

玉米根部特异性启动子的克隆及功能分析

关淑艳,赵丽娜,王丕武,楚海娇,刘 强,颜雪芬

(吉林农业大学 生物技术中心,吉林 长春 130118)

【摘 要】 【目的】从玉米幼根基因组 DNA 中克隆 β -葡萄糖苷酶基因根部特异性启动子序列 ZmGLU1P,并对其功能进行分析。【方法】利用 PCR 技术从玉米品种 P138 幼根基因组 DNA 中克隆玉米根部特异性启动子片段 ZmGLU1P,将其与 GUS 基因融合,构建植物表达载体 pCambia121-ZmGLU1P,转化到 EHA105 根癌农杆菌中,通过根癌农杆菌介导法转化烟草 NC89,对转化烟草植株进行 PCR 和 Southern 杂交检测。采集 PCR 和 Southern 杂交检测为阳性的转基因烟草的根、茎、叶,进行 GUS 活性的组织染色检测。【结果】克隆获得了 ZmGLU1P 片段,其长度为 1 846 bp,与已报道的序列同源性达 99% 以上。转基因烟草植株的 PCR 和 Southern 杂交结果显示,成功地获得了转基因阳性植株;GUS 活性检测表明,根中 GUS 活性最强,而在茎和叶等组织中 GUS 活性甚微,表明 ZmGLU1P 片段具有根部特异性启动子功能。【结论】玉米 β -葡萄糖苷酶基因上游 1 846 bp 的片段 ZmGLU1P 具有根部特异性启动子功能,为根部特异性启动子。

【关键词】 玉米;根部特异性启动子;功能分析;GUS 染色;烟草

【中图分类号】 S513;Q785

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)05-0147-07

Cloning and functional identification of the root specific promoter from corn

GUAN Shu-yan, ZHAO Li-na, WANG Pi-wu,
CHU Hai-jiao, LIU qiang, YAN Xue-fen

(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to clone and identify the root-specific promoter of ZmGLU1P gene from corn. 【Method】 The promoter region of root-specific gene was isolated from the genomic DNA of corn P138 by PCR method, and obtained the promoter fragment ZmGLU1P. The cloned promoter was fused to the GUS reporter gene to construct plant expression vector pCambia121-ZmGLU1P, which was transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum*) NC89 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method and several transformed plants were obtained. Then they were detected by PCR and Southern blotting. The root, stem, and leaf of gram-positive recombinant corns were performed with GUS activity assay. 【Result】 The results showed that the length of the clone was 1 846 bp, and the sequence was more than 99% homology compared with the reported promoters. PCR and Southern blot results showed that the transgenic plants were obtained successfully. GUS activity assays of different organs indicated that the expression of GUS was active mostly in roots, suggesting that the ZmGLU1P gene is root-specific promoter. 【Conclusion】 The cloned 1846bp fragment β -glucosidase gene from corn is root-specific promoter.

* 【收稿日期】 2010-12-15

【基金项目】 国家转基因专项(2008ZX08003-005);吉林省财政厅项目(200806);吉林省科技厅成果转化补助项目(20095044)

【作者简介】 关淑艳(1971—),女,吉林榆树人,副教授,硕士生导师,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。

E-mail: guanshuyan1971@yahoo.com.cn

【通信作者】 王丕武(1958—),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。

E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn

Key words: corn; root specific promoter; functional identification; GUS staining; tobacco

外源基因在细胞中的表达是基因工程研究的关键,而外源基因的表达首先取决于其转录的启动^[1]。启动子作为基因表达调控的一种重要的顺式元件,有组成型和组织特异型两类,前者在所有组织中都可启动基因表达,后者仅在特定的组织和一定的发育时期才可启动基因表达。目前,在植物组织表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子(如 CaMV 35S 启动子等^[2]),然而外源基因在植物内持续、高效的表达,必然大量消耗植株体内的基础物质,而基础物质的额外消耗又必然影响和抑制植物体内的其他代谢活动,不但造成浪费,而且往往还会引起植物形态的改变,影响植物的生长发育。为了使外源基因在植物体内有效发挥作用,同时减少其对植物的不利影响,目前人们对组织特异表达启动子的研究和应用越来越重视^[3-7]。根是植物体吸收水分和营养物质的重要器官,根特异表达系统可用于研究植物的高渗胁迫耐受、植物修复和根际分泌等^[1]。因此,研究根中特异表达基因及其启动子无疑是重要的。根部特异性启动子具有根特异性表达功能,迄今为止,部分根部特异性启动子已经被克隆并测序^[8]。

ZmGLU1 是一种能特异性水解细胞分裂素 β -葡萄糖苷复合体并释放活性细胞分裂素的酶,它特异性地分布在细胞分裂旺盛的组织中。特别是在细胞分裂旺盛的苗期含量非常高,因此该基因的启动子可能在玉米苗期具有很高的活性^[8]。本试验利用 PCR 技术从玉米基因组 DNA 中克隆到一种玉米 β -葡萄糖苷酶基因(1 846 bp)的启动子(ZmGLU1P),将其与含有 GUS 报告基因的表达载体重组后,利用农杆菌介导法转化烟草,并对转化烟草植株根部玉米特异性启动子的活性进行 PCR 和 Southern blot 检测及 GUS 组织化学鉴定,以验证 ZmGLU1P 的功能,为其在玉米品质改良研究中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种 *E. coli* DH5 α 、植物表达载体 pBI121、根癌农杆菌 EHA105,均由吉林农业大学生物技术中心实验室提供;pMD18-T Vector,购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 植物材料 玉米品种 P138,由吉林农业大

学生物技术中心实验室提供。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂、限制性内切酶(*Hind* III、*Xba* I)、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL-2000 分子量标准,均购自 MBI 公司;基因组 DNA 提取试剂盒,购自 TaKaRa 公司;DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I,购自 Roche 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器设备 恒温振荡培养箱、低温离心机、移液枪、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、光照培养箱、超净工作台、超低温冰箱、分子杂交炉、pH 酸度计等。

1.2 ZmGLU1P 启动子片段的克隆与序列分析

试验在吉林农业大学生物技术中心实验室进行。采用改良的 CTAB 法^[9]从玉米幼根中提取玉米基因组总 DNA。参照 GenBank 中已发表的玉米 β -葡萄糖苷酶基因(ZmGLU1)的启动子序列(GenBank 登录号:DQ333310),人工设计扩增引物,上游引物 P1: 5'-TTTAAGCTTATGTATGCCTCTGCAATGG-3',下游引物 P2: 5'-TTT TCTAGAAGACCAAGTGGAGCTGATGC-3'。上下游引物中下划线部分分别为加入的 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点。引物由北京三博远公司合成。

PCR 扩增体系为 25 μ L,其中包括 10 $\times$ PCR Buffer(Mg²⁺ free) 2.5 μ L、25 mmol/L Mg²⁺ 2.0 μ L、dNTP Mixture(10 mmol/L) 2.0 μ L、P1(50 pmol/L) 0.5 μ L、P2(50 pmol/L) 0.5 μ L、玉米基因组 DNA 1.0 μ L、TaKaRa *Taq*(5 U/ μ L) 0.3 μ L、ddH₂O 16.2 μ L。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,62 $^{\circ}$ C 2 min,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增片段用琼脂糖凝胶电泳分离,经 V-gene 凝胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T Vector 连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞,经蓝白斑筛选、PCR 和 *Hind* III、*Xba* I 双酶切鉴定获得重组质粒。将 PCR 和酶切鉴定都正确的重组克隆载体命名为 pMD18-T-ZmGLU1P,送交大连 TaKaRa 公司测序后,采用 DNASIS 软件、DNAMAN 软件对其进行序列分析。

1.3 ZmGLU1P-GUS 根部特异性表达载体的构建

植物表达载体 pBI121 是含有 CaMV35S-GUS 融合基因系统的双元载体。为了研究 ZmGLU1P 基因启动子的功能,本研究用其取代植物表达载体 pBI121 的 CaMV35S 组成型启动子,与 GUS 报告

基因融合构建根部特异性表达载体 ZmGLU1P-GUS (图 1)。

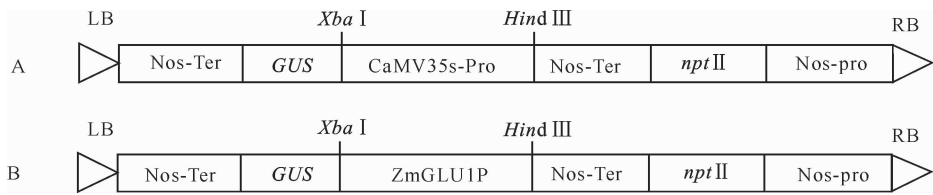


图 1 植物表达质粒 pBI121(A)、ZmGLU1P-GUS(B)的 T-DNA 区结构

Fig. 1 Structure map of T-DNA region of plant expression vector pBI121(A) and ZmGLU1P-GUS(B)

利用 *Hind* III、*Xba* I 分别双酶切 pMD18-T-ZmGLU1P 和 pBI121,并分别回收 pMD18-T-ZmGLU1P 小片段和 pBI121 大片段,用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,然后提取质粒 DNA,经 PCR、*Xba* I/*Hind* III 双酶切和测序鉴定正确后,获得植物表达载体 ZmGLU1P-GUS。

1.4 ZmGLU1P-GUS 对烟草的遗传转化

制备根癌农杆菌 EHA105 的感受态细胞,通过液氮冻融法^[10]将重组植物表达载体 ZmGLU1P-GUS 转化到农杆菌 EHA105 中。参照 Horsch 等^[11]的叶盘法将转化 ZmGLU1P-GUS 的农杆菌 EHA105 转化烟草 NC89,用 MS 基本培养基^[12]培养后进行筛选,筛选培养基为附加 2 mg/L 6-BA、0.5 mg/L IAA、100 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 羧苄青霉素和 100 mg/L 氨苄青霉素的 MS 培养基;同时进行诱导生根培养,培养基为附加 100 mg/L 卡那霉素、80 mg/L 羧苄青霉素和 80 mg/L 氨苄青霉素的 1/2 MS 培养基。

1.5 转化烟草植株的 PCR 和 Southern 杂交检测

1.5.1 PCR 检测 采用改良的 CTAB 法^[9]从烟草叶片中提取其基因 DNA。以提取的烟草 DNA 作为模板,以根部特异性表达载体 ZmGLU1P-GUS 和未转化烟草植株分别为阳性对照和阴性对照,对 ZmGLU1P 启动子和 *GUS* 基因序列进行 PCR 扩增。ZmGLU1P 启动子序列的扩增引物和条件同 1.2 节。*GUS* 基因的扩增引物由北京三博远公司合成,其序列为: *GUS*-S: 5'-GTGAATCCGCAC-CTCT-3', *GUS*-AS: 5'-ATCGCCGCTTTGGACA-TA-3'(退火温度 54 ℃);PCR 扩增体系为 25 μ L: 10 $\times$ PCR Buffer(Mg²⁺ free) 2.5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 2.5 μ L, dNTP Mixture(10 mmol/L) 2.0 μ L, *GUS*-S(50 pmol/L) 0.5 μ L, *GUS*-AS(50 pmol/L) 0.5 μ L, 玉米基因组 DNA 1.0 μ L, TaKaRa *Taq*(5 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 15.7 μ L。扩增条件为:94 ℃预变性 10 min;94 ℃变性 1 min,55.3 ℃退火 30

s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。取 PCR 扩增产物,进行琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。

1.5.2 Southern 杂交检测 随机选取 2 株经 PCR 初步检测为阳性的转基因烟草植株,以未转化植株为对照,采用基因组 DNA 提取试剂盒提取其叶片基因组 DNA,经 *Hind* III 单酶切后进行 Southern 杂交检测。具体方法是:将 PCR 检测呈阳性的植株基因组 DNA 用 *Hind* III 酶切过夜,消化后用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行分离,再用 20 $\times$ SSC 转移到尼龙膜上,80 ℃固定 2 h 后与探针杂交。以纯化的 ZmGLU1P 启动子为模板制备探针,采用随机引物标记法进行标记,杂交及检测的其他步骤均按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 所述方法进行。

1.6 GUS 活性的组织染色检测

采集 PCR 和 Southern 杂交检测为阳性的转基因烟草植株的根、茎、叶,进行 *GUS* 组织化学分析,*GUS* 的染色按照 Jefferson^[13]的方法进行,同时设立转 pBI121 质粒烟草和未转化烟草对照。将待测材料的根、茎、叶及对照分别放入 1.5 mL 的 Eppendorf 中,加入 *GUS* 染色液,37 ℃保温过夜,根样直接观察,茎、叶样用体积分数 75%的乙醇脱色至阳性对照为白色时再进行观察,并照相记录结果。

2 结果与分析

2.1 玉米根部特异性启动子 ZmGLU1P 片段的克隆及重组克隆载体的鉴定

在 PCR 扩增时,由于玉米根部特异性启动子中含有很多 AT 碱基,普通的 PCR 扩增条件不易得到目的片段,本研究通过多次调整 PCR 反应条件,最终利用两点法扩增得到目的片段,确定的 PCR 最佳反应条件见 1.2 节。PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,得到 1 条约 1 846 bp 的特异性条带(图 2),与预期结果相符。

重组克隆载体 pMD18-T-ZmGLU1P 经 PCR 和 *Hind* III/*Xba* I 双酶切鉴定,结果(图 3)表明,获得的

片段与目的片段长度一致,说明目的片段 ZmGLU1P 已成功连入克隆载体 pMD18-T Vector 中。

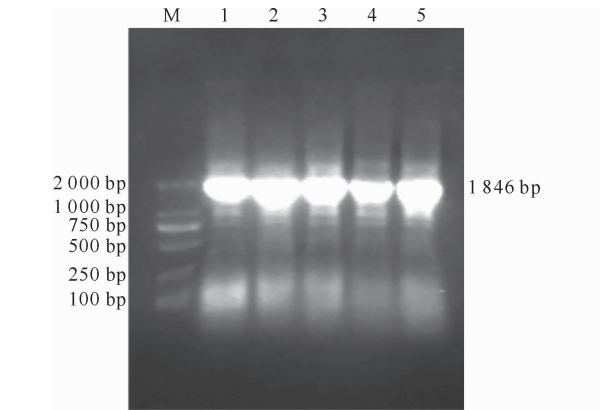


图 2 玉米根部特异性启动子 ZmGLU1P 片段 PCR 产物的电泳检测
M. DNA 分子量标准;1~5. PCR 产物
Fig. 2 Electrophoresis detection of PCR product of corn root-specific promoter fragment ZmGLU1P
M. DNA Marker;1-5. PCR product

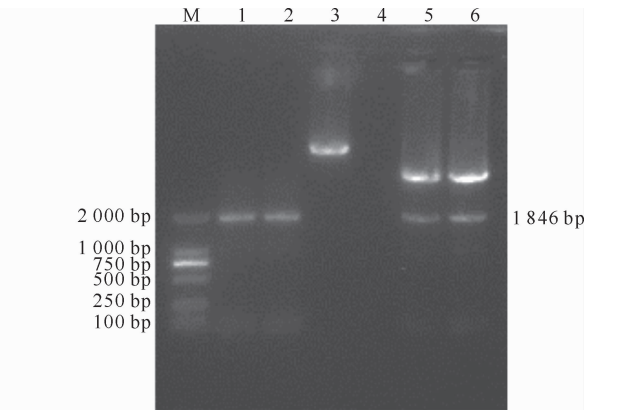


图 3 pMD18-T-ZmGLU1P 的 PCR 和酶切鉴定
M. DNA 分子量标准;1,2. PCR 产物;3. pMD18-T-ZmGLU1P 质粒;
4. 阴性对照;5,6. *Xba* I /*Hind* III 双酶切产物
Fig. 3 Restriction identification of the recombinant clone pMD18-T-ZmGLU1P
M. DNA Marker;1,2. PCR product;3. Plasmid of pMD18-T-ZmGLU1P;4. Negative control;
5,6. pMD18-T-ZmGLU1P digested by *Xba* I and *Hind* III

2.2 玉米根部特异性启动子 ZmGLU1P 片段的序列分析

对重组克隆载体 pMD18-T-ZmGLU1P 的插入片段 ZmGLU1P 测序后进行序列分析,结果表明该片段长 1 846 bp,与已发表的基因序列(GenBank 注册号为:DQ333310)的同源性为 99%。利用生物数据库([http:// www. dna. affrc. go. jp/PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/))对 ZmGLU1P 序列进行启动子调控元件分析,结果表明 ZmGLU1P 中含有多种在其他植物启动子中存在的通用启动子元件(如 TATA 盒和 CAAT 盒)以及根部特异表达所必需的调控元件(如 ACGT 核心序列和 CANNTG-motifs、GATA-motifs 等顺式作用元件及诱导物应答元件 W-box((T)TGAC(C))、AACA(AAACAA)和 GCAAAA(GCN4))。由此可以推测,克隆的片段为玉米根部特异性启动子。

2.3 ZmGLU1P-GUS 根部特异性表达载体的鉴定

利用限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 对 pMD18-T-ZmGLU1P 和植物表达载体 pBI121 分别进行双酶切,将 pMD18-T-ZmGLU1P 小片段和 pBI121 大片段用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选出 5 个阳性克隆,经 PCR 和 *Xba* I、*Hind* III 双酶切鉴定得到 1 条约 1 846 bp 的特异性条带(图 4),与预期片段长度一致,表明根部特异性表达载体 ZmGLU1P-GUS 构建成功。

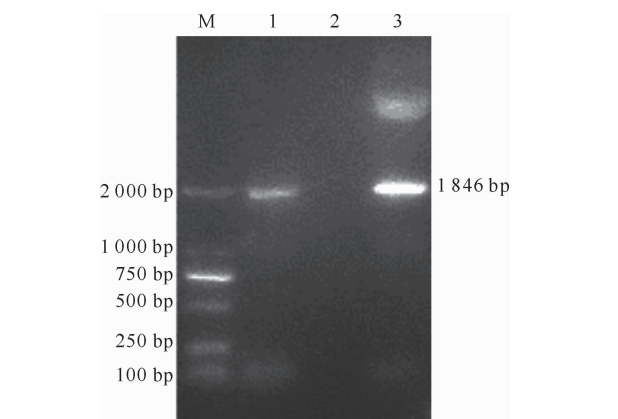


图 4 玉米根部特异性表达载体 ZmGLU1P-GUS 的 PCR 和酶切鉴定
M. DNA 分子量标准;1. PCR 产物;
2. 阴性对照;3. *Xba* I、*Hind* III 双酶切产物
Fig. 4 Identification of root-specific expression vector ZmGLU1P-GUS
M. DNA Marker;1. PCR product;2. Negative control;
3. ZmGLU1P-GUS digested by *Xba* I and *Hind* III

2.4 转化烟草植株的 PCR 和 Southern 杂交检测

将根部特异性表达载体 ZmGLU1P-GUS,通过液氮冻融法转化到根癌农杆菌 EHA105 中,对转化得到的单菌落进行 PCR 检测,结果获得了 1 846 bp 的片段(图 5),然后采用农杆菌介导法对烟草 NC89 进行遗传转化,获得了批量具有卡那霉素抗性的转化植株。

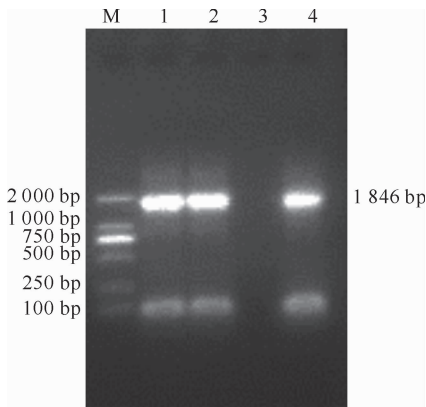


图 5 ZmGLU1P-GUS 转入根癌农杆菌的 PCR 检测
M. DNA 分子量标准;1,2. 转入 ZmGLU1P-GUS 的农杆菌 EHA105;3. 水阴性对照;4. ZmGLU1P-GUS 质粒阳性对照
Fig. 5 PCR analysis of ZmGLU1P-GUS in *Agrobacterium*
M. DNA Marker;1,2. ZmGLU1P-GUS introduced into *Agrobacterium* EHA105;3. Negative control of water; 4. Positive control of plasmid ZmGLU1P-GUS

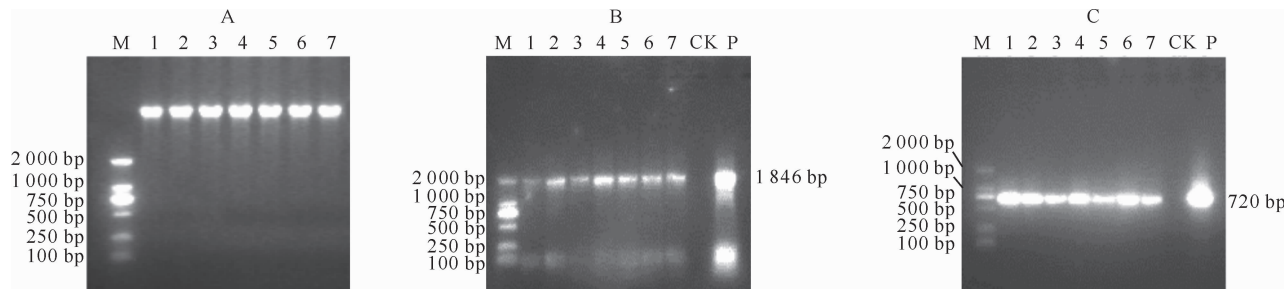


图 6 转基因烟草的 PCR 检测
A. 转基因烟草基因组的检测;B. ZmGLU1P 启动子的 PCR 检测;C. GUS 基因的 PCR 检测;
M. DNA 分子量标准;P. ZmGLU1P-GUS 质粒阳性对照;CK. 未转基因植株(阴性对照);1~7. 转基因阳性植株

Fig. 6 PCR analysis of transgenic tobaccos

A. Genomic analysis of transgenic tobaccos;B. PCR analysis of ZmGLU1P A promoter;C. PCR analysis of *GUS* gene;
M. DNA Marker;P. Positive control of plasmid ZmGLU1P-GUS;CK. Negative control;1~7. Putative transgenic plants

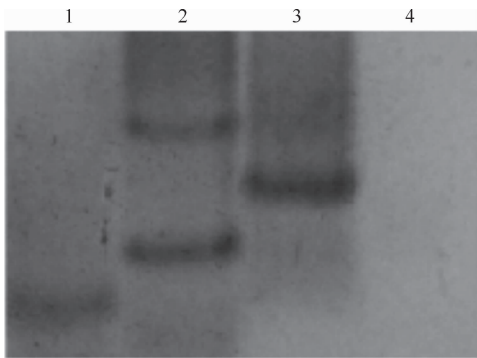


图 7 转基因烟草的 Southern 杂交检测
1. 阳性对照;2~3. 转基因植株;4. 阴性对照
Fig. 7 Southern blot analysis of transgenic tobaccos that carrying the ZmGLU1P-GUS construct
1. Positive control;2-3. Transgenic tobaccos;4. Negative control

2. 4. 1 PCR 检测 从卡那霉素抗性植株幼叶中提取基因组 DNA,用克隆玉米根部启动子 ZmGLU1P 所用引物和 *GUS* 基因的特异性引物进行 PCR 检测。结果(图 6)表明,在再生抗性植株中,共有 7 株扩增出 1 846 bp 的 ZmGLU1P 启动子和 720 bp 的 *GUS* 基因目的片段,与阳性对照 ZmGLU1P-GUS 扩增产生的条带在同一位置,而阴性对照植株无扩增条带产生。结果初步表明,获得了转基因阳性烟草植株。

2. 4. 2 Southern 杂交检测 Southern 杂交检测结果表明,PCR 检测为阳性的 2 株转基因烟草均具有明显的杂交信号,而对照植株无杂交信号产生(图 7),进一步证明供试 2 株转烟草植株是转基因阳性植株,说明外源基因 ZmGLU1P 启动子序列已经整合到烟草的基因组中。分析 Southern 杂交结果可知,不同的转基因植株中的杂交带的大小略有不同,提示外源基因的整合位点不尽相同。

2. 5 转基因烟草 GUS 活性的检测

GUS 活性组织化学染色检测结果(图 8)表明,转 ZmGLU1P 根部特异性表达载体的转基因烟草幼根具有很强的 GUS 活性(染成蓝色),而其他部位 GUS 活性甚微(染成淡蓝色),表现出明显的组织特异性;在转 pBI121(*GUS* 基因由 CaMV35S 启动子驱动)植物表达载体的转基因烟草的各个部位均检测到 GUS 活性(染成蓝色);非转基因烟草植株的各个部位均未检测到 GUS 活性(不染色,呈黄白色)。以上结果表明,转基因烟草的 *GUS* 基因是在根部特异性启动子 ZmGLU1P 的调控下特异性表达的,证明玉米 β -葡萄糖苷酶基因上游 1 846 bp 片段具有根部特异性启动子的功能。

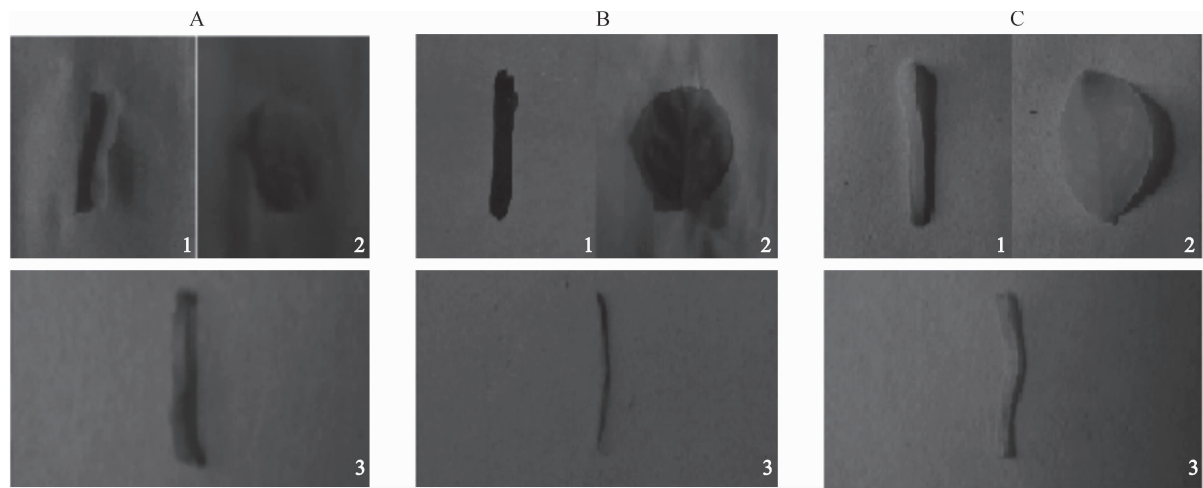


图 8 转基因烟草的 GUS 组织化学染色

A. 转 ZmGLU1P-GUS 质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;B. 转 pBI121 质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;C. 未转化烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;1. 茎;2. 叶片;3. 根

Fig. 8 GUS expression in transgenic tobaccos

- A. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of transgenic tobaccos carrying the ZmGLU1P-GUS;
- B. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of transgenic tobaccos carrying the pBI121;
- C. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of non-transformed tobacco as negative control;

1. Stem segment;2. Leaf;3. Root

3 讨 论

在基因工程研究中,基因的表达调控是一个十分复杂的过程,启动子过强或过弱都有可能影响到基因的表达,并对其他基因的表达产生影响。挑选一个组织特异性强、表达模式与强度适当的启动子往往是基因工程试验成败的关键。

启动子的表达效率以及时空表达模式是启动子上的顺式作用元件与相应的转录因子协同作用的结果。启动子驱动基因表达需要多个顺式元件,这些元件的种类、数量及彼此之间的顺序与距离,都可能影响基因的转录与否或转录程度^[14]。利用生物数据库([http://www.dna.affrc.go.jp/ PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/))对启动子 ZmGLU1P 序列进行分析,结果表明 ZmGLU1P 具有真核生物启动子的重要顺式作用元件及根部特异表达序列。本试验克隆的 ZmGLU1P 中富含 A/T 序列。Stalberg 等^[15]认为,富含 AT 的区段大多是转录因子的结合部位,可调控下游基因的高效表达。从上述分析结果可以看出,ZmGLU1P 启动子中存在负责根部特异性表达的调控元件,能在根中特异性启动 GUS 基因的表达。通过对 ZmGLU1P 基因结构的初步分析,表明 ZmGLU1P 启动子中存在负责根特异性表达的功能

区域,具有顺式作用元件,同时能在根中特异性或优先地激活,从而启动 GUS 基因的表达。

本试验从玉米基因组 DNA 中扩增到 1 846 bp 的玉米根部特异性启动子 ZmGLU1P 序列,通过启动 GUS 基因在烟草中的表达,证明了 ZmGLU1P 具有根部特异性启动子的功能。GUS 基因融合表达系统是植物基因启动子活性研究最常用的表达系统^[16],本研究 GUS 活性组织化学染色结果表明,ZmGLU1P 足以启动报告基因 GUS 的表达,而且 ZmGLU1P 驱动的 GUS 基因在小苗的幼根中表达活性最强,这与文献[8]报道的 1 907 bp 的启动子功能是一致的。下一步的研究还将对 ZmGLU1P 基因的调控功能进行深入分析,使其能够使所需的目的基因在玉米的根部大量表达,为玉米品质的改良奠定基础。

[参考文献]

[1] 宋 扬,周军会,张永强. 植物组织特异性启动子研究 [J]. 生物技术通报,2007(6):21-24.
Song Y,Zhou J H,Zhang Y Q. Research on plant tissue-specific promoters [J]. Biotechnology Bulletin,2007(6):21-24. (in Chinese)

[2] 焦改丽,孟钊红,郭三堆,等. 花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子在转基因棉花中的表达 [J]. 作物学报,2004,30(11):1135-1139.

Jiao G L, Meng Z H, Guo S D, et al. Expression of CaMV 35S promoter in transgenic cotton [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(11): 1135-1139. (in Chinese)

[3] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 等. 植物基因启动子研究进展 [J]. *遗传学报*, 2004, 12: 130-139.

Zhang C X, Wang W Q, Jiang X N, et al. Review on plant gene promoters [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 12: 130-139. (in Chinese)

[4] 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): 492-495.

Hou B K, Xia G M, Chen Z H. Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2001, 23(5): 492-495. (in Chinese)

[5] Shirsat A, Wilfword N, Croy R, et al. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of apea legumin gene in tobacco [J]. *Molecular and General Genetics*, 1989, 215: 326-331.

[6] Colleen G S, Gaulil L S, Timothy W C. Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33: 405-416.

[7] Yamamoto Y T, Taylor C G, Acedo G N, et al. Characterization of cisacting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco [J]. *Plant Cell*, 1991, 3: 371-382.

[8] Riliang G, Li Z, G Wang G Y. Isolation of a maize beta-glucosidase gene promoter and characterization of its activity in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(1): 1157-1165.

[9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744.

Wang G L, Fang H J. *Plant genetic engineering* [M]. Beijing: Science Press, 2002: 744. (in Chinese)

[10] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 9877.

[11] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L. A simple and general-method for transferring gene into plant [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229-1231.

[12] Murashige, T & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.

[13] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5(4): 387-405.

[14] 付永平, 周海涛, 王丕武. 大豆种子特异性启动子的克隆及功能分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(12): 105-118.

Fu Y P, Zhou H T, Wang P W. Cloning and identification of the seed specific promoter from soybean [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2009, 37(12): 105-118. (in Chinese)

[15] Stalberg K, Ellerstrom M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds [J]. *Planta*, 1996, 199: 515-519.

[16] Moon H, Callahan A M. Developmental regulation of peach ACC oxidase promoter-GUS fusions in transgenic tomato fruits [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(402): 1519-1528.