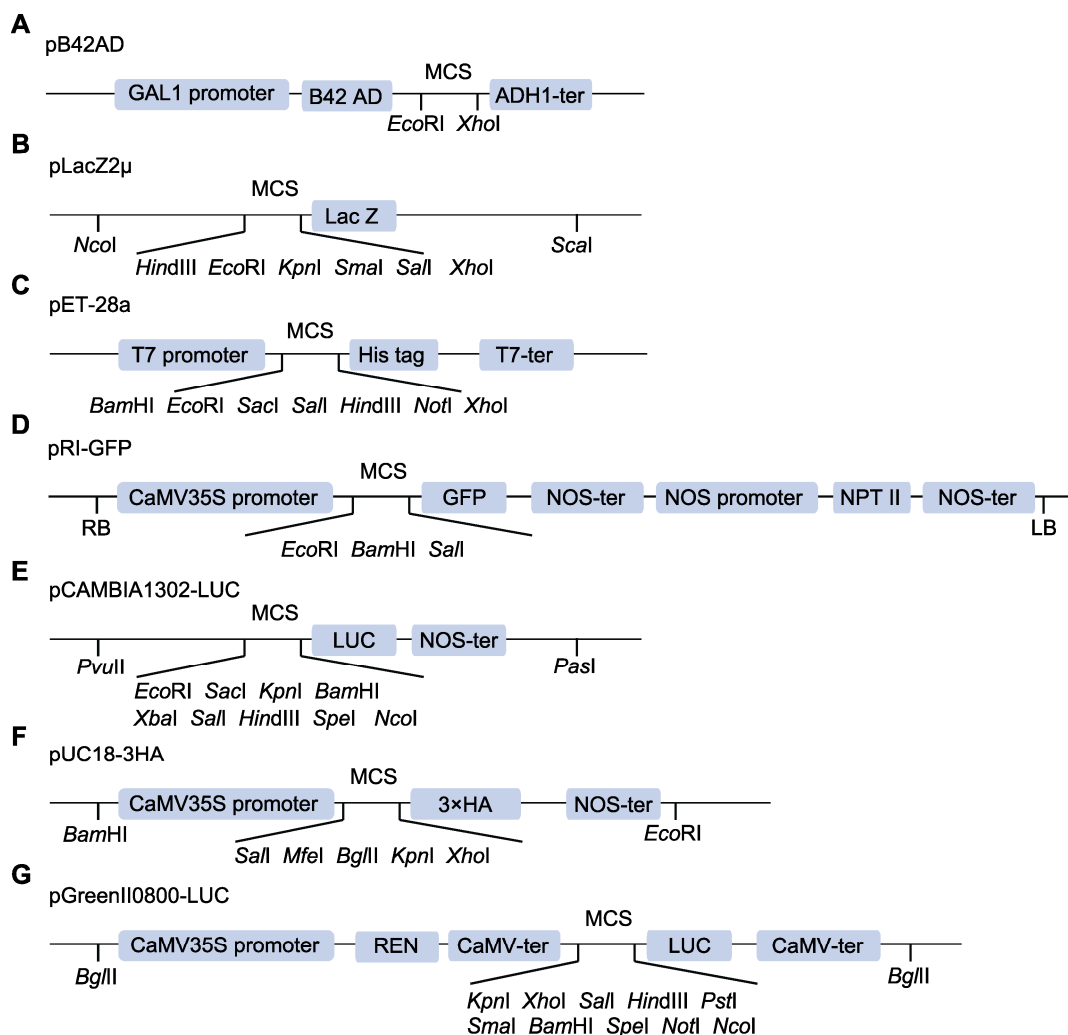


图1 表达载体示意图

(A) pB42AD (Clontech); (B) pLacZ2 μ (Lin et al., 2007); (C) pET-28a (Novagen); (D) pRI-GFP (Jing et al., 2019); (E) pCAMBIA1302-LUC (Xu et al., 2019); (F) pUC18-3HA (Chen et al., 2013); (G) pGreenII0800-LUC (Hellens et al., 2005)。MCS: 多克隆位点; REN: Renilla

Figure 1 Construct maps

(A) pB42AD (Clontech); (B) pLacZ2 μ (Lin et al., 2007); (C) pET-28a (Novagen); (D) pRI-GFP (Jing et al., 2019); (E) pCAMBIA1302-LUC (Xu et al., 2019); (F) pUC18-3HA (Chen et al., 2013); (G) pGreenII0800-LUC (Hellens et al., 2005). MCS: Multiple cloning site; REN: Renilla

- 拟南芥原生质体瞬时转化体系所需试剂: W5、WI、PEG4000和MMG溶液。相关试剂配制方法参考文献报道(Yoo et al., 2007)。

3 仪器设备和软件

- Y1H所需仪器: 30°C摇床、30°C恒温培养箱和超净工作台。
- EMSA所需仪器: PCR仪、电泳仪、转膜仪、紫

外切胶仪和化学发光检测仪。

- 在瞬时转化体系中, 1 mL注射器用于烟草叶片瞬时转染; 活体成像系统(NightSHADE, LB985, LB941; Berthold)用于LUC荧光检测; 100目细胞筛、3M魔术贴布以及纸质胶带用于拟南芥原生质体的分离; Luminometer (GloMax[®] 20/20)分析系统用于LUC活性检测。在烟草瞬时转化体系中, 利用indiGO[™] (Version 2.0.3.0)软件统计LUC荧光强度。

4 实验设计要求

4.1 利用Y1H检测转录因子与DNA互作的实验设计要求

- (1) 确定转录因子可能识别的启动子元件, 利用包含该元件的启动子序列进行Y1H分析。
- (2) 设置严格的对照实验。对于1组Y1H分析而言, 至少包括3组阴性对照。即pB42AD/pLacZ2 μ 、pB42AD/pLacZ2 μ 重组质粒以及pB42AD重组质粒/pLacZ2 μ 。可视具体情况添加1组阳性对照, 以排除假阴性结果。

4.2 利用EMSA检测转录因子与DNA互作的实验设计要求

- (1) 选取转录因子可能结合的顺式作用元件以及前后各5 bp的侧翼序列, 按照同一方向串联3次, 组成探针。
- (2) 为确定转录因子与特定顺式作用元件结合的特异性, 需添加竞争组作为对照实验。即利用未标记的野生型探针和未标记的突变型探针进行EMSA分析。

4.3 利用瞬时转化体系检测转录因子与DNA互作的实验设计要求

- (1) 本氏烟草体系: 设置严格的阴性对照。例如, 分析RGL2对RVE1调控的GA3ox2基因转录的影响时, 需设计2个对照实验。即GFP/Myc/GA3ox2启动子和GFP/Myc-RVE1/GA3ox2启动子(Yang et al., 2020)。
- (2) 拟南芥原生质体体系: 与本氏烟草体系相似, 也需设置严格的阴性对照。

5 实验程序

5.1 Y1H检测转录因子与DNA互作

- (1) 酵母细胞的培养: 将-80°C冻存的EGY48酵母菌株在全营养固体培养基YPD上划线以活化酵母细胞, 30°C倒置培养1-2天。挑取单克隆接种于10 mL YPD液体培养基中, 30°C摇床200 rpm振荡培养12小时。
- (2) 酵母感受态的制备: 将酵母菌液分装于1.5 mL离心管中, 每管1 mL。850 $\times g$ 离心5分钟, 去上清。加入1 mL无菌dH₂O重悬酵母。850 $\times g$ 离心5分钟, 去上清。重复2-3次。随后每管加入100 μ L One-step溶液, 振荡重悬, 以获得酵母感受态细胞。

(3) 质粒共转化: 在酵母感受态细胞中加入pLacZ2 μ 和pB42AD融合载体质粒各2.5 μ L以及5 μ L鲑鱼精DNA, 振荡混匀。45°C孵育30分钟, 每隔10分钟振荡重悬1次。然后均匀涂布于SD/-Trp-Ura固体培养基上, 30°C倒置培养2-4天。

(4) 酵母显色: 挑取菌体划线至添加X-gal的SD/-Trp-Ura显色平板上, 置于30°C黑暗条件下培养1-2天。期间观察显色情况并拍照记录(Lin et al., 2007)。

5.2 EMSA检测转录因子与DNA互作

- (1) 实验前准备。包括纯化重组蛋白及合成DNA探针。
- (2) 标记探针。在合成的DNA探针上标记放射性同位素³²P或生物素。由于生物素不具有放射性以及便于操作等优点, 近年来人们常使用生物素标记DNA探针。按照以下顺序配制标记组和竞争组的反应体系。

标记组: 12.5 μ L超纯水, 5 μ L 5 \times TdT缓冲液, 2.5 μ L 1 μ mol·L⁻¹未标记的Oligo, 2.5 μ L 5 μ mol·L⁻¹ Biotin-11-UTP, 2.5 μ L 2U· μ L⁻¹ Diluted TdT。

竞争组: 20 μ L超纯水, 2.5 μ L 10 \times 结合缓冲液(含Mg²⁺), 2.5 μ L 50 μ mol·L⁻¹未标记的Oligo。

37°C避光孵育30分钟。加入1.25 μ L 0.2 mol·L⁻¹ EDTA终止反应, 然后加入25 μ L氯仿:异戊醇(1:1), 旋涡振荡混匀, 16 000 $\times g$ 离心1-2分钟, 取上清。随后转移至90°C孵育2分钟, 缓慢降温至60°C, 最后于60°C孵育30分钟。

(3) 6% TBE凝胶制备及预电泳。按照配方依次加入各成分并充分混匀, 注意在灌胶过程中要防止气泡的产生。待TBE凝胶完全凝固后开始预电泳, 90 V电泳1-2小时, 电泳缓冲液为0.5 \times TBE缓冲液。

(4) 蛋白与探针结合反应。按照以下配方配制结合反应体系。

实验组: 50 ng融合蛋白, 0.5-2 μ L标记探针, 6 μ L结合反应缓冲液, 用超纯水定容至20 μ L。

竞争组: 50 ng融合蛋白, 0.5-2 μ L标记探针, 过量的野生型未标记探针或突变型未标记探针, 6 μ L结合反应缓冲液, 用超纯水定容至20 μ L。

其中, 结合缓冲液的配方为: 2 μ L 10 \times 结合缓冲液, 1 μ L 50%甘油, 1 μ L 100 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1 μ L 1 μ g· μ L⁻¹ Poly dl:dC, 1 μ L 1% NP-40。

通常未标记野生型或突变型探针的用量为标记探针的10倍、50倍和100倍。Poly dl:dC可抑制蛋白

与DNA的非特异性结合,避免形成假复合物。

(5) 电泳。结合反应完毕后加入5 μL 上样缓冲液,充分混匀再进行上样。电压90 V,待指示剂到达胶的3/4处时即可停止电泳。

(6) 转膜。将尼龙膜小心取出,放入0.5 \times TBE转膜缓冲液中,依次按照黑面-纤维垫-2层滤纸-胶-尼龙膜-2层滤纸-纤维垫-白面的顺序放置,注意不要有气泡产生。380 mA工作60分钟。

(7) 紫外交联。取出尼龙膜用吸水纸吸干水,蛋白面朝下放入紫外交联仪中,紫外交联15分钟。

(8) 发光检测。将紫外交联后的尼龙膜置于干净的平皿中,加入10 mL封闭缓冲液,轻柔摇动15分钟。轻轻倒掉封闭缓冲液,加入8 mL结合/封闭缓冲液,轻柔摇动15分钟。将尼龙膜转移至新的平皿中,加入10 mL 1 \times 漂洗液,轻柔漂洗5分钟,重复漂洗3次。将尼龙膜转移至新的平皿中,加入15 mL底物平衡缓冲液,轻柔摇动15分钟。取出尼龙膜,吸干多余的底物平衡缓冲液,置于新的平皿中。加入6 mL化学发光底物至完全覆盖尼龙膜,静置孵育5分钟。最后,取出尼龙膜,从侧面吸干多余的化学发光底物,用保鲜膜包被,在化学发光成像系统(Bio-step)中曝光5分钟进行显影。

(9) 数据分析。通常情况下,可以从两方面分析EMSA数据,即底部的自由探针和位于上方的迁移条带(蛋白-DNA复合物)。在加入等量标记探针的前提下,当蛋白与DNA产生互作时,底部的自由探针减少,迁移条带亮度增强。在此基础上增加未标记野生型探针会与标记探针竞争蛋白,此时自由探针条带强度基本不变,迁移条带亮度减弱;而当增加未标记的突变探针时,由于蛋白不结合该序列,突变探针不与标记探针竞争,此时自由探针减少,迁移条带亮度增强(Jiang et al., 2016)。

5.3 瞬时转化体系检测转录因子与DNA互作(本氏烟草体系)

(1) 工程菌液的制备。将融合载体和辅助质粒P19分别转化农杆菌GV3101感受态细胞,挑取单菌落接种于含3 mL LB液体培养基(Kan⁺/Rif⁺)中,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床200 rpm过夜培养。随后转接至含15 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床200 rpm过夜培养。1 500 $\times\text{g}$ 离心6分钟,弃上清,收集菌体。加入10 mL注射缓冲液重悬

菌体,2 300 $\times\text{g}$ 离心6分钟,弃上清。重复漂洗1–2次。加入2 mL注射缓冲液重悬菌体,稀释10–50倍后测OD₆₀₀值。每个菌液所需体积(V_1)的计算公式:

$$V_1=0.5\times V_0/(n\times\text{OD}_{600})$$

其中, n 为稀释倍数, V_0 为混合菌液总体积。注意:计算P19体积时将公式中的系数0.5改为0.3。混合所需菌液,加入100–200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮,用注射缓冲液定容。28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3–4小时。

(2) 烟草瞬时转化。使用1 mL注射器从叶片背面注射农杆菌,随后将烟草置于弱光下生长1天,再于光下生长1–2天。

(3) LUC荧光强度检测。将烟草叶片背面朝上置于培养皿中,喷施含0.02% Triton X-100的1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LUC底物(D-Luciferin, Promega),于活体成像系统(NightSHADE, LB985, LB941; Berthold)中黑暗处理10分钟,荧光拍照曝光10分钟。统计LUC荧光强度(Cheng et al., 2020)。每个样本至少重复3次。

5.4 瞬时转化体系检测转录因子与DNA互作(拟南芥原生质体体系)

(1) 原生质体的分离。剪取长日照条件(16小时光照/8小时黑暗)下生长3–4周的拟南芥莲座叶,用胶带去除叶片的下表皮后将其放入酶解液里,22 $^{\circ}\text{C}$ 避光酶解1–1.5小时(Wu et al., 2009)。加入等体积的W5溶液,轻摇混匀,用100目细胞筛过滤原生质体到新的管中。常温150 $\times\text{g}$ 离心2分钟,收集原生质体。弃上清,加入5–10 mL W5溶液,冰上放置30分钟沉降原生质体。小心去除上清,加入适量预冷的MMG溶液重悬原生质体。具体操作方法参考文献报道(Yoo et al., 2007)。

(2) 原生质体转化和共培养。将含有转录因子的pUC18-3HA质粒以及包含启动子或关键元件的pGreenII0800-LUC质粒共转化拟南芥原生质体,具体方法如下。

在2 mL离心管中加入pUC18-3HA质粒和pGreenII0800-LUC质粒各5 μg 。然后加入100 μL 原生质体,用手指轻弹混匀。加入110 μL PEG4000溶液,用手指轻弹混匀。室温下孵育15分钟。加入440 μL W5溶液,轻轻颠倒混匀,终止转染过程。150 $\times\text{g}$ 离心2分钟,收集原生质体。弃上清,加入400 μL WI溶液,22 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养16–24小时。

(3) 双荧光素酶活性检测。采用Dual-Luciferase

Reporter Assay System试剂盒(Promega, Cat No. E1910)进行测定。具体操作方法如下。

将转化的原生质体200 ×g离心2分钟, 去除上清。加入80 μL 1× Passive Lysis Buffer, 旋涡振荡混匀, 冰上静置; 将底物I (Luciferase Assay Reagent II, LAR II)以每管15 μL分装至1.5 mL离心管中, 冰上静置; 将底物II (Stop & Glo® Reagent)静置在冰上。取5 μL原生质体加入底物I中, 充分吸打混匀, 利用Luminometer (GloMax® 20/20)测定读数I, 即LUC_{Firefly}; 随后取15 μL底物II加入离心管中, 并轻柔吸打混匀, 测定读数II (the Renilla luciferase activity), 即LUC_{Renilla}, 以LUC_{Firefly}/LUC_{Renilla}比值描述转录因子对基因的表达调控。

6 注意事项

6.1 利用Y1H分析转录因子与DNA互作的注意事项

- (1) 在质粒转化酵母感受态细胞时, 注意加入鲑鱼精DNA以防止外源质粒被酵母细胞降解。
- (2) 离心获得酵母菌体时, 转速勿超过850 ×g, 以免影响酵母细胞的活性。
- (3) 整个操作过程在超净工作台上进行, 防止杂菌污染。
- (4) 注意设置严格的阴性对照和阳性对照实验, 以防止假阳性和假阴性结果。

6.2 利用EMSA分析转录因子与DNA互作的注意事项

- (1) 合成的探针长度在40–60 bp左右, 有利于非结合探针和蛋白-DNA复合体的分离。
- (2) 标记好的探针若不立即使用, 可保存于–30°C冰箱中, 再次使用时于冰上融化即可。
- (3) 由于不同转录因子与DNA之间结合的强度不同; EMSA的实验结果受到重组蛋白用量、探针浓度以及缓冲液配方的影响。因此, 在利用EMSA检测转录因子与DNA之间的结合时要对上述因素进行摸索, 以确定最佳实验体系。
- (4) 紫外交联后的尼龙膜可在室温条件下放置数天, 注意在封闭之前勿再次吸湿。
- (5) 在整个EMSA操作过程中, 确保所用器具洁净,

避免SDS或其它杂质污染。

6.3 利用瞬时表达体系分析转录因子与DNA互作的注意事项

- (1) 当检测多个蛋白(转录因子或转录调控因子)对基因表达的调控作用时, 若转录因子有较强的转录抑制活性, 则需在转录因子上添加激活结构域(如VP16)。
- (2) 用于烟草瞬时转化体系的农杆菌菌液的浓度为OD₆₀₀=0.4–0.6, 以确保农杆菌的活性和较高的转化效率。
- (3) 用于转化原生质体的质粒浓度≥1.0 μg·μL⁻¹; 减少质粒中有机物和蛋白的含量, 确保较高的质粒纯度, 以获得较高的转化效率。
- (4) 原生质体转化过程中, 动作必须轻柔。控制原生质体浓度在0.5–2×10⁵个·mL⁻¹范围内, 从而确保较高的转化效率。此外, 注意PEG4000溶液现用现配, 使用前1–2小时配制, 使其充分溶解。
- (5) 在原生质体瞬时表达体系中, 配制酶解液时, 待纤维素酶和离析酶溶解后需置于55°C处理10分钟, 以失活DNA酶及蛋白酶, 促进纤维素酶和离析酶的溶解。

参考文献

- 杨立文, 刘双荣, 林荣呈 (2019). 光信号与激素调控种子休眠和萌发研究进展. 植物学报 54, 569–581.
- Chen DQ, Xu G, Tang WJ, Jing YJ, Ji Q, Fei ZJ, Lin RC (2013). Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 1657–1673.
- Cheng MC, Enderle B, Kathare PK, Islam R, Hiltbrunner A, Huq E (2020). PCH1 and PCHL directly interact with PIF1, promote its degradation, and inhibit its transcriptional function during photomorphogenesis. *Mol Plant* 13, 499–514.
- Hellens RP, Allan AC, Friel EN, Bolitho K, Grafton K, Templeton MD, Karunauretnam S, Gleave AP, Laing WA (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1, 13.
- Jiang ZM, Xu G, Jing YJ, Tang WJ, Lin RC (2016). Phytochrome B and REVEILLE1/2-mediated signaling controls seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Nat*

- Commun* **7**, 12377.
- Jing YJ, Guo Q, Lin RC** (2019). The chromatin-remodeling factor PICKLE antagonizes polycomb repression of *FT* to promote flowering. *Plant Physiol* **181**, 656–668.
- Latchman DS** (2005). Gene Regulation-A Eukaryotic Perspective, 5th edn. Oxford and New York: Taylor and Francis. pp. 1.
- 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.
- Lin RC, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang HY** (2007). Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **318**, 1302–1305.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci* **5**, 170.
- Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends Plant Sci* **22**, 53–65.
- Pu L, Brady S** (2010). Systems biology update: cell type-specific transcriptional regulatory networks. *Plant Physiol* **152**, 411–419.
- Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT, Lin CS** (2009). Tape-*Arabidopsis* Sandwich-a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* **5**, 16.
- Xu G, Jiang ZM, Wang HY, Lin RC** (2019). The central circadian clock proteins CCA1 and LHY regulate iron homeostasis in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **61**, 168–181.
- Yang LW, Jiang ZM, Liu SR, Lin RC** (2020). REVEILLE1 inhibits RGL2 degradation to regulate seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *New Phytol* **225**, 1593–1605.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565–1572.

Methods for Examining Transcription Factor-DNA Interaction in Plants

Liwen Yang, Shuangrong Liu, Yuhong Li, Rongcheng Lin*

Key Laboratory of Photobiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract Transcription affects the growth and development of plants through regulating the spatio-temporal expression of downstream genes. The interaction between transcription factors and DNA is a key section in the process of exploring transcriptional regulatory networks. In the past few years, researchers utilize yeast one hybrid (Y1H) and electrophoresis mobility shift assay (EMSA) to examine whether a transcription factor directly interacts with target DNA. In addition, transient luciferase activity assay provides a convenient method for researchers to test the regulation of transcription factors on downstream gene expression. In this paper, we elaborate the principles, methods, and advantages and limitations of Y1H, EMSA and transient luciferase activity assay, to provide technical references for exploring the transcription factor-DNA interactions.

Key words transcription factor, DNA, Y1H, EMSA, transient luciferase activity assay

Yang LW, Liu SR, Li YH, Lin RC (2020). Methods for examining transcription factor-DNA interaction in plants. *Chin Bull Bot* **55**, 468–474.

* Author for correspondence. E-mail: rclin@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)