

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC *IN VIVO* CỦA PROTEIN NLI-IF LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỐNG CHỊU STRESS Ở LÚA

Nguyễn Duy Phương, Najaren Tuteja, Phạm Xuân Hội\*

Viện Di truyền nông nghiệp, \*xuanhoi.pham@gmail.com

**TÓM TẮT:** Trong nghiên cứu sử dụng trình tự DNA đích nằm trong trật tự lõi của 2 promoter cảm ứng với điều kiện hạn JRC0528 và JRC0332, chúng tôi đã phân lập được một gen mã hóa protein NLI-IF (Nuclear LIM Interactor-Interacting Factor). Trong công trình này, chúng tôi đưa ra các kết quả nghiên cứu đặc điểm tương tác với DNA và protein của NLI-IF. Bằng kỹ thuật lai phân tử trong tế bào nấm men, chúng tôi đã chứng minh được khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự DNA đích có trật tự lõi CCTCCTCC của NLI-IF trong điều kiện *in vivo*. Sàng lọc thư viện cDNA xử lý hạn, chúng tôi đã phân lập được 8 dòng cDNA mã hóa cho các protein tương tác với NLI-IF. Các kết quả nghiên cứu đã củng cố cho giả thuyết của chúng tôi: protein NLI-IF là một nhân tố phiên mã tham gia vào quá trình chống chịu stress ở thực vật.

*Từ khóa:* Chịu hạn, DNA đích, nhân tố phiên mã, NLI-IF, yeast one hybrid, yeast two hybrid.

### MỞ ĐẦU

Các yếu tố bất lợi của môi trường hiện đang là những thách thức lớn cho mục tiêu duy trì sự phát triển bền vững trong sản xuất lương thực của loài người. Hạn và mặn là hai trong số những nhân tố quan trọng nhất kìm hãm sự phát triển sản xuất nông nghiệp, đặc biệt là sản xuất lúa gạo. Do đó, việc nghiên cứu đặc tính các gen đáp ứng hạn và mặn cũng như việc đánh giá khả năng áp dụng của chúng là một yêu cầu hết sức cấp thiết. Cách tiếp cận hướng nghiên cứu về stress thực vật trên thể giới hiện nay đang tập trung vào việc phân lập và nghiên cứu đặc tính một tập hợp đầy đủ các gen liên quan đến bất lợi môi trường và mối liên hệ giữa các bất lợi mặn, hạn và nhiệt độ. Hàng trăm gen được cảm ứng trong các điều kiện bất lợi khác nhau và sản phẩm của các gen cảm ứng với điều kiện bất lợi được chia làm hai nhóm: nhóm các protein chức năng giúp thực vật chống lại bất lợi của môi trường và nhóm các protein điều khiển làm nhiệm vụ điều hòa biểu hiện gen và truyền tín hiệu trong quá trình đáp ứng điều kiện bất lợi. Các nhân tố phiên mã thuộc nhóm thứ hai và là họ gen lớn [12]. Gần đây, rất nhiều nghiên cứu về nhân tố phiên mã được thực hiện trên cây mô hình *Arabidopsis* và các loài thực vật khác đã chứng minh vai trò quan trọng của chúng trong quá trình điều hòa phản ứng của thực vật trong các điều kiện bất lợi môi trường.

Đặc điểm đặc trưng của các protein điều khiển (nhân tố phiên mã) là có hai vùng hoạt động (domain): vùng hoạt hoá các protein chức năng (activation domain) và vùng liên kết (binding domain) với các trật tự DNA đặc hiệu (cis-acting element) trên vùng điều khiển của gen (promoter). Dựa vào đặc tính bám DNA, kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men được hình thành để phân lập các nhân tố phiên mã. Nhân tố phiên mã đầu tiên (OLF-1) được phân lập bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men [16] và ngay lập tức trở thành phương pháp đầy tiềm năng trong việc phân lập các gen mã hóa các protein có khả năng bám DNA [19].

Gần đây, sử dụng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men với trình tự đích có chiều dài 50 nucleotide chứa trật tự DRE trên vùng khởi động gen *JRC2606* chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã OsRap2.4B từ giống lúa Mộc tuyền [10]. *OsRap2.4B* có khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự đích *JRC2606* trong cả 2 nghiên cứu *in vivo* và *in vitro*. Cây mô hình được chuyển gen *OsRap2.4B* biểu hiện khả năng chống chịu với stress cao hơn so với đối chứng (số liệu chưa công bố). Một nghiên cứu sau đó, sử dụng trình tự DNA *JRC0528* và *JRC0332* để sàng lọc thư viện cDNA xử lý stress, chúng tôi đã phân lập được một gen mã hóa protein NLI-IF1 (Nuclear LIM Interactor-Interacting Factor) [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục sử dụng phép

lai phân tử trong tế bào nấm men để chứng minh khả năng liên kết đặc hiệu DNA, đồng thời xác định tương tác protein-protein của NLI-IF trong điều kiện *in vivo*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Trình tự mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF đã được tách dòng giữ trong vector pGEMT và các vector biểu hiện trong tế bào nấm men pAD-GAL4, pGBKT7 do phòng Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền nông nghiệp cung cấp.

Chủng nấm men AH109, YM4271 và thư viện cDNA xử lý stress sơ cấp dùng trong kỹ thuật sàng lọc phân tử (Yeast one hybrid/ Yeast two hybrid) được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật thuộc Trung tâm Công nghệ sinh học và Kỹ thuật di truyền Quốc tế (International Centre of Genetic Engineering DNA Biotechnology), New Delhi, Ấn Độ.

### Phương pháp

*Thiết kế vector biểu hiện pAD-GAL4/NLI-IF và pGBKT7/NLI-IF*

Vector tái tổ hợp pGEMT/NLI-IF và vector biểu hiện trong nấm men (pAD-GAL4 và pGBKT7) được xử lý đồng thời với enzyme cắt giới hạn (*EcoRI/XhoI* và *PstI/NcoI*). Trình tự mã hóa NLI-IF được ghép nối vào vector biểu hiện nhờ enzyme T4 Ligase.

*Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào nấm men*

Vector tái tổ hợp mang trình tự đích và gen đích được đồng biến nạp (co-transformation) vào tế bào nấm men YM4271, sử dụng LiAc [19] và được chọn lọc trên môi trường SD khuyết dưỡng axit amin SD-His/-Leu/-Ura (đối với kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn-Y1H) hay SD-His/-Leu/-Trip (đối với kỹ thuật sàng lọc phép lai kép-Y2H).

*Phép lai đơn trong tế bào nấm men (Yeast one hybrid assay)*

Khả năng tương tác DNA của NLI-IF được đánh giá dựa trên mức độ biểu hiện của gen thông báo *HIS* khi nuôi cấy thể biến nạp trên môi trường SD chọn lọc khuyết dưỡng axit amin có bổ sung chất ức chế cạnh tranh 3-AT

30 mM (SD -His/-Leu/-Ura + 3-AT 30 mM) và mức độ biểu hiện của gen thông báo *lacZ* trên môi trường có bổ sung cơ chất X-Gal 20 mg/ml như đã mô tả trong nghiên cứu trước [9].

Các vector pHis-Si/pLacZ mang 2 trình tự DNA lặp lại của trình tự lõi JRC0528 và JRC0332 (WT) trong vùng promoter đã sử dụng để phân lập gen *NLI-IF* [9] được tiếp tục sử dụng trong nghiên cứu này. Ngoài ra, hai trình tự DNA đích đột biến đã thay đổi yếu tố *cis*-acting bởi đoạn trình tự AAAAAAAAA (MU) được sử dụng để chứng minh khả năng liên kết DNA đặc hiệu của protein NLI-IF. Vector pAD-GAL4 (không mang gen) được sử dụng làm đối chứng âm trong nghiên cứu này.

*Phép lai kép trong tế bào nấm men (Yeast two hybrid assay)*

$10^6$ - $10^7$  tế bào nấm men tái tổ hợp mang vector pGBKT7/NLI-IF được sàng lọc theo quy trình của nhà sản xuất [20], sử dụng thư viện cDNA thứ cấp ( $\sim 10^9$  pfu/ml) được tạo từ thư viện cDNA sơ cấp xử lý stress của lúa PB1. 33 thể đồng biến nạp (mang vector pGBKT7/NLI-IF và pAD-GAL4-cDNA) sinh trưởng mạnh nhất được chọn lọc từ 537 khuẩn lạc dương tính xuất hiện trên môi trường SD-His/-Leu/-Trip được sàng lọc lần hai trên môi trường SD-His/-Leu/-Trip/-Ade. Sử dụng phương pháp đánh giá hoạt tính của  $\beta$ -Galactosidase để sàng lọc 27 thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường sàng lọc thứ cấp, 19 thể biến nạp có biểu hiện của gen thông báo *lacZ*. Sử dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc kích thước 19 dòng cDNA thu được, 8 dòng cDNA có kích thước >500 bp được chọn lọc, nhân dòng vào vector nhân dòng pGEMT và giải trình tự như đã mô tả trong nghiên cứu trước đây [9].

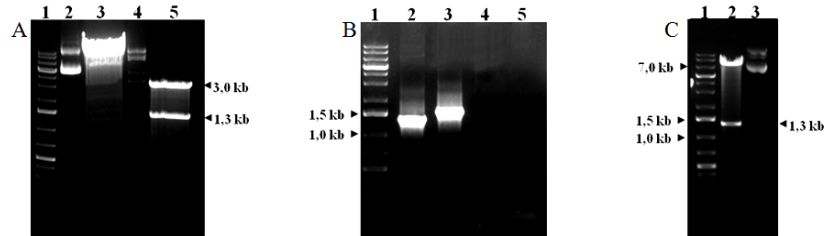
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Thiết kế vector biểu hiện trong nấm men mang trình tự mã hóa NLI-IF

Khi phân lập trình tự mã hóa NLI-IF có kích thước 1320 bp từ thư viện cDNA, chúng tôi đã sử dụng cặp môi được thiết kế mang 2 vị trí nhận biết của *EcoRI* và *XhoI* [9]. Do đó, để đưa trình tự gen *NLI-IF* vào vector biểu hiện pAD-GAL4 và pGBKT7, chúng tôi đã xử lý đồng thời các vector pGEMT/NLI-IF và pAD-GAL4

với *EcoRI/XhoI* (hình 1A), pGEMT/NLI-IF và pGBKT7 với *PstI/NcoI* (hình 2A). Sau khi tinh sạch sản phẩm cắt giới hạn từ gel agarose bằng bộ kit Gel Extraction Kit (Fermentas), trình tự mã hóa NLI-IF được chèn vào vị trí đa điểm cắt

của vector biểu hiện bằng enzyme T4 ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ . Các khuẩn lạc dương tính được chúng tôi sàng lọc bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu của *NLI-IF*.

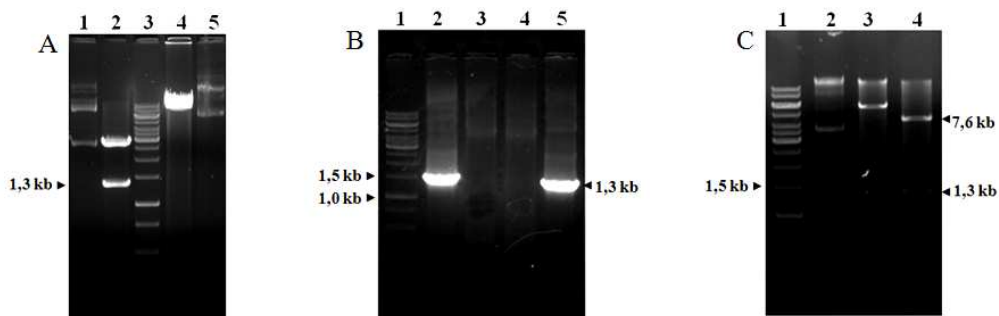


Hình 1. Kết quả ghép nối trình tự mã hóa NLI-IF vào pAD-GAL4

A. Kết quả điện di sản phẩm sản phẩm cắt giới hạn pGEMT/NLI-IF (giếng 4 và 5) và pAD-GAL4 (giếng 2 và 3) bằng *EcoRI/XhoI*, giếng 2 và 4: vector nguyên bản, giếng 3 và 5: sản phẩm cắt giới hạn; B. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra vector pAD-GAL4/NLI-IF, sử dụng cặp mồi đặc hiệu của *NLI-IF* (giếng 2 và 4) và cặp mồi AD-Fw/AD-Rv (giếng 3 và 5), giếng 2 và 3: khuôn là pAD-GAL4/NLI-IF, giếng 4 và 5: đối chứng âm (không có DNA khuôn); C. Kết quả cắt giới hạn kiểm tra pAD-GAL4/NLI-IF bằng *EcoRI/XhoI*.

Kết quả kiểm tra plasmid tinh sạch từ các thể biến nạp dương tính bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu vector (AD-Fw/AD-Rv đối với vector pAD-GAL4 và BD-Fw/BD-Rv đối với vector pGBKT7) và cặp mồi đặc hiệu gen *NLI-Fw/NLI-Rv* chúng tôi đã thu được sản phẩm có kích thước tương ứng lần lượt là 1,5 kb (hình 1B-giếng 3 và hình 2B-giếng 2) và 1,3 kb (hình 1B-giếng 2 và hình 2B-giếng 5) đúng với kích thước tính toán lí thuyết. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pAD-GAL4/NLI-IF bằng phản ứng cắt giới

hạn với *EcoRI/XhoI*, chúng tôi thu được 2 băng DNA có kích thước 1,3 kb (tương ứng với trình tự mã hóa *NLI-IF*) và 7,6 kb (tương ứng với khung vector pAD-GAL4) (hình 1C, giếng 1). Kết quả tương tự thu được khi kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGBKT7/NLI-IF bằng phản ứng cắt giới hạn với *NcoI* (hình 2C-giếng 2) và *PstI/NcoI* (hình 2C-giếng 3). Các kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã gắn thành công trình tự mã hóa nhân tố phiên mã *NLI-IF* vào vector biểu hiện pAD-GAL4 và pGBKT7.



Hình 2. Kết quả ghép nối trình tự mã hóa NLI-IF vào pGBKT7

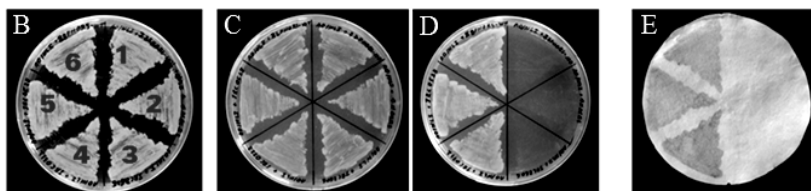
A. Kết quả điện di sản phẩm sản phẩm cắt giới hạn pGEMT/NLI-IF (giếng 1 và 2) và pGBKT7 (giếng 4 và 5) bằng *PstI/NcoI*, giếng 1 và 5: vector nguyên bản, giếng 2 và 4: sản phẩm cắt giới hạn; B. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra vector pGBKT7/NLI-IF, sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen (giếng 2 và 3) và cặp mồi vector (giếng 4 và 5), giếng 2 và 4: khuôn là pGBKT7/NLI-IF, giếng 3 và 4: đối chứng âm (không có DNA khuôn); C. Kết quả cắt giới hạn kiểm tra pGBKT7/NLI-IF bằng *PstI/NcoI* (giếng 4) và *NcoI* (giếng 3).

### Nghiên cứu khả năng liên kết DNA *in vivo* trong tế bào nấm men của NLI-IF

Trong một nghiên cứu trước, chúng tôi đã phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã NLI-IF bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men, sử dụng 2 trình tự đích 50 nucleotide là trình tự lõi của 2 promoter JRC0332 và JRC0528, có cùng một yếu tố *cis*-acting nằm trong vùng hoạt hóa (hộp TATA) có trình tự *CCTCCTCC* [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục sử dụng kỹ thuật lai phân tử

*in vivo* trong tế bào nấm men để xác định khả năng liên kết đặc hiệu *in vivo* của NLI-IF với trình tự đích. Để thực hiện mục đích này, chúng tôi đã biến nạp plasmid dung hợp pAD-GAL4/NLI-IF vào chủng tế bào nấm men tái tổ hợp có hai gen thông báo (*HIS* và *lacZ*) đã được dung hợp với một promoter chứa 2 trình tự lặp lại của trình tự DNA đích (JRC0332 hoặc JRC 0528) đã bị thay thế yếu tố *cis*-acting *CCTCCTCC* bằng AAAAAAAAAA (hình 3A).

A JRC0332 – WT: CGAAAACGGAACGCCCCCTCCTCCCTCTCCACGTCACTGCGCGGT  
 JRC0332 – MU: CGAAAACGGAACGCCCCCTCCTCCCTCTCCACGTCACTGCGCGGT  
 JRC0528 – WT: GTGGCCTCGCCTCCTCTCTTCTCCACTCCACCACCCACCCGCCCGG  
 JRC0332 – MU: GTGGCCTCGAAAAAAAACTTCTCCACTCCACCACCCACCCGCCCGG



Hình 3: Kết quả đánh giá biểu hiện của gen thông báo trong tế bào nấm men tái tổ hợp

A. Trình tự DNA đích nguyên bản (WT) và trình tự DNA đích đột biến (MU) đã thay trình tự lõi *CCTCCTCC* bằng poly-A; B. Nuôi cấy trên môi trường YPD; C. Nuôi cấy trên môi trường SD-His-/Leu/-Ura; D. Nuôi cấy trên môi trường SD-His-/Leu/-Ura có bổ sung 3-AT 10 mM; E. Đánh giá hoạt tính  $\beta$ -galactosidase; 1. Đối chứng âm (YM4271 + pHis/pLac/pAD-GAL4); 2. JRC0332-MU; 3. JRC0528-MU; 4. JRC0528-WT; 5. JRC0332-WT; 6. Đối chứng dương.

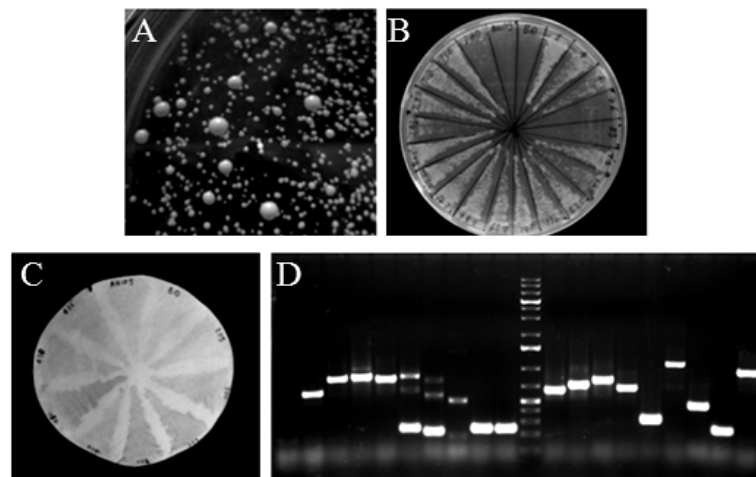
Các tế bào nấm men tái tổ hợp có thể sinh trưởng bình thường trên môi trường thiếu histidine (hình 3B), tuy nhiên, khi có bổ sung chất ức chế cạnh tranh 3-AT nồng độ 10 mM vào môi trường chọn lọc, chỉ có các tế bào mang gen thông báo được dung hợp với trình tự đích nguyên bản (WT) mới có khả năng sinh trưởng bình thường (hình 3D). Ngoài ra, hoạt tính  $\beta$ -galactosidase cũng chỉ biểu hiện ở những tế bào nấm men mang trình tự đích nguyên bản (hình 3E). Kết quả nghiên cứu *in vivo* này chứng tỏ NLI-IF liên kết đặc hiệu với yếu tố *cis*-acting *CCTCCTCC* nằm trong trình tự đích của 2 promoter JRC0332 và JRC0528, không liên kết với trình tự poly-A hay đầu 5' và 3' của trình tự đích.

### Sàng lọc protein tương tác với NLI-IF từ thư viện cDNA xử lý stress

Chúng tôi sử dụng phương pháp sàng lọc thư viện cDNA bằng phép lai phân tử trong tế bào nấm men (yeast two hybrid) để xác định protein tương tác với NLI-IF. Chúng tôi đã biến nạp plasmid tái tổ hợp pGBKT7 mang gen *NLI-IF* vào tế bào nấm men AH109 và sử dụng chủng nấm men tái tổ hợp này để sàng lọc thư viện cDNA. Sau khi sàng lọc thư viện cDNA, chúng tôi đã thu được 8 dòng tế bào nấm men tái tổ hợp mang các đoạn cDNA có kích thước > 500 bp, có khả năng sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc khuyết dưỡng axit amin (SD -His/-Trip/-Leu/-Ade) và có biểu hiện hoạt tính  $\beta$ -galactosidase (hình 4). Các dòng cDNA này được chúng tôi nhân dòng vào vector pGEMT để giải trình tự và so sánh với các trình tự đã công bố trên GeneBank (bảng 1).

**Bảng 1.** Các dòng cDNA mã hóa protein tương tác với NLI-IF được phân lập bằng kỹ thuật Y2H

Dòng cDNA	Protein được mã hóa
C201	Polyubiquitin
C239	Protein kép chứa domain phosphatase đặc hiệu cho protein
C246	Protein liên kết kẽm, thuộc nhóm Alcohol dehydrogenase
C265	Protein chưa được công bố
C284	Protein liên kết chlorophyll a/b nhóm I, tiền chất của chloroplast
C314	Polyubiquitin
C370	Cyclophilin 2
C410	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase

**Hình 4:** Kết quả sàng lọc protein tương tác với NLI-IF từ thư viện cDNA

A. Sàng lọc trên môi trường SD-His/-Leu/-Trip có bổ sung 3-AT 10 mM; B. Sàng lọc trên môi trường SD-His/-Leu/-Trip/-Ade có bổ sung 3-AT 10 mM; C. Đánh giá hoạt tính  $\beta$ -galactosidase; D. Sàng lọc bằng PCR với cặp mồi AD-Fw/AD-Rv.

Đặc biệt, kết quả thu được cho thấy, NLI-IF có tương tác với protein ubiquitin, một protein có vai trò tham gia vào quá trình phiên mã, sửa chữa DNA và đáp ứng stress. Kết quả này củng cố thêm cho giả thuyết của chúng tôi về khả năng NLI-IF là một nhân tố phiên mã có tham gia vào đáp ứng stress ở thực vật.

#### KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật lai phân tử trong tế bào nấm men, chúng tôi đã chứng minh khả năng liên kết đặc hiệu với trình tự DNA đích có chứa yếu tố *cis*-acting CCTCCTCC của NLI-IF. Chúng tôi cũng đã phân lập được 8 dòng cDNA từ thư viện cDNA xử lý hạn mã hóa cho các protein có tương tác với NLI-IF. Các kết quả thu được củng cố thêm cho giả thuyết của chúng tôi về

protein NLI-IF là một nhân tố phiên mã tham gia vào quá trình chống chịu stress của thực vật.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.
2. Baker S. S., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting element that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 24: 701-713.
3. Bartel P. L., Chien C. T., Sternglanz R.,

- Fields S., 1993. Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions. In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford), 153-179.
4. Chien C. T., Bartel P. L., Sternglanz R., Fields S., 1991. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Nat. Acad. Sci., 88: 9578-9582. USA.
  5. Choi H., Hong J. H., Ha J., Kang J. Y., Kim S. Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element-binding factor. J. Biol. Chem., 275: 1723-1730.
  6. Guiltinan M. J., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. Science, 250: 267-271.
  7. Jiang C., Lu B., Singh J., 1996. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus. Plant Mol. Biol., 30: 679-684.
  8. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and 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.
  9. Nguyễn Duy Phuong, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội, 2012. Thiết kế thư viện ADNc chịu hạn ở lúa và phân lập gen NLI-IF1 bằng kỹ thuật sàng lọc phép lai đơn trong tế bào nấm men. Tạp chí sinh học, 34(1): 114-122.
  10. Pham X. H., Tran T. T., 2009. Identification and sequence analysis of a DREB subfamily transcription factor involved in drought stress tolerance from rice. J. Biol., 31(4): 74-81.
  11. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7.19-7.22.
  12. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J. Exp. Bot., 58: 221-227.
  13. Thomashow M. F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50: 571-599.
  14. Tran L. S., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S. D., 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(9): 2481-98.
  15. Tran L. S., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci., 104: 20623-20628. USA.
  16. Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 11632-11637. USA.
  17. Wang M. M., Reed R. R., 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. Nature, 364: 121-126.
  18. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell, 6: 251-264.
  19. Clontech. Yeast Protocols Handbook. [http://www.clontech.com/xxclt\\_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17602](http://www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17602)
  20. [http://www.clontech.com/xxclt\\_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17602&minisite=10021&sectId=14852](http://www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17602&minisite=10021&sectId=14852).

**EXPRESSION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF NOVEL  
STRESS-INVOLVED TRANSCRIPTION FACTOR NLI-IF IN RICE**

**Nguyen Duy Phuong, Najaren Tuteja, Pham Xuan Hoi**

Agricultural Genetic Institute

**SUMMARY**

We reported previously that one transcription factor NLI-IF (Nuclear LIM interactor-interacting factor)-encoded cDNA clone was identified by yeast one hybrid assay, using 2 target sequences JRC0528 and JRC0332. In this paper we reported some results of *in vivo* analysis of *NLI-IF*. The core sequence-specific DNA binding ability of NLI-IF was identified, using yeast one hybrid assay. To identify of protein-protein interaction, the rice stress-treated cDNA library was screened using yeast two hybrid assay and 8 cDNA clones were isolated. These results support to our expectation that transcription factor NLI-IF is involved in stress responses in plant.

*Keywords:* DNA target sequence, Drought tolerance, NLI-IF, transcription factor, yeast one hybrid, yeast two hybrid.

*Ngày nhận bài:* 9-5-2012