

大豆 *GmbZIP71* 基因的克隆及 EMSA 分析

刘晓兵<sup>1</sup>, 南海洋<sup>2</sup>, 袁晓辉<sup>2</sup>, 刘宝辉<sup>2</sup>, 孔凡江<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省种子管理局, 黑龙江 哈尔滨 150008; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/大豆分子设计育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:**通过 PCR 扩增的方法从大豆品种 Harosoy 中克隆到 1 个新的 bZIP 基因 (*GmbZIP71*), 基因表达分析表明 *GmbZIP71* 在叶片、生长点、花、花芽、荚和根等多个器官中表达。将 *GmbZIP71* 构建到原核表达载体 pET29b 上, 导入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 对其进行 IPTG 诱导。结果表明: 在 IPTG 浓度为 0.25 mmol · L<sup>-1</sup>, 诱导时间为 4 h, 诱导温度为 28℃ 时, 重组蛋白得到表达, 分子量大约为 48 kDa, SDS - PAGE 电泳结果表明重组蛋白主要以包涵体形式存在, 用 His 蛋白纯化系统回收得到 *GmbZIP71* - His 重组蛋白, EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 实验表明 *GmbZIP71* 重组蛋白可以在体外与 ACGT 顺式作用元件结合。

**关键词:**大豆; *bZIP*; 原核表达; EMSA

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0032

Expression Analysis and EMSA of Soybean *GmbZIP71* Gene

LIU Xiao - bing<sup>1</sup>, NAN Hai - yang<sup>2</sup>, YUAN Xiao - hui<sup>2</sup>, LIU Bao - hui<sup>2</sup>, KONG Fan - jiang<sup>2</sup>

(1. The Seed Management Bureau of Heilongjiang Province, Harbin 150008, China; 2. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences/The Key Laboratory of Soybean Molecular Design Breeding, Harbin 150008, China)

**Abstract:** Using PCR amplification method, we cloned a new bZIP homolog which named *GmbZIP71* in soybean cultivar Harosoy, RT - PCR showed that *GmbZIP71* transcribed in multiple organs such as leaves, shoot apices, flowers, flower buds, pods and roots. *GmbZIP71* was constructed into prokaryotic expression vector pET29b and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to get the expression protein for further study. The results indicated that an 48 kDa recombinant protein was expressed with the treatment of 0.25 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG for 4 h at 28℃, the recombinant protein was confirmed to be mainly existed in inclusion body form by SDS - PAGE. The high - quality recombinant protein was obtained through His - tag nickle column purification system and the EMSA experiment indicated that *GmbZIP71* protein could bind with ACGT cis - element *in vitro*.

**Keywords:** Soybean; bZIP; Prokaryotic expression; EMSA

碱性亮氨酸拉链 (Basic region/leucine zipper motif, bZIP) 转录因子由 DNA 结合结构域和亮氨酸拉链二聚体这两个基本结构域组成, 是转录因子中较大的基因家族, 同时 bZIP 蛋白还是真核生物转录因子中分布最广且最保守的类型之一<sup>[1]</sup>。拟南芥 bZIP 转录因子研究得比较深入且成果显著。Jakoby 等<sup>[2]</sup> 将拟南芥 75 个 bZIP 分成了 10 类, 这 10 类 bZIP 转录因子分别参与调控组织分化、细胞生长、糖代谢、生物和非生物胁迫等多个生物过程。大豆不仅是世界上 70% 可食用蛋白的来源, 也是植物蛋白、维生素、矿物质和脂类等的天然资源。然而低温、干旱、土壤盐渍化和病害等不良环境因子严重地影响了大豆的生长发育, 造成了巨大的经济损失。因此, 研究大豆 bZIP 转录因子对大豆抗逆性状的改良具有重要的理论和实际意义。根据生物信息学网站 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 的预测结果, 大豆中有约 266 个 bZIP 转录因子, 其中一些 *GmbZ-*

*IP* 基因已经被克隆, 他们主要在大豆的 ABA 信号途径中起作用, 并提高转基因植株的抗旱性、耐冷以及耐盐碱性等<sup>[3-7]</sup>。本实验室从大豆品种 Harosoy 中克隆到一个编码 bZIP 蛋白的基因, 命名为 *GmbZIP71*。为了更好地在蛋白水平上研究 *GmbZIP71* 的功能, 将其构建到原核表达载体 pET29b 上, 对其进行诱导并对重组蛋白进行纯化, 以期为进一步蛋白的活性分析、抗体的制备、蛋白起作用的分子机制等研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种 Harosoy 由中国科学院东北地理与农业生态研究所提供。原核表达载体 pET29b 由东北农业大学大豆研究所张淑珍教授惠赠。pEASY - T1 载体、大肠杆菌 DH5α 菌株、大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株购自全式金公司; 各种限制性内切酶和 T4 连

收稿日期: 2014 - 03 - 21  
基金项目: 国家自然科学基金 (31071445, 31171579, 31201222 和 31371643); 黑龙江省自然科学基金 (ZD201001, JC201313); 中国科学院“百人计划”。

第一作者: 刘晓兵 (1974 -), 男, 高级农艺师, 主要从事种子生物学研究。E - mail: 13936161608@163.com。

通讯作者: 孔凡江 (1972 -), 男, 博士, 研究员, 博导, 主要从事大豆分子遗传学研究。E - mail: kongfj@iga.ac.cn。

接酶均购自 NEB 公司;DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司;低分子量蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司;裂解菌体的上清蛋白裂解液、包涵体蛋白裂解液以及 His - tag 融合蛋白纯化试剂盒购自康为世纪公司;DNA Marker 购自东盛公司;EMSA 试剂盒 ( #E33075 ) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 *GmbZIP71* 基因的克隆 根据 *GmbZIP71* ( Glyma06g04350 ) 基因序列设计引物,并分别在其上下游引入酶切位点 *Nde*I 和 *Sal*I,引物序列如下:

*GmbZIP71* - 29b - F1:CATATGATGAATTTCAAGAGC,  
*GmbZIP71* - 29b - R1:GTCGACCCATGGACCAGTTTGTGTTTCG。

将带有酶切位点的 *GmbZIP71* 片段连接到 pEASY - T1 载体上,菌落 PCR 筛选阳性克隆,阳性克隆摇菌并提取质粒送至英骏公司测序,对序列比对分析,测序正确的质粒用于后续实验。

1.2.2 融合表达载体的构建 将测序正确的质粒 ( *GmbZIP71* - pEASY - T1 ) 与 pET29b 空载体质粒同时用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段 *GmbZIP71* 和线性化的载体片段,用 T4 连接酶将 *GmbZIP71* 定向连接到 pET29b 载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经菌落 PCR 和重组质粒双

酶切鉴定后,挑取阳性克隆并提取质粒,转化大肠杆菌 BL21 ( DE3 ) 用于检测 *GmbZIP71* 蛋白的表达情况。

1.2.3 重组蛋白的表达 将含有 *GmbZIP71* 重组子的 BL21 ( DE3 ) 菌株于接种于 10 mL LB 液体培养基中 ( 含 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 卡那霉素 ), 28 $^{\circ}$ C 下培养至 A<sub>600</sub> 为 0.5 ~ 0.6 时加 IPTG 至终浓度 0.25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 诱导表达,在诱导 1,2,3,4 h 后分别取 1 mL 菌液。以同样方法于 28 $^{\circ}$ C 下诱导含空质粒 pET29b 作对照。将菌液 1 mL 离心收集菌体,倒掉上清,用 100  $\mu$ L 上清蛋白裂解液重悬菌体,离心取上清作可溶性蛋白检测,将沉淀继续用包涵体裂解液重悬,离心后取上清作包涵体蛋白检测。将上清蛋白与包涵体蛋白在 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸 10 min,上样至 12% SDS - PAGE 胶电泳,考马斯亮蓝 R250 染色观察结果。

1.2.4 重组蛋白的纯化及 EMSA 收集 50 mL 诱导后的菌体,用超声波破碎菌液至透明清亮状态,离心取上清并利用 His - tag 蛋白纯化试剂盒对其进行纯化。人工合成包含 ACGT 及 CArG - box 核心序列的 40 bp 正反向引物 ( 表 1 ), 98 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后缓慢冷却至双链探针,将纯化后的 *GmbZIP71* 蛋白与探针室温条件下结合 20 min 后,按照 Invitrogen 的 EMSA 试剂盒标准操作步骤。

表 1 包含 ACGT 及 CArG - box 核心序列的引物

Table 1 The primer sequences contained the ACGT and CArG core sequence

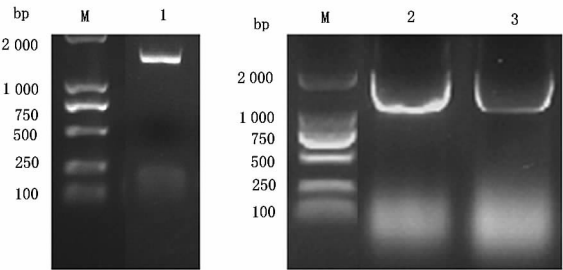
引物名称	引物序列 ( 5' - 3' )
Primer	Primer sequence ( 5' - 3' )
ACGT - F	F: CGCGTGTACGCGTACCA <u>ACGT</u> TATCCCAATTCCATAAGAAAT
ACGT - R	R: ATTTCTTATGGAATTGGGATA <u>ACGT</u> GGTACGCGTACACGCC
CArG - F	F: GCAACCATCCATCCAAAAATAAGGCAAAAAATAAACAT
CArG - R	R: ATGTTTATTTTTCCTTATTTTGGATGGATGCGTTGC

下划线表示探针的核心序列。  
Underline in primer sequence highlights the core sequence of probes.

2 结果与分析

2.1 *GmbZIP71* 基因的克隆

根据大豆基因组序列网站 ( <http://www.phytozome.net/soybean> ) 中 Glyma06g04350 编码区序列设计引物,以大豆品种 Harosoy 的 cDNA 为模板,PCR 增得到了单一条带,大小约 1.3 kb 的 PCR 产物 ( 图 1 ), 该片段与预期 PCR 产物长度一致。将该片段连接到 pEASY - T1 载体上,并对重组质粒进行测序,测序后翻译成氨基酸序列到 NCBI 上 BLAST 发现该基因与大豆 EST 序列 ( PREDICTED: Glycine max transcription factor *bZIP71*, mRNA ) 完全匹配,所以将该基因命名为 *GmbZIP71*。



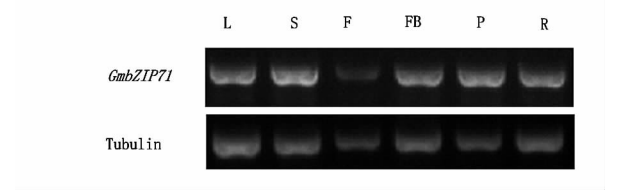
M: DNA Marker; 1: *GmbZIP71* 的 PCR 产物; 2 ~ 3: *GmbZIP71* 的菌落 PCR 检测。  
M: DNA Marker; 1: PCR products of *GmbZIP71*; 2 - 3: *GmbZIP71* of colony PCR.

图 1 *GmbZIP71* 基因的克隆及菌落 PCR

Fig. 1 PCR product and colony PCR of *GmbZIP71*

2.2 *GmbZIP71* 基因的表达分析

分别对短日照条件下(12 L/12 D)种植的 Ha-ros soy 叶片、生长点、花、花芽、荚和根等器官取样,提取 RNA 并反转录合成 cDNA,设计 RT-PCR 引物进行表达分析发现 *GmbZIP71* 在这些器官中的表达量都很高(图 2),说明 *GmbZIP71* 基因可能在大豆的不同发育过程中起作用。

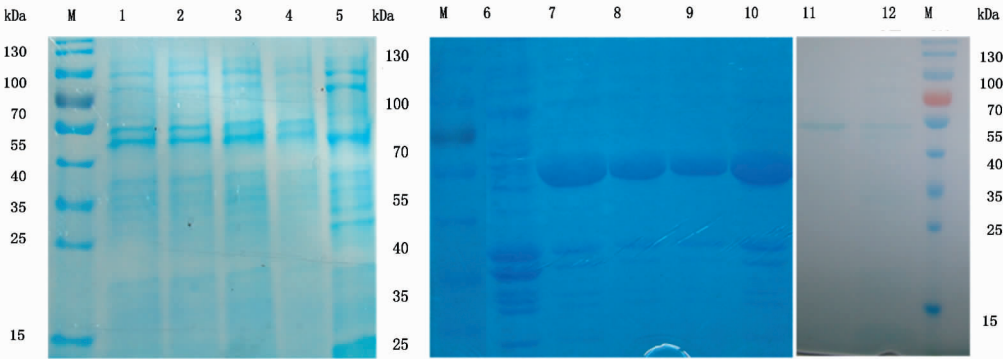


L: 叶片; S: 生长点; F: 花; FB: 花芽; P: 荚; R: 根。  
L: Leaves; S: Shoot apex; F: Flower; FB: Flower bud; P: Pod, R: Roots.

图 2 大豆 *GmbZIP71* 的组织特异性表达  
Fig.2 The tissue specific RT-PCR of *GmbZIP71*

2.3 *GmbZIP71* 原核表达载体的构建

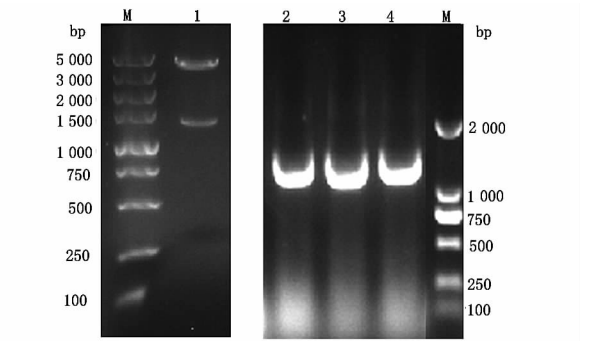
用 T4 DNA 连接酶将经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切并纯化后的 *GmbZIP71* 片段和 pET29b 质粒连接,构建重组子 pET29b - *GmbZIP71*,并用双酶切和 PCR 方法对重组子进行鉴定(图 3)。经双酶切得到约 5 kb 的 pET29b 载体片段和约 1.3 kb 的 *GmbZIP71* 片段;PCR 检测同样得到为 1.3 kb 左右的条带。测序结果显示 *GmbZIP71* 基因 C 端与 pET29b 载体的 His-tag 编码区融合(未发生移码现象),表明 pET29b - *GmbZIP71* 原核表达载体构建成功。



M: 蛋白 Marker; 1: 28℃ 诱导 1 h 的 *GmbZIP71* 总可溶性蛋白; 2: 28℃ 诱导 2 h 的 *GmbZIP71* 总可溶性蛋白; 3: 28℃ 诱导 3 h 的 *GmbZIP71* 总可溶性蛋白; 4: 28℃ 诱导 4 h 的 *GmbZIP71* 总可溶性蛋白; 5: 28℃ 诱导 3 h 的 pET29b 总可溶性蛋白; 6: 28℃ 诱导 3 h 的 pET29b 的包涵体蛋白; 7: 28℃ 诱导 1 h 的 *GmbZIP71* 包涵体蛋白; 8: 28℃ 诱导 2 h 的 *GmbZIP71* 包涵体蛋白; 9: 28℃ 诱导 3 h 的 *GmbZIP71* 包涵体蛋白; 10: 28℃ 诱导 4 h 的 *GmbZIP71* 包涵体蛋白; 11-12: 纯化的 *GmbZIP71* 蛋白。  
M: Protein Marker; 1: Total soluble proteins of *GmbZIP71* induced 1 h at 28℃; 2: Total soluble protein of *GmbZIP71* induced 2 h at 28℃; 3: Total soluble protein of *GmbZIP71* induced 3 h at 28℃; 4: Total soluble protein of *GmbZIP71* induced 4 h at 28℃; 5: Total soluble protein of pET29b induced 3 h at 28℃; 6: Total dissoluble protein of pET29b induced 3 h at 28℃; 7: Total dissoluble protein of *GmbZIP71* induced 1 h at 28℃; 8: Total dissoluble protein of *GmbZIP71* induced 2 h at 28℃; 9: Total dissoluble protein of *GmbZIP71* induced 3 h at 28℃; 10: Total dissoluble protein of *GmbZIP71* induced 4 h at 28℃; 11-12: Purified *GmbZIP71* recombinant protein.

图 4 *GmbZIP71* - His 重组蛋白的诱导表达及纯化

Fig.4 Purification of the expressed *GmbZIP71* - His recombinant proteins



M: DNA Marker; 1: *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pET29b - *GmbZIP71* 质粒的产物; 2~4: pET29b - *GmbZIP71* 重组质粒的菌落 PCR 检测。

M: DNA marker; Lane 1: Products of pET29b - *GmbZIP71* digested with *Nde* I / *Sal* I ; Lane 2 - 4: Colony PCR of pET29b - *GmbZIP71* recombinant plasmid.

图 3 pET29b - *GmbZIP71* 的双酶切鉴定和菌落 PCR 鉴定  
Fig.3 Product double restriction analysis and colony PCR of pET29b - *GmbZIP71*

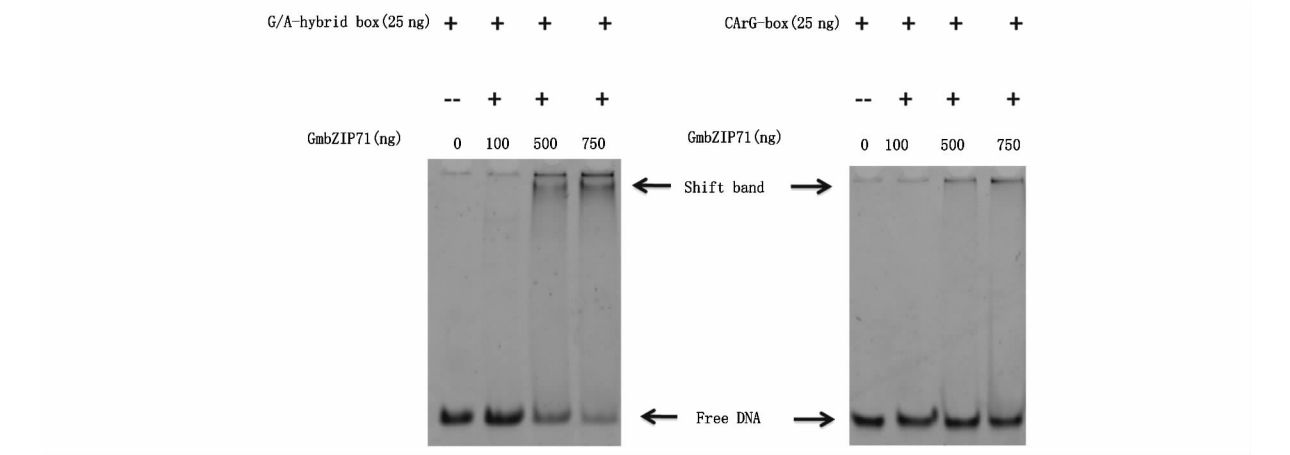
2.4 *GmbZIP71* 蛋白表达形式的分析

为了进一步确定 *GmbZIP71* 在大肠杆菌中的存在形式,分别对上清及包涵体中的蛋白进行检测。发现转化重组质粒 pET29b - *GmbZIP71* 的 BL21 (DE3) 在加入 0.25 mmol · L<sup>-1</sup> 的 IPTG 后的 1~4 h 都有目标蛋白的表达(图 4),然而沉淀中的蛋白量远远大于上清,说明 *GmbZIP71* 蛋白主要以包涵体形式存在。由于包涵体蛋白大多失去了原有的生物学活性,利用 His-tag 蛋白纯化系统富集了具有生物学功能的 *GmbZIP71* 可溶性蛋白(图 4)。

2.5 *GmbZIP71* 蛋白的体外结合试验

bZIP 转录因子通过与下游基因启动子区 G - box 和 A - box 以及杂合的 G/A - box 顺式元件结合, 调控下游基因的表达, 参与相关生物及非生物胁迫应答反应<sup>[8-10]</sup>。本研究采用凝胶迁移率实验(EMSA)分析了 *GmbZIP71* 与 G/A - box 和 CArG - box 的

结合情况。结果表明, *GmbZIP71* 能够结合 G/A - box 的 ACGT 核心序列, 但无法结合 CArG - box (图 5)。推测 *GmbZIP71* 通过特异结合 G/A - box 等含有 ACGT 核心序列的顺式元件以调节下游目标基因的表达。



在 DNA 与蛋白的结合反应中 G/A - hybrid box 和 CArG - box 分别加入 25 ng, *GmbZIP71* 蛋白加入 0, 0.1, 0.5, 0.75  $\mu$ g。  
The amounts of G/A - hybrid box and CArG - box are 25 ng, incubated with 0, 0.1, 0.5, and 0.75  $\mu$ g target protein, respectively.

图 5 *GmbZIP71* 结合 G/A - hybrid box 和 CArG - box 元件的 EMSA 分析  
Fig. 5 EMSA analysis of the bindings between the *GmbZIP71* and G/A - hybrid box and CArG - box

3 讨 论

一些 bZIP 类转录因子在植物根组织中高丰度表达,而在茎和叶中的表达量很低,甚至不表达,如拟南芥 *TGA1*、*OBF4* 和烟草 *TGALa*<sup>[11-13]</sup>。但本研究发现 *GmbZIP71* 不仅在根中表达量高,在生长点、花芽和花器官中的表达量也很高,说明 *GmbZIP71* 可能在大豆的花发育过程中发挥特殊作用,在大豆每个器官中都高丰度表达说明了 *GmbZIP71* 不具有组织特异性表达模式。

bZIP 转录因子是一类具有 DNA 结合结构域和亮氨酸拉链结构的转录因子, bZIP 几乎存在于所有的真核生物中,但在植物中的成员最多<sup>[14]</sup>。在大豆中分离到许多与生物胁迫相关的 bZIP 转录因子,大豆 *GmbZIP44*、*GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 作为 ABA 信号途径中的负调控因子提高转基因拟南芥的耐盐性及耐低温特性;大豆 *GmbZIP132* 受到干旱和高盐胁迫的诱导,过表达 *GmbZIP132* 的拟南芥表现出低 ABA 敏感性和高失水率;过表达 *GmbZIP1* 提高了拟南芥和烟草的抗旱性,耐盐性及耐低温特性; *GsbZIP33* 是从野生大豆 (*Glycine soja*) 中克隆的,过表达 *GsbZIP33* 的拟南芥对高盐胁迫的敏感性提高<sup>[3-7]</sup>,但是这些 bZIP 转录因子起作用的分子机制却仍是未知的。在植物组织中,ABA 和一些非生物胁迫如

干旱和高盐等都通过包括 ABRE (ABA responsive elements) 在内的顺式元件诱导基因表达,此外 bZIP 蛋白的磷酸化对于其与 ABRE 的结合至关重要<sup>[15-20]</sup>。我们通过原核表达获得具有生物学活性的大豆 *GmbZIP71* 蛋白,体外的结合试验证明 *GmbZIP71* 的 bZIP 结构域能够结合 G/A - box 的 ACGT 核心序列,为研究大豆 *GmbZIP71* 基因的功能和大豆 bZIP 转录因子起作用的分子机制奠定了基础。

参考文献

[1] Glover J M, Harrison S C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c - Fos - c - Jun bound to DNA [J]. Nature, 1995, 373: 257 - 261.  
[2] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in Arabidopsis [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7 (3): 106 - 111.  
[3] Liao Y, Zhang J S, Chen S Y, et al. Role of soybean *GmbZIP132* under abscisic acid and salt stresses [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(2): 221 - 230.  
[4] Liao Y, Zou H F, Wei W, et al. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. Planta, 2008, 228(2): 225 - 240.  
[5] Gao S Q, Chen M, Xu Z S, et al. The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(6): 537 - 553.

[11] 汲逢源,王戈亮,许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响[J]. 植物生态学报,2006,30(2):330-333. (Ji F Y, Wang G L, Xu Y N. The effects of antioxidants on the transient exprssion of *GUS* gene in soybean hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Plant Ecology, 2006, 30(2):330-333. )

[12] 钱雪艳,郭东全,杨向东,等. 超声波辅助农杆菌介导转化大豆未成熟胚的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):658-661. (Qian X Y, et al. Study on ultrasonic - assisted *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean immature cotyledons[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(2):658-661. )

[13] Okpuzor J, Omidiji O. Peroxidase - polyphenol oxidase association in *dioscorea esculenta* [J]. Zeitschrift fur Naturforschung C, 1998, 53(11-12): 957-960.

[14] 黄益宗. 植物对硼元素不足的反应及其成因探讨[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4):434-438. (Huang Y Z. Plant response to boron deficiency and origin of formation[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(4):434-438. )

[15] 刘鹏,徐根娣,赵娅儿. 锰、硼对大豆几种生理效应的影响[J]. 中国油料作物学报,2003,25(4): 73-76. (Liu P, Xu G D, Zhao Y E. Effect of boron and manganese on some physiological characteristics of soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(4): 73-76.

[16] 胡倩倩,方星,王建国,等. 硼营养对大豆组织再生其及农杆菌介导的遗传转化效率的影响[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 445-448. (Hu Q Q, Fang X, Wang J G, et al. Effect of boron on the explant regeneration and the frequency on *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean[J]. Soybean Science, 2013, 32(4):445-448. )

[17] Matoh T, Kawaguchi S, Kobayashi M. Ubiquity of a boraterhamno - galacturonan II complex in the cell walls of higher plants[J]. Plant Cell Physiology,1996, 37:636-640.

[18] Matoh T. Boron in plant cell walls[J]. Plant and Soil, 1997, 193:59-70.

[19] Lin Y J, Zhang Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23:540-547.

[20] Carstensen E L. Biological effects of acoustic cavitation[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 1986, 12(9): 703-704.

[21] 葛正珍,杨光宇,仲艳,等. 硼对大豆愈伤组织的细胞结构及形态的影响[J]. 大豆科学,2009,28(2):225-228. (Ge Z Z, Yang G Y, Zhong Y, et al. Effect of boron on cell structure and shape in soybean (*Glycine max*) callus] [J]. Soybean Science, 2009, 28(2):225-228. )

(上接第 35 页)

[6] 才华,朱延明,柏锡,等. 野生大豆 *GsbZIP33* 基因的分离及胁迫耐性分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 397-401. (Cai H, Zhu Y M, Bai X, et al. Isolation and tolerance analysis of *GsbZIP33* gene linked to response on stress in *Glycine soja* [J]. Molecular Plant Breeding, 2011, 9(4): 397-401)

[7] Xu L, Xu Z, Liu X, et al. The subcellular localization and ectopic expression analysis in *Arabidopsis* of soybean *GmbZIP60* gene[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2013: 10. 1007/s13562-013-0228-4.

[8] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements[J]. The FASEB Journal, 1994, 8(2): 192-200.

[9] Izawa T, Foster R, Chua N H. Plant bZIP protein - DNA binding - specificity[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 230(4): 1131-1144.

[10] Martinez - Garcia J F, Moyano E, Alcocer M J C, et al. Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C - box/G - box motif and help to define a new subfamily of bZIP transcription factors[J]. The Plant Journal, 1998, 13(4): 489-505.

[11] Xiang C, Miao Z, Lam E. DNA - binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34: 3-15.

[12] Grigoryan G, Keating A E. Structure - based prediction of bZIP partnering specificity[J]. Journal Molecular Biology, 2006, 355(5): 25-42.

[13] Terzaghi W B, Bertekap R L, Cashmore A R. Intracellular localization of GBF proteins and blue light - induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured *Arabidopsis* and soybean cells[J]. The Plant Journal, 1997, 11(5): 67-82.

[14] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors:Genome wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290: 2105-2110.

[15] Paulo S S, Fábio T S, Nogueira, et al. Identification of new ABA - and MEJA - activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database[J]. Plant Cell Report, 2008, 27: 335-345.

[16] Guiltinan M J, Marcottel A. Plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic and response element[J]. Science, 1990, 250: 267-270.

[17] Choi H, Hong J, Kang J, et al. ABFs, a family of ABA responsive element binding factors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 1723-1730.

[18] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE2 dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3470-3488.

[19] Kang J, Choi H, Kim S Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress responsive abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2002,14: 343-357.

[20] Kim J B, Kang J Y, Kim S Y. Over - expression of a transcription factor regulating ABA responsive gene expression confers multiple stress tolerance[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(5): 459-466.