

文章编号: 1674-7054(2017)02-0141-06

# 巴西橡胶树 HbNAC1 转录因子 互作顺式作用元件的筛选

郝 慧, 曹玉鑫, 翟金玲, 黄 惜

(海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

**摘 要:** 巴西橡胶树 HbNAC1 转录因子可能与脱水信号诱导的橡胶乳管分化相关, 此外, HbNAC1 能结合 *HbSRPP* 的启动子并调控该基因的表达, 因此可能是一个橡胶产排胶调控相关基因。笔者首先构建多个顺式作用元件的 pAbAi 酵母单杂载体, 然后构建 HbNAC1 转录因子的 pGADT7-Rec2-HbNAC1 载体, 2 种载体共转化 Y1H Gold 酵母菌株, 然后通过酵母单杂交筛选与 HbNAC1 互作的顺式作用元件。结果表明, HbNAC1 可结合 JRE, CACG 和 ABRE 顺式作用元件并激活报告基因 AUR1-C 的表达。本研究结果为鉴定 HbNAC1 转录因子的靶基因, 研究其下游基因的表达调控提供重要的线索。

**关键词:** 巴西橡胶树; HbNAC1; 顺式作用元件; 酵母单杂交筛选

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.002

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) 是天然橡胶的主要来源, 是海南省重要的经济作物, 在海南的种植面积约 53.3 万  $\text{hm}^2$ 。巴西橡胶树乳管分化是天然橡胶生产基础研究中的一个重大理论问题, 橡胶树树皮中的乳管是天然橡胶合成和贮存的组织, 乳管的分化及胶乳生物合成的机理至今未明, 是橡胶基础研究及橡胶生产技术提升的理论瓶颈。NAC 转录因子是植物特有的一类转录因子。大量研究结果表明, NAC 转录因子家族的功能存在于各种生命进程中, 包括顶端分生组织<sup>[1]</sup>, 花的发育<sup>[2]</sup>, 细胞分裂<sup>[3]</sup>, 叶片衰老<sup>[4]</sup>, 次生壁形成<sup>[5]</sup>, 生物和非生物胁迫应答<sup>[6-9]</sup>。目前部分关于巴西橡胶树中 NAC 转录因子的研究报道<sup>[10-12]</sup> 仅限于基因克隆, 生物信息学分析, 表达分析以及对其相关生物学功能的初步推测, 但分子机理等功能不清楚。Cao 等<sup>[3]</sup> 研究结果表明, HbNAC1 可能与脱水信号诱导的橡胶乳管分化相关, 并参与多个非生物胁迫反应, 此外, HbNAC1 能结合胶乳合成相关基因 *HbSRPP* 的启动子并调控该基因的表达, 因此可能是一个橡胶产排胶调控相关基因。启动子在基因的表达调控过程中起着非常重要的作用, 启动子中特异的顺式作用元件与相应的转录因子识别结合, 调控目的基因的表达。因此, 准确地预测转录因子识别基因启动子中的顺式作用元件是分析基因表达调控模式的基础。酵母单杂交系统是体外研究 DNA-蛋白质相互作用的经典方法, 可用来分离鉴定与特异 DNA 序列结合的蛋白质。本实验构建顺式作用元件的酵母单杂交 pAbAi 载体, 该载体含有 AUR1-C 报告基因。AbA 能高效抑制酵母细胞的生长, 而 AUR1-C 基因产物能够使酵母产生对 AbA 的抗性。AUR1-C 上游存在多克隆位点, 可在此插入目的诱饵元件序列, 如有转录因子可与诱饵元件结合, 激活 AUR1-C 基因的表达, 酵母便可在含 AbA 的培养基上生长, 据此进行初步筛选。目前有些顺式作用元件已被分离鉴定, 如响应乙烯的 ERE 元件<sup>[14]</sup>、GCC-box<sup>[15]</sup> 和响应脱落酸的 ABRE (CACGTG) 元件<sup>[16]</sup>, G-box 是最常见的茉莉酸相关顺式作用元件<sup>[17]</sup>, 还有其他一些已知的茉莉酸特异性顺式作用元件如 TGACG box<sup>[18]</sup>, JRE (CAATAAAATATT 和 AAACGTGCCATT)<sup>[19]</sup> 等。DRE/CRT 元件广泛存在于植物的抗干旱、冷害和高温等耐性相关基因的启动子中。NACRS (NAC 识别序列) 包含以 CACG 为核心的 DNA 结

收稿日期: 2017-02-27

修回日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31370608, 31260170)

作者简介: 郝慧 (1989-), 女, 海南大学热带农林学院 2014 级生物化学与分子生物学硕士研究生。

通信作者: 黄惜 (1969-), 男, 研究员。E-mail: xihuang@hainu.edu.cn

合基序,该结合位点已被鉴定为 NAC 识别结合位点<sup>[20]</sup>。笔者将构建这些顺式作用元件的酵母单杂载体,通过酵母单杂筛选与 HbNAC1 转录因子的顺式作用元件,为后续鉴定 HbNAC1 转录因子的靶基因及基因表达调控提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 载体: pAbAi 载体、p53-AbAi 载体 (Clontach, No. 630491)。菌株: DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞、Y1H Gold 酵母菌株。试剂: YNB 培养基、- Ura Do Supplement、- Leu Do Supplement 和抗生素 aureobasidin A (AbA) 均购自 Clontech 公司; PEG4000 购自 BIOSHARP 公司; LiAc 购自 TCI 公司; Yeast Extract 和 Tryptone 均购自 OXOID 公司; 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒 (小量) 提取试剂盒与凝胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司; DNA 序列合成及测序由英潍捷基贸易有限公司完成。

**1.2 胁迫相关顺式作用元件寡聚核苷酸链的合成** 根据胁迫相关顺式作用元件序列,设计 2~3 个重复序列 (表 1),并在退火后序列的两端形成与 pAbAi 载体相匹配的 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切位点。顺式作用元件寡聚核苷酸链的合成: 用 TE buffer 将引物溶解到 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,上下游引物按 1: 1 的比例混合,95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 25  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

表 1 顺式作用元件引物序列

Tab. 1 The sequences of Cis-acting element primers

| 名称       | 序列 (5'—3') Sequence                                                                                  |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| JRE      | F: ATTTTTC AATAAAATATTTATCCATTTTCAAACGTCCTTT<br>R: TCGAAAAGGCACGTTTGAAAAATGGATAAATATTTATTGAAAAATGTAC |
| GCC box  | F: ATTTTTCGCGCCTATCCATTTTTCGCGGCC<br>R: TCGAGCGGCGCAAAAAATGGATAGGCGGCAAAAAATGTAC                     |
| ABRE     | F: ATTTTTCAGTGTCTATCCATTTTTCAGTGCC<br>R: TCGAGCCACGTGAAAAATGGATAGACACGTAAAAATGTAC                    |
| ERE box  | F: ATTTTTCATTTCAAATATCCATTTTCAAATTCAA<br>R: TCGATTGGAATTTGAAAAATGGATATTTGAAATAAAAAATGTAC             |
| G-box    | F: ATTTTTCACGTGTATCCATTTTCCACGTG<br>R: TCGACACGTGAAAAATGGATACACGTGAAAAATGTAC                         |
| CACG box | F: ATTTTTCACGTATCCATTCACGCATTTTCACG<br>R: TCGACGTGAAAAATGCGTGAATGGATACGTGAAAAATGTAC                  |
| DRE box  | F: ATTTTTCGCACTATCCATTTTTCGCGAC<br>R: TCGAGTCGGGAAAAATGGATAGTCGGAAAAATGTA                            |

**1.3 pBait-AbAi 载体构建** 将 pAbAi 载体用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切,酶切产物经胶回收纯化后,用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接线性化的 pAbAi 载体和顺式作用元件寡聚核苷酸链,连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,用 LB + Amp (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 固体培养基筛选阳性克隆,PCR 鉴定出阳性克隆菌株,送测序。将测序正确的阳性克隆扩大培养提取质粒。

**1.4 pBait-AbAi 转化酵母获得诱饵酵母** 用 BstB I 酶切测序正确的 pBait-AbAi 和 p53-AbAi 质粒,回收酶切产物。参照 Yeastmaker Yeast Transformation System 2 说明书,分别将线性化的 pBait-AbAi 载体转化 Y1H Gold 感受态细胞,转化液涂布于 SD/-Ura 固体培养基上,28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 3~5 d,直至长出单菌落。然后挑取酵母单菌落为模板,分别以 pAbAi F/R 通用引物进行 PCR 阳性菌株检测。

**1.5 诱饵酵母报告基因本底表达水平检测** 分别挑取 PCR 检测为阳性的单菌落于 SD-Ura 液体培养基,28  $^{\circ}\text{C}$ , 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,振荡培养至 OD = 0.6,然后分别稀释 10  $\times$ , 100  $\times$ , 1000  $\times$ , 点板于含 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  AbA 的 SD-Ura 固体培养基上,28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 3~5 d,观察酵母菌生长情况。确定 AbA 的最低使用浓度。

## 1.6 利用酵母单杂筛选 HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件

1.6.1 HbNAC1 转录因子重组质粒转化酵母菌株及鉴定 将重组质粒 pGADT7-Rec2-HbNAC1 转化到已含有 pAbAi-Bait 的 Y1H Gold 酵母菌株中,转化方法同 1.4,分别涂于 SD-Leu 的固体培养基上,28 ℃ 条件下培养 3~5 d,至长出单菌落。挑取酵母单菌落为模板,分别以 pGADT7 F/R 通用引物进行 PCR 阳性菌株检测。

1.6.2 HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件筛选 分别挑取 PCR 检测为阳性的单菌落于 SD-Leu 液体培养基,28 ℃,200 r·min<sup>-1</sup>,振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6,然后分别稀释 10 ×,100 ×,1 000 ×,分别点板于含 0,100,200,300,400,500,600 ng·mL<sup>-1</sup> AbA 的 SD/-Ura 固体培养基上,28 ℃ 条件下培养 3~5 d,观察酵母菌生长情况,筛选与 HbNAC1 转录因子互作的顺式作用元件。

## 2 结果与分析

2.1 pBait-AbAi 载体构建 pBait-AbAi 载体构建如图 1-A 所示。将合成的顺式作用元件用 *Kpn*I 和 *Sal*I 酶切后的 pAbAi 质粒载体进行连接,转入 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,挑取单菌落进行菌落 PCR 检测阳性克隆。用载体引物上游,目的片段引物下游检测得到的结果显示均可扩增出约 300 bp 的条带,表明其为阳性克隆,图 1-B。

2.2 诱饵酵母的获得 将 pBait-AbAi 分别转入酵母 Y1H Gold 菌株中,在 SD/-Ura 培养基中 30 ℃ 培养 2~4 d,分别挑取 7 个单菌落做菌落 PCR,用载体引物上游和目的片段引物下游对转化 pBait-AbAi 的菌株进行检测的结果均有 300 bp 大小的条带(图 1-C),这表示 pBait-AbAi 已成功整合至 Y1H Gold 基因组中。

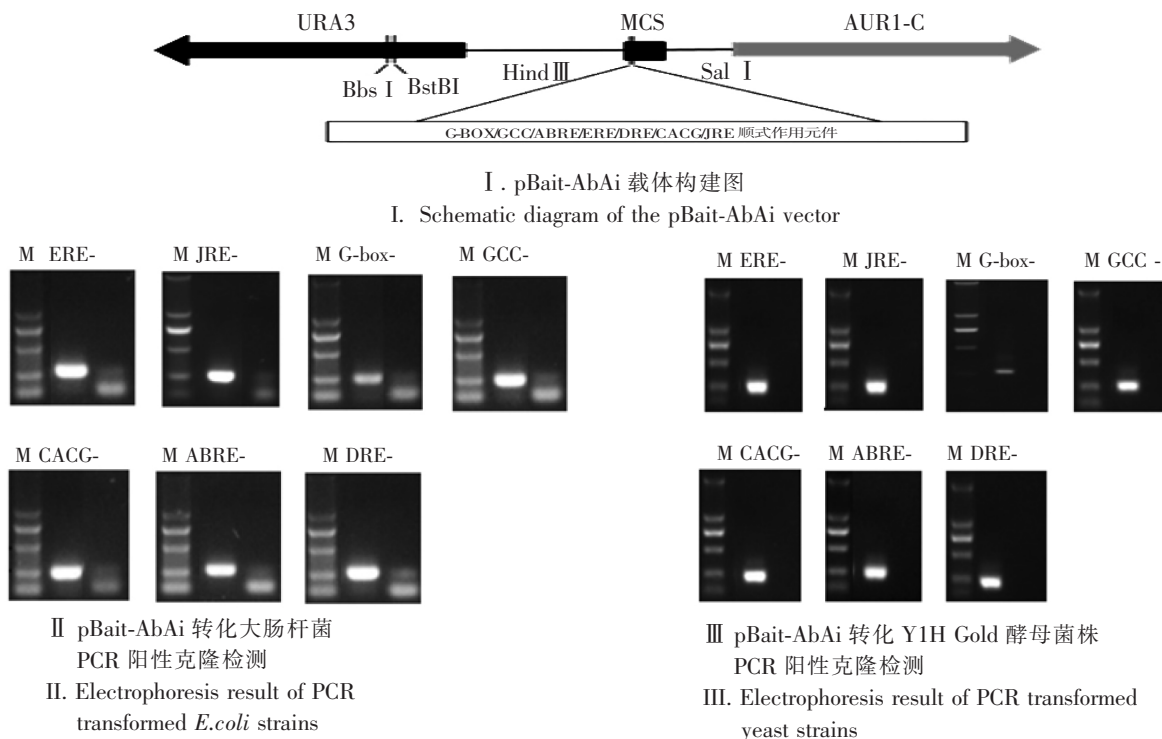


图 1. pBait-AbAi 载体的构建及转化

M: D2000; (-): 负对照。

Fig.1 Construction and transformation of pBait-AbAi vectors

M: D2000; (-): Negative control.

## 2.3 HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件筛选

2.3.1 诱饵酵母报告基因本底表达水平检测 将诱饵酵母分别点板在含不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 固体培养基上,以 p53-AbAi 作为正对照,pAbAi-Bait 在 SD/-Ura/AbA 培养基上生长情况如图 3-A 所示: pAbAi-ERE 在 SD/-Ura/100 ng·mL<sup>-1</sup> AbA 培养基上不生长; pAbAi-JRE 在 SD/-Ura/200 ng·mL<sup>-1</sup> AbA 培养基上不生长; pAbAi-G-box 在 SD/-Ura/AbA 培养基上抑制不住; pAbAi-GCC 在 SD/-Ura/200 ng·mL<sup>-1</sup> AbA

培养基上不生长; pAbAi-CACG 在 SD/-Ura/400 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基上不生长; pAbAi-ABRE 在 SD/-Ura/400 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基上不生长; pAbAi-DRE 在 SD/-Ura/100 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基上不生长。结果显示了不同顺式作用元件的最低 AbA 抑制浓度(表 1)。

表 1. HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件 AbA 抑制浓度统计表

Tab.1 Statistics of ABA inhibition concentrations of cis-elements interacting with HbNAC1

|               | pAbAi 载体 |     |       |     |      |      |      |
|---------------|----------|-----|-------|-----|------|------|------|
|               | ERE      | JRE | G-box | GCC | CACG | ABRE | DRE  |
| 空载            | <100     | 200 | 600   | 100 | 400  | 300  | <100 |
| pGADT7-HbNAC1 | <100     | 600 | 600   | 100 | 600  | 600  | <100 |

ng · mL<sup>-1</sup>

2.3.2 HbNAC1 转录因子重组质粒转化诱饵酵母菌株阳性克隆鉴定 将重组质粒 pGADT7-Rec2-HbNAC1 转化到诱饵酵母菌株中,挑取酵母单菌落为模板,进行 PCR 阳性菌株检测,结果如图 2 所示 PCR 结果均有目的条带,说明 HbNAC1 重组质粒已成功转入酵母诱饵菌株。

2.3.3 HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件筛选 将 pGAD-HbNAC1 转入 Y1H Gold (pAbAi-Bait) 可在对应 SD/-Leu/AbA 培养基上生长情况如图 3 所示: pGAD-HbNAC1 转入 Y1H Gold (pAbAi-JRE) 可在对应 SD/-Leu/200 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基以及更高浓度 AbA 浓度上生长; pGAD-HbNAC1 转入 Y1H Gold (pAbAi-CACG) 可在对应 SD/-Leu/400 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基以及更高浓度 AbA 浓度上生长; pGAD-HbNAC1 转入 Y1H Gold (pAbAi-ABRE) 可在对应 SD/-Leu/400 ng · mL<sup>-1</sup> AbA 培养基以及更高浓度 AbA 浓度上生长,且生长良好,说明 HbNAC1 可结合 JRE、CACG 和 ABRE 顺式作用元件并激活报告基因 AUR1-C 的表达(表 1)。

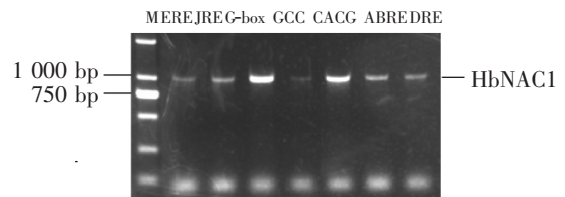
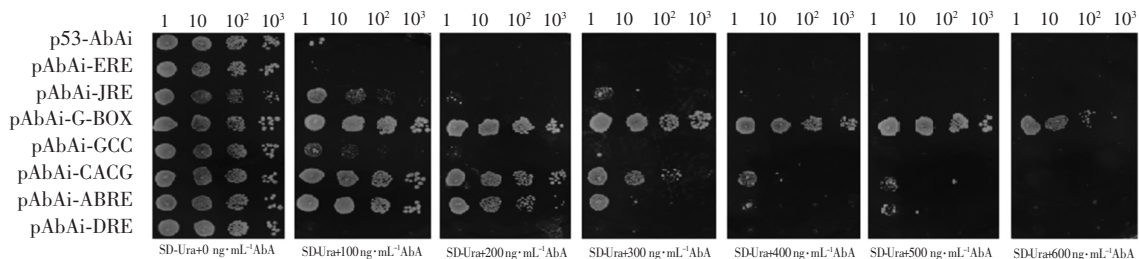


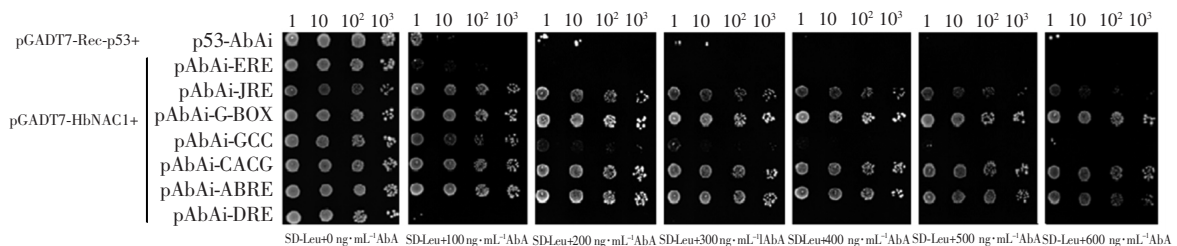
图 2 HbNAC1 转录因子重组质粒转化诱饵酵母菌株阳性克隆鉴定

Fig. 2 Identification of pGAD-HbNAC1 plasmid into bait yeast strain  
M: D2 000



I. 将 pAbAi-Bait 转化 Y1H 酵母菌株在 SD/-Ura/AbA 培养基上培养

1. Yeast cells carrying pBait-AbAi were cultured in SD/-Ura selective medium containing 0~600 ng·mL<sup>-1</sup> AbA



II pGAD-HbNAC1 和 pAbAi-Bait 共转酵母在 SD/-Leu/AbA 培养基, 30 °C 培养 3~4 d

Yeast cells carrying pGAD-HbNAC1 + pAbAi-Bait, or positive control were cultured for 3~4 days at 30°C in SD/-Leu selective medium containing 0~600 ng·mL<sup>-1</sup> AbA

图 3 HbNAC1 转录因子互作顺式作用元件筛选

Fig. 3 Selection of cis-acting elements in yeast interacting with HbNAC1

### 3 讨 论

Tran 等利用酵母单杂技术筛选到可结合 MYC-like (CATGTG) 顺式作用元件的 3 个同源的 NAC 蛋白 (ANAC019, ANAC055 和 ANAC072 (RD26)), 这 3 个基因均可以被干旱, 高盐, 以及激素 ABA 和 MeJA 等诱导表达<sup>[4]</sup>。对这些 NAC 蛋白进行详细 DNA 结合基序分析发现 “CACG” 是 NAC 识别序列 (NACRS) 的一个核心的序列。对过表达 ANAC019, ANAC055 或 ANAC072 转基因植物进行微阵列分析, 显示一些胁迫诱导表达基因包括乙二醛酶基因等均被上调表达, 且转基因植株显示了更强的抗旱能力。说明 NAC 转录因子可通过结合靶基因启动子顺式作用元件来调控下游抗逆基因表达, 从而提高植物对逆境的耐受力。近年来, 有大量研究报道 NAC 类转录因子参与非生物胁迫应答并在其中发挥着重要的作用<sup>[21-24]</sup>, 但关于巴西橡胶树中 NAC 转录因子的研究报道较少, 仅有的几篇<sup>[10-12]</sup>也仅限于基因克隆, 生物信息学分析及相关生物学功能的初步推测, 分子机制等功能还不清楚。Cao 等<sup>[13]</sup>研究表明巴西橡胶树 HbNAC1 可能与脱水信号诱导的橡胶乳管分化相关, 并能结合胶乳合成相关基因 HbSRPP 的启动子调控该基因的表达, 推测该基因可能是一个橡胶产排胶调控相关基因, 同时发现 HbNAC1 可参与多个非生物胁迫反应。笔者利用 7 个胁迫相关的顺式作用元件为诱饵构建了诱饵酵母, 通过酵母单杂的初步筛选, 确定 HbNAC1 转录因子结合的候选顺式作用元件, 为后续进一步鉴定 HbNAC1 转录因子的靶基因及基因表达调控提供理论和实验依据。

### 参考文献:

- [1] Takada S, Hibara K, Ishida T, et al. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation [J]. *Development*, 2001, 128(7): 1127-1135.
- [2] Sablowski R W, Meyerowitz E M. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA [J]. *Cell*, 1998, 92(1): 93-103.
- [3] Kim Y S, Kim S G, Park J E, et al. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3132-3144.
- [4] Breeze E, Harrison E, McHattie S, et al. High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation [J]. *The Plant cell*, 2011, 23(3): 873-894.
- [5] Zhong R, Lee C, Ye Z H. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(6): 1087-1103.
- [6] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends Plant Sci.*, 2005, 10(2): 79-87.
- [7] Christianson J A, Dennis E S, Llewellyn D J, et al. ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(4): 428-432.
- [8] Tran L S, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach [J]. *GM Crops*, 2010, 1(1): 32-39.
- [9] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 97-103.
- [10] 邱琼, 朱家红, 张治礼. 巴西橡胶树 HbNAC1 基因的克隆和表达分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(5): 469-474.
- [11] 康桂娟, 黎瑜, 曾日中. 巴西橡胶树 HbNAC33 基因的克隆和表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(4): 845-852.
- [12] 康桂娟, 黎瑜, 曾日中. 巴西橡胶树 HbNAC24 基因克隆和表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2014, 34(12): 2374-2381.
- [13] Cao Y, Zhai J, Wang Q, et al. Function of *Hevea brasiliensis* NAC1 in dehydration-induced laticifer differentiation and latex biosynthesis [J]. *Planta*, 2017, 245(1): 31-44.
- [14] Nitz I, Berkefeld H, Puzio P S, et al. Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Science: an international journal of experimental plant biology*, 2001, 161(2): 337-346.
- [15] Rawat R, Xu Z F, Yao K M, et al. Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(5): 629-643.
- [16] Nagao R T, Goekjian V H, Hong J C, et al. Identification of protein-binding DNA sequences in an auxin-regulated gene of

- soybean [1]. Plant molecular biology, 1993, 21(6): 1147–1162.
- [7] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 221–227.
- [8] 任敏, 何金环. 自然干旱胁迫下紫花苜蓿叶片和根部 ABA 的代谢变化 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 1771–1772.
- [9] 杨子, 曾长英, 王斌, 等. 干旱胁迫对木薯  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、ABA 的影响 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(9): 1725–1729.
- [10] Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, et al. 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 [J]. Plant Cell, 2004, 16(9): 2481–2498.
- [11] Yoshiyama K, Conklin P A, Huefner N D, et al. Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(31): 12843–12848.
- [12] Brini F, Yamamoto A, Jlaiei L, et al. Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in Arabidopsis [J]. Plant & cell physiology, 2011, 52(4): 676–688.
- [13] Liu G, Li X, Jin S, et al. Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton [J]. PLoS one, 2014, 9(1): e86895.
- [14] Gunapati S, Naresh R, Ranjan S, et al. Expression of GhNAC2 from G. herbaceum, improves root growth and imparts tolerance to drought in transgenic cotton and Arabidopsis [J]. Scientific Reports, 2016(6): 24978.

## Screening of Cis-elements Interacted with HbNAC1 of *Hevea brasiliensis*

HAO Hui, CAO Yuxin, ZHAI Jinling, HUANG Xi

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** HbNAC1 has been identified as a key transcriptional factor related with laticifer differentiation induced by local dehydration in *Hevea brasiliensis*. Moreover, HbNAC1 could bind the promoter of and regulate the gene expression of *HbSRPP*, suggesting that HbNAC1 might be involved in latex biosynthesis of *Hevea brasiliensis*. Several cis-elements were inserted into pAbAi vector of Yeast-one-hybrid (Y1H), and a vector pGADT7-Rec2-HbNAC1 was then constructed for HbNAC1. Both vectors were co-transferred into Y1H Gold yeast strain to select cis-elements interacted with HbNAC1. Y1H hybridization results showed that HbNAC1 were bound to cis-elements JRE, CACG and ABRE and activated the expression of AUR1-C report gene. These results are very important for identification and characterization of target genes in downstream in the future.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; HbNAC1; cis-elements; Yeast one hybrid.