

# 水稻 *rbcS* 启动子的克隆及其在转基因 水稻中的特异性表达<sup>\*</sup>

卢碧霞<sup>1,2</sup>, 张改生<sup>1</sup>, 夏勉<sup>2</sup>, 马守才<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 国家作物分子设计中心, 北京 100085)

**[摘要]** 为将高效特异的启动子用于转基因水稻研究, 利用 PCR 技术从水稻‘中花 11’基因组 DNA 中克隆了 *rbcS* 启动子, 序列分析表明, 扩增片段(2 746 bp)与已报道的该基因序列相应区域的同源性达 99.2%。将 *rbcS* 启动子与 *GUS* 报告基因融合构建了由 *rbcS* 启动子引导 *GUS* 基因的植物表达载体, 经农杆菌介导法导入到水稻中。对转基因水稻植株中 *GUS* 活性的定性与定量测定结果表明, *rbcS* 启动子可驱动 *GUS* 报告基因在转基因水稻植株叶片中的特异性表达, 其表达水平高于 *CaMV* 35S 组成型启动子, 而在转基因水稻植株根和种子等器官中不表达或表达活性极弱, 表现出明显的组织特异性。

**[关键词]** 水稻 *rbcS* 启动子; 转基因水稻; 基因表达; *GUS* 活性

**[中图分类号]** Q74

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)01-0096-05

## Cloning of the promoter of rice *rbcS* and its specific expression in transgenic rice

LU Bi-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Gai-sheng<sup>1</sup>, XIA Mian<sup>2</sup>, MA Shou-cai<sup>1</sup>

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Centre for Molecular Crop Design, Beijing 100085, China)

**Abstract** To use specific expression of foreign genes of promoters in transgenic rice research, the rice *rbcS* promoter was isolated from the rice of ZhongHua11 genomic DNA by PCR, and its sequencing indicated that the amplified band (2 746 bp) was 99.2% homologous to the reported ones at the correspondent sequence regions. The cloned *rbcS* promoter was fused to the 5'-upstream of *GUS* (beta-glucuronidase) coding region in a binary vector, and introduced into rice by *A. rhizogaster* mediated transformation. The integration of the *rbcS-GUS* fusion gene in transgenic rice was confirmed by PCR analysis. The determinations of the *GUS* activities in the transgenic rice plants indicated *rbcS* promoter could drive the *GUS* reporter gene to express in the leaves of transgenic rice plants while exerting no or very weak influence on the expression of the *GUS* reporter gene, and the expression level of *rbcS-GUS* fusion gene was significantly stronger than the expression level of *CaMV* 35S-*GUS* fusion gene. So *rbcS* promoter was tissue specific in its expression.

**Key words:** rice *rbcS* promoter; transgenic rice; gene expression; *GUS* activity

基因的表达和调控是植物基因工程研究的主要内容, 外源基因表达量不足是不能获得理想的转基

因植物的重要原因。启动子在决定基因表达方面起着关键作用, 因此, 选择合适的植物启动子是增强外

\* [收稿日期] 2006-06-15

[基金项目] 国家科技部“863”重大专项(2002AA207004); 国家科技部“863”项目(2002AA2C1001)

[作者简介] 卢碧霞(1969-), 女, 陕西榆林人, 副教授, 博士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: Lubxia@tom.com

源基因表达的首要问题。为了将外源目标基因在某一时间或某一目标组织中有效表达, 同时又减少其在转基因植株非目标组织中表达所造成的能力浪费, 及其在非收获器官或组织中表达目标蛋白(如抗虫蛋白)而造成的转基因食品的潜在不安全性<sup>[1-2]</sup>, 利用具有特异性表达特性的启动子被认为是实现对目标基因高表达的重要途径, 也是培育高效、安全转基因作物的首选<sup>[3]</sup>。到目前为止, 已发现的特异性启动子主要包括器官特异性启动子和诱导特异性启动子<sup>[4]</sup>。这些特异性启动子的克隆和应用为在植物中特异性地表达外源基因奠定了基础。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 也是我国主要的粮食作物。近年来, 在我国水稻常年种植面积已达 3 200 万 hm<sup>2</sup> 左右, 占全部粮食作物种植面积的 1/3, 利用基因工程技术改良水稻性状是水稻优质高产和稳产的重要技术手段。1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Rubisco)存在于所有高等植物和自养细菌中, 是所有光合生物进行光合碳同化的关键酶<sup>[5]</sup>, 也是光合植物叶片中含量最丰富的蛋白质, 约占可溶性总蛋白的 50%。其中由核基因编码的 Rubisco 小亚基基因(*rbcS*)的表达受光调控, 并具叶组织表达特异性<sup>[6]</sup>。因此, 利用 *rbcS* 编码基因的启动子特异高效表达特性, 来启动外源目的基因在转基因水稻中高效特异性表达是一种非常有效手段。本研究应用 PCR 基因扩增技术, 从水稻‘中花 11’基因组 DNA 中扩增获得 *rbcS* 启动子, 构建了由其调控序列控制的 *GUS* 融合基因, 并将融合基因用农杆菌介导法导入我国南方水稻产区主栽品种‘中花 11’中, 研究了该转基因水稻绿色组织光诱导特异性表达的 *rbcS* 启动子启动外源基因在水稻中的特异性表达, 以期为水稻抗病抗虫基因工程研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 启动子分离和基因转化受体品种所用的水稻均为粳稻(*Oryza sativa L.* subsp. *japonica*)品种‘中花 11’(ZhongHua11), 为南方水稻产区主栽品种, 由杭州中国水稻研究所提供。

1.1.2 菌株、载体及试剂 大肠杆菌 DH5α 载体 pBluescript II KS (+ / -), 均由北京国家作物分子设计中心保存; Pfu DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; 双元载体 pCAMBIA 1301 和农杆菌菌株 AGL0,

均由澳大利亚 CAMBIA 的 Jefferson 教授提供。限制性内切酶 T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶等购自 Promega 公司。胶回收试剂盒 3S Spin DNA Agarose Gel Purification Kit, 试剂购自上海申能博彩公司。载体 pGM-T Easy、PCR 所用试剂均购自北京天为时代公司。

### 1.2 *rbcS* 启动子的克隆和序列分析

水稻基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[7]</sup>。*rbcS* 启动子的扩增、克隆和序列分析根据 Kyozuka 等<sup>[8]</sup>发表的水稻 *rbcS* 基因组序列, 扩增引物设计参考 Liu 等<sup>[9]</sup>克隆水稻 *rbcS* 启动子的方法。为避免 PCR 扩增产物过长引起碱基突变, 将该启动子分成两段扩增, 然后再用限制性内切酶连接。用两对引物 R1/R2 和 R3/R4 分别扩增出该启动子 5 端 1.4 kb 和 3 端 1.3 kb 长的片段, 在引物 R2 和 R3 中各含有 1 个 *Bam*H I 酶切位点(为 *rbcS* 启动子本身所具有), 便于将两段 PCR 产物进行连接; 在引物 R1 和 R4 的 5 末端分别设计 1 个 *Hind*III 和 *Xba*I 内切酶位点, 便于构建植物表达载体。

两对引物序列分别为:

上游引物 R1: 5'-GCA A GC TTT TGG TGG  
TAG GAA TGT A GT-3';  
R2: 5'-GTT GGT ACA AGT  
AAG GGA TCC-3'。

下游引物 R3: 5'-TTG GAT CCC TTA CTT  
GTA CCA AC-3';  
R4: 5'-CAT CTA GAC TCT GCA  
GCT CAC CAA GCT CTC-3'。

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 60 s, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 120 s, 循环 30 次; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化, 然后克隆入载体 pGM-T Easy 中, 酶切鉴定为阳性克隆的送上海博亚公司进行序列测定。常规克隆操作方法参照文献[10]。

### 1.3 *rbcS-GUS* 融合表达载体的构建

将测序验证为正确的 2 个 *rbcS* 启动子区片段分别经 *Hind*III 与 *Bam*H I、*Bam*H I 与 *Xba*I 酶切, 并先后克隆入 pBluescript II KS (+ / -) 中, 连接成 2.7 kb 长的完整启动子区序列。然后用 *Hind*III 和 *Xba*I 切下 2.7 kb 长的该启动子片段, 克隆入 pCAMBIA 1301 载体相应位点中, 即得到含有 *rbcS-GUS* 嵌合基因的表达载体 pCAMBIA 1301RG (图 1)。

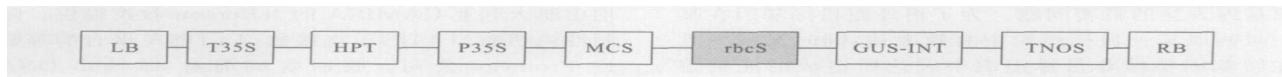


图1 pCAMBIA 1301RG质粒的T-DNA区图解

LB. T-DNA 的左边界; T35S CaMV 35S 终止子; HPT. 潮霉素磷酸转移酶基因; MCS 多克隆位点; rbcS rbcS 启动子; GUS-INT. 含有内含子的 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因; TNOS 胭脂碱合酶基因终止子; RB. T-DNA 的右边界(参考文献[6]并略作改动)

Fig. 1 T-DNA structure of binary vector pCAMBIA 1301RG

LB. The left border of T-DNA; T35S The terminator of the CaMV 35S gene; HPT. Hygromycin phosphotransferase gene; MCS Multiple cloning sites; rbcS rbcS promoter; GUS-INT. Beta-glucuronidase gene; TNOS Nopaline synthase gene terminator; RB. The right border of T-DNA (Brief modify of reference [6])

#### 1.4 根瘤农杆菌介导的水稻转化

取水稻品种‘中花11’幼胚，在诱导培养基N6D(0.3 g/L水解酪蛋白(casein hydrolysate), 30 g/L蔗糖, 2.8 g/L L-脯氨酸(proline), 2 mg/L 2,4-D, 2.5 g/L植物凝胶(Phytigel), pH 5.8)上诱导其产生初生愈伤组织，将初生愈伤组织再接种到继代培养基N6D上继代培养2周后，转入N6D-A8(乙酰丁香酮)(N6D, 100 μmol/L A8)培养基上预培养3d，用作农杆菌共培养转化的受体材料。通过冻融法将pCAMBIA 1301RG质粒导入农杆菌菌株AGL0中，经PCR筛选出阳性克隆，然后用共培养法将含有目的基因的农杆菌导入植物受体材料转化水稻。水稻组织培养、农杆菌介导转化水稻以及抗性愈伤组织的筛选与植株再生等均按照Hiei等<sup>[11-12]</sup>的方法进行。

#### 1.5 转基因水稻植株总DNA的PCR分析

用CTAB法从转基因水稻新鲜叶片中提取微量总DNA。在GUS基因编码区设计1对引物进行PCR扩增，预期PCR产物片段长为450 bp左右。

#### 1.6 转基因水稻植株GUS活性的分析

选取经PCR检测呈阳性的转基因水稻植株进行GUS活性组织化学染色和定量分析，同时取35S启动子引导的阳性转基因植株和未转基因的水稻‘中花11’为对照。在每个植株上分别取叶片、成熟种子和根等不同组织进行GUS活性分析。

**1.6.1 GUS活性的组织化学染色分析** GUS活性的组织化学染色分析及其荧光定量测定均参考文献[13]的方法进行。将待测水稻样品与含底物X-Gluc(X-Gluc染液组成: 1.0 mmol/L X-Gluc; 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0; 10 mmol/L EDTA-Na, pH 8.0; 甲醇, 终浓度20%; 0.1% Triton X-100; 10 mmol/L 硫基乙醇)的染色反应液于37℃保温过夜，进行组织化学染色，叶片等绿色组织用体积分数95%乙醇脱色后观察。

#### 1.6.2 GUS活性的定量分析

将100 mg左右的

水稻组织在600 μL GUS抽提液(50 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0; 10 mmol/L EDTA; 0.1% Triton X-100)中于冰浴研磨成匀浆，离心后取上清液测定GUS比活性。总蛋白含量的测定按文献[14]的方法进行。

## 2 结果与分析

#### 2.1 克隆启动子的核苷酸序列分析

根据已发表的序列设计引物，以水稻DNA为模板进行PCR扩增，PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离，得到了两条特异的大小为1.4 kb(rbcS1图2)和1.3 kb(rbcS2图3)的条带。测序结果表明，从水稻品种‘中花11’中克隆的rbcS基因5'上游调控区全长为2746 bp, 3'末端紧邻该基因起始密码子，与已发表的该基因序列相应区域比较发现，在TA TA-box, CAA T-box, G-box以及转录起始位点等重要功能区并未发现有碱基的改变，但在其他区域有16个碱基的改变，包括6个碱基的突变和10个碱基的缺失，同源性为99.2%。

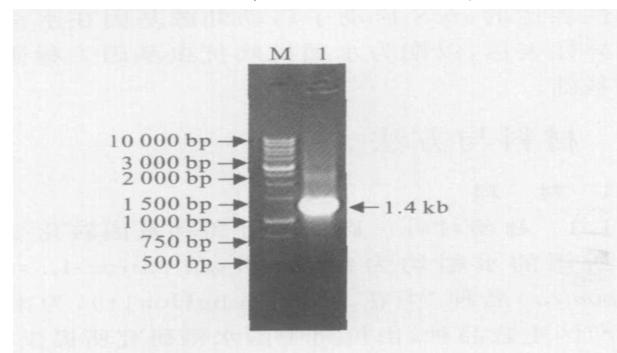


图2 rbcS1启动子区片段PCR产物电泳图

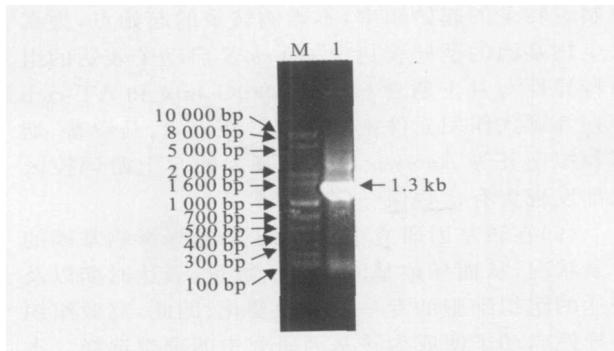
M. 1 kb plus DNA Ladder 分子量标准;

1. rbcS1启动子区片段的PCR产物

Fig. 2 PCR products of rbcS1 promoter

M. 1 kb plus DNA Ladder standard

molecular weight; 1. PCR products

图 3 *rbcS 2* 启动子区片段 PCR 产物电泳图

M. 1 kb plus DNA L adder 分子量标准;

1. *rbcS 2* 启动子区片段的 PCR 产物Fig. 3 PCR products of *rbcS 2* promoter

M. 1 kb plus DNA L adder standard

molecular weight; 1. PCR products

## 2.2 转基因水稻植株的获得

利用水稻‘中花 11’幼胚愈伤组织进行基因的转化。将未成熟的水稻幼胚放在 N 6D 培养基上诱导 2 周后, 对诱导出的胚性愈伤组织进行继代培养。继代培养 2 周后就可以进行转化。水稻愈伤组织与农杆菌 AGL0/pCAMBIA 1301RG 在共培养基上共培养 3 d 后, 转入含 25 mg/L 潮霉素的筛选培养基中培养, 大约 4 周后就可以看到抗性愈伤组织, 抗性愈伤组织分化再生获得了 30 个独立转化系, 每个株系含有 2~10 个转基因单株。所有转基因水稻植株在含 25 mg/L 潮霉素的生根培养基上生根壮苗; 2 周后取出幼苗用自来水洗去植株根部的培养基, 继续

在试管中于室温炼苗 1 周, 再移栽于温室, 获得了较高的成活率。绝大多数转基因植株能正常生长, 并能结实。选取 10 个转化系单株提取叶片总 DNA, 用与 *GUS* 基因编码区特异配对的引物进行 PCR 分析, 均能扩增出特异的 PCR 产物(图 4), 证明带有嵌合基因的 T-DNA 已经整合到水稻染色体中。

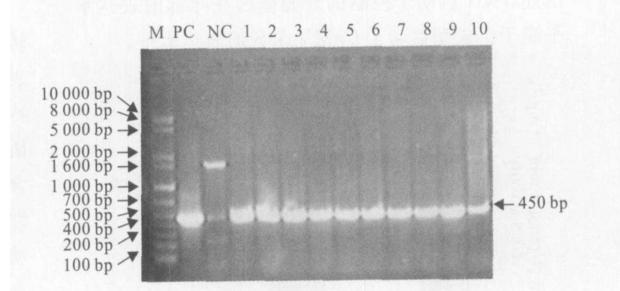


图 4 转基因植株总 DNA 的 PCR 分析

M. 1 kb plus DNA L adder 分子量标准; PC. 质粒正对照;

NC. 未转基因的水稻‘中花 11’; 1~10. 转基因水稻不同株系

Fig. 4 PCR analysis of the total DNA  
of transgenic rice plants

M. 1 kb plus DNA L adder standard molecular weight; PC. Positive control of plasmid; NC. Untransformed plant; Lanes 1~10. Independent transgenic rice plants

## 2.3 *GUS* 融合基因在转基因水稻植株中的组织特异性表达

选取经 PCR 检测呈阳性的 10 个转基因水稻植株进行 *GUS* 活性组织化学染色, 结果见图 5。

图 5 特异表达启动子 *rbcS* 引导的转基因水稻 *GUS* 组织化学染色结果A. 叶片; B. 根; C. 种子; 左: 35S 启动子转基因植株; 中: 特异启动子 *rbcS* 转基因植株; 右: 未转基因的负对照Fig. 5 Histochemical staining of *GUS* activity in different tissues of *rbcS*-*GUS* transgenic rice plantsA. Leaf blades; B. Root; C. Mature seed; Left: 35S-*GUS* transgenic rice plant; Middle: *rbcS*-*GUS* transgenic rice plant;

Right: untransfected rice plant-Zhonghua 11

图 5 结果表明, 10 个转基因水稻植株的叶片中均能检测到明显的 *GUS* 染色反应(蓝色), 在根与种子中却均未见明显的 *GUS* 染色反应; 而 35S 启动子引导的阳性转基因植株在叶片、根和种子中都

能检测到明显的 *GUS* 染色反应(蓝色); 未转基因水稻‘中花 11’的叶片、根和种子中都未检测到 *GUS* 染色反应(蓝色)。说明 *rbcS* 启动子在转基因植株中驱动异源基因的表达具有明显的组织器官特异性。

同时,选取35S启动子引导的阳性转基因植株、未转基因的水稻‘中花11’和10个转基因植株进行了GUS活性的定量分析,结果基本上与组织化学染色分析的结果相符(图6)。在所检测的10个转基因水稻植株中,有10个转基因水稻植株叶片中的GUS活性显著高于根和种子(分别高0.5至10倍)。综上所述, *rbcS*启动子控制的外源基因在叶部的表达水平高于组成型启动子CaMV 35S的表达水平。

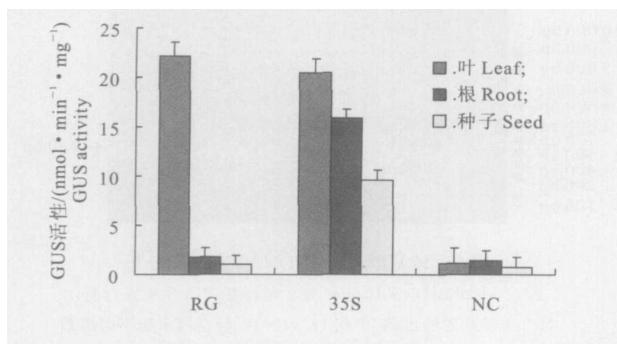


图6 转基因水稻不同组织中  
GUS活性的定量分析

35S 35S-GUS 转基因植株; NC 未转基因植株;  
RG rbcS-GUS 转基因水稻植株

Fig. 6 GUS activity in different  
tissues of transgenic rice

35S GUS activity of 35S-GUS transgenic rice plant in leaf, root and seed; NC GUS activity of intransgenic rice plant-Zhonghua 11 in leaf, root and seed; RG GUS activity of rbcS-GUS transgenic rice plant in leaf, root and seed

### 3 讨论

(1) 植物组织特异表达的启动子中存在着不同的结构域,通过这些结构域的协同作用调节着启动子不同的表达模式。本研究成功地从水稻栽培品种‘中花11’中克隆了组织特异性表达的 *rbcS* 启动子,对其序列分析表明,克隆的水稻 *rbcS* 启动子具有启动子的相应调控元件以及下游组织特异性表达必需的核苷酸序列,包括位于第89至93位碱基的TA TA -box、位于第161至169位碱基的CAAT-box 和位于第181至186位碱基的I-box(GA TA G)、位于第171至179位碱基的单子叶植物 *rbcS* 保守序列<sup>[8]</sup>(monocot *rbcS* consensus sequences, GCG GCC AAT)。TA TA -box 为RNA聚合酶II转录起始所必需<sup>[15]</sup>,只有RNA聚合酶与TA TA 框牢固结合之后才能开始转录; CAAT-box 控制着转录的起始频率,不影响转录的起始点,为真

核生物基因的诱导表达<sup>[15]</sup>;而 *rbcS* 启动子表达的组织特异性与其上所含有的 I-box、G-box 和 A T-rich 序列等顺式作用元件密切相关。在玉米、马铃薯、烟草和拟南芥等 *Rubisco* 小亚基基因的5'上游调控区也都发现含有这些保守序列<sup>[5-6, 16-17]</sup>。

(2) 在转基因研究中,启动子的选择影响基因的转录状况,从而导致基因的表达数量、表达时期以及表达的组织细胞的专一性发生变化。因此,高效组织特异性启动子便成为转基因研究中的理想选择。本研究将克隆的水稻 *rbcS* 启动子与 *GUS* 报告基因融合并导入水稻中,以详细了解其在水稻中的表达特性。结果表明,所克隆的水稻 *rbcS* 特异启动子在驱动外源基因的表达上表现出明显的组织特异性,这一结果与转基因玉米和水稻中的研究结果基本相符<sup>[8-9, 18]</sup>。同时,本研究将水稻 *rbcS* 启动子与在转基因水稻中组成型表达的启动子 CaMV 35S 在转基因水稻叶片中的表达水平进行了比较,结果显示水稻 *rbcS* 启动子的表达量高于组成型表达的启动子 CaMV 35S。目前,已应用该启动子在转基因水稻叶片中特异表达具有抗病和抗重金属效果的目标基因,显示出了极好的转基因育种应用价值。

### 参考文献

- Morris S H, Adley C C. Irish public perceptions and attitudes to modern biotechnology: an overview with a focus on GM foods[J]. Trends Biotechnol, 2001, 19(2): 43-48.
- Kuiper H A, Kleter G A, Noteborn H P J M, et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods[J]. Plant J, 2001, 27(6): 503-528.
- Zuo J R, Chua N H. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes[J]. Curr Opin Biotech, 2000, 11: 146-151.
- 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J]. 遗传, 2001, 23(5): 492-497.
- Miziorko H M, Lorimer G H. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase[J]. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 507-535.
- Schaffner A R, Sheen J. Maize *rbcS* promoter activity depends on sequence elements not found in dicot *rbcS* promoters[J]. Plant Cell, 1991, 3: 997-1012.
- Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.

(下转第105页)

盐析沉淀羔羊皱胃酶 16 h 即可达到理想的效果。

## 4 结 论

对超声提取羔羊皱胃酶的盐析条件研究表明,采用硫酸铵盐析羔羊皱胃酶,沉淀中最多只能回收 58% 的凝乳活性,且在透析过程中酶活性有损失。因此,硫酸铵不适宜用于盐析羔羊皱胃酶;而食盐在皱胃酶制品中大量存在,利用食盐盐析可最大限度地回收酶活性,且形成的沉淀无需脱盐。其适宜的盐析条件为:食盐饱和度 55%~65%,盐析 pH 4.00~4.60,盐析温度 4℃,盐析时间 16 h。

## [参考文献]

- [1] 韩绍玲 用于干酪生产的凝乳酶与小牛皱胃酶的制备[J]. 中国

乳品工业, 1987(6): 262-264

- [2] Lopes A, Teixeira G, Líberato M C, et al New vegetal sources for milk-clotting enzymes[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1998, 5: 63-68
- [3] 赵胜娟, 陈树兴, 张富新 羔羊皱胃酶提取工艺研究[J]. 河南农业科学, 2005(5): 75-77.
- [4] 张富新, 李林强 超声处理对羔羊皱胃酶提取活性的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1555-1559.
- [5] Arima K, Shinier I, Gakuzo T. Milk-clotting enzymes from microorganism, part I, Screening test and identification of potent fungus[J]. Agric Biol Chem, 1967, 31(5): 540-545.
- [6] Foltmann B. Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin)[J]. J Biochem, 1969, 115(3): 39-49
- [7] 王宪泽 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 108

(上接第 100 页)

- [8] Kyozuka J, McElroy D, Hayakawa T, et al Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice[J]. Plant Physiol, 2001, 102(3): 991-1000
- [9] Liu Q Q, Yu H X, Zhang W J, et al Specific expression of the foreign gene regulated by the rice *rbcS* promoter in transgenic rice[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(3): 247-253
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agronomobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant, 1994, 6: 271-282
- [12] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agronomobacterium tumefaciens*[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 205-218
- [13] Bradford H M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254
- [14] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387-405
- [15] Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins [J]. Annu Rev Biochem, 1981, 50: 349-384
- [16] Donald R G K, Cashmore A R. Mutation of either G-box or I-box sequences profoundly affects expression from the *Aridopsis rbcS-A* promoter[J]. EMBO J, 1990, 9: 1717-1726
- [17] Schindler U, Cashmore A R. Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins[J]. EMBO J, 1990, 9: 3415-3427.
- [18] Nomura M, Katayama K, Nishimura A, et al The promoter of *rbcS* in a C3 plant (rice) directs organ-specific, light-dependent expression in a C4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expression [J]. Plant Mol Biol, 2000, 44(1): 99-106