

植物基因工程中人工启动子的研究进展

彭舒^{1,2}, 黄真池¹, 欧阳乐军^{1,2}, 程杰^{1,2}, 曾富华^{1,*}

¹湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东湛江524048; ²湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙410128

摘要: 启动子是调控基因转录的一段DNA,也是构建基因工程表达载体的重要元件。天然启动子在表达强度和特异性等方面存在一定的局限性。采用人工构建的方法,有望得到诱导因子广、本底活性低、表达强度高、启动表达快等特点的启动子。本文综述了人工启动子在诱导表达、组织特异性表达、高效表达等方面的研究进展。

关键词: 人工启动子; 诱导表达; 组织特异性表达; 高效表达

Research Progress of Artificial Promoter in Plant Genetic Engineering

PENG Shu^{1,2}, HUANG Zhen-Chi¹, OUYANG Le-Jun^{1,2}, CHENG Jie^{1,2}, ZENG Fu-Hua^{1,*}

¹School of Life Science & Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; ²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

Abstract: Promoter is a piece of DNA fragment that regulates gene transcription by allowing RNA polymerase and transcription factors binding to it. Promoter is also an important element in the expression vectors in genetic engineering. However, there are some limitations in natural promoter, such as low expression activity and low specificity. Alternatively, artificial constructed promoters are expected to overcome those limits and achieve advantages, such as more induction factors, low basal activity, high expression activity and quick expression initiation. In this paper, we reviewed research advances in artificial promoter constructions in terms of the inducible expression, tissue-specific expression and high-efficiency expression.

Key words: artificial promoter; inducible expression; tissue-specific expression; high-efficiency expression

启动子是调控基因转录的一段DNA序列,也是基因转录调控机制和表达模式中最关键的因子。对植物启动子的研究有助于了解基因转录调控机制和表达模式,并有效地应用于基因工程中提高或改进外源基因的表达。过去的研究集中于天然启动子的结构、功能及分类。现在,启动子的研究重心已转移到对人工启动子的研究上,即自由组合不同启动子元件,替换或重新设计序列构建人工启动子,以期得到更强表达调控水平的启动子。通过人工启动子调控目的基因,实现基因的精确表达,从而实现基因的组织器官特异性、发育阶段特异性、外部环境和内部激素诱导特异性的准确表达。

与天然启动子相比,人工启动子可根据不同目的自由构建,达到基因表达时间和空间上的精确性。研究发现,同一启动子元件在不同植物中相对保守,因此自由组合不同启动子元件构建人工启动子,有望得到具诱导因子广、本底活性低、表达强度高、启动表达快等特点的人工启动子。

人工启动子为转录活性的定向调节提供了一

个有效的手段,并且人工合成启动子的运用可为顺式调控元件的重排,顺式和反式调控机制的阐明以及在未来植物生物技术的应用等方面带来一定的帮助。对启动子元件和调控机制的研究为构建人工启动子提供了理论基础(Heintzman和Ren 2007; Juven-Gershon和Kadonaga 2010)。目前,构建人工启动子最常用的两个方法是核心启动子顺式元件上游的组合和单向启动子的双向结合(图1)。

构建理想的人工启动子需要合适的元件。Hammer等(2006)介绍的两种获得启动子文库的方法是人工启动子优化研究的有力工具。Phuong-Phan等(2010)建立了一种简捷筛选强启动子的方法,该法可快速筛选出恰当长度的启动子,为人工启动子高效准确地合成提供了保障。Schlabach等(2010)通过构建10 bp重复序列文库进行无偏筛选

收稿 2010-10-25 修定 2010-12-29

资助 广东省自然科学基金(8152404801000011、10152404801000005、10452404801004328)。

* 通讯作者(E-mail: zengfuhua@gmail.com; Tel: 0759-3183622)。

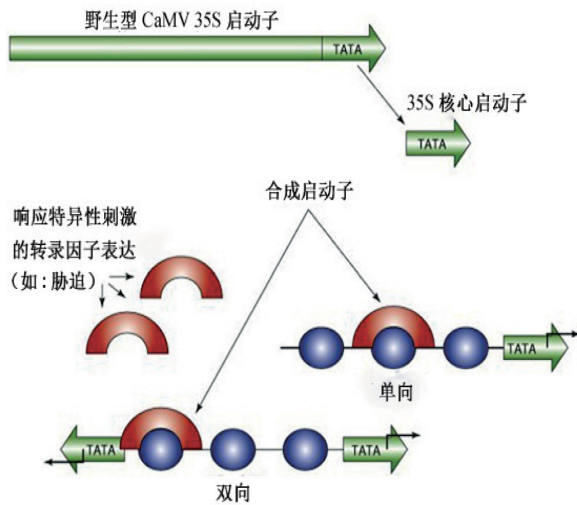


图1 植物人工合成启动子简图(Venter 2007)

Fig.1 Simplified representation of a plant synthetic promoter (Venter 2007)

识别了大量合成增强子元件, 这些元件能够提高CMV启动子的转录, 并为人工启动子的合成提供了参考。

1 人工启动子与基因的诱导表达

启动子应答诱导可通过以下因素调控: (1)生物和非生物胁迫(如病原菌、创伤、昆虫、干旱、盐、光照、冷和热胁迫); (2)激素(如乙烯、生长素、脱落酸、水杨酸等); (3)化学药品(如四环素、铜、雌二醇、地塞米松等)。外界环境胁迫不同程度影响植物的生长发育, 甚至对植物产生致死作用(Hasegawa等2000)。解决该问题可用专一性逆境胁迫诱导启动子, 但目前鉴定的胁迫诱导启动子的诱导调控能力和抗逆转录活性仍不能使植物有合适的抗逆性, 因此通过构建更加灵敏、准确、经济、高效的多诱导因子人工启动子, 从而提高植物对多种逆境的抵抗能力。Rushton等(2002)利用W1-box、W2-box、GCC元件、JERE元件等组合成多种四聚体人工启动子。经过大量亲和性、非亲和性以及非寄主互作形式的分析, 发现不同启动子的诱导因素有明显差别, 其本底表达水平及诱导程度和快慢有很大差异。

人工启动子已经成为指导基因定向表达的有力工具, 并且进入了植物应答特异的生物或非生物因子的发展阶段。Zhu等(2008)利用重叠延伸PCR技术构建了两个嵌合启动子pCL和pLC, 调控

基因在马铃薯块茎组织中和冷诱导条件下的表达。GUS活性结果显示, 受冷处理诱导, pCL启动子调控的GUS活性在块茎中升高了约63%; 在叶片中, 嵌合启动子pCL也具有较高的冷诱导活性, 但20℃时无转录活性。与pCL启动子相比, 20或2℃条件下, pLC启动子在马铃薯所有的组织中的活性都较低, 但经过冷处理后, 地上茎和匍匐茎的GUS活性都有轻微的增加, 而地下块茎中的GUS活性显著增加约68%。现有报道两个人工启动子4×ABRE(来自小麦的4个串联重复脱落酸应答元件)和2×ABRC(2个串联重复的脱落酸应答元件连接2个拷贝的大麦HVA22结合元件), 各自与CaMV35S的最小启动子结合, 能够诱导报告基因*gus*(β -glucuronidase)在转基因烟草中对高盐浓度、脱水、脱落酸的应答表达, 证明它们能够作为一种有效的胁迫诱导启动子(Roychoudhury和Sengupta 2009)。

与应用组成型启动子相比, 抗病基因工程中应用诱导启动子具有明显优势。但是单一病原诱导启动子的诱导因子很有限, 因此将不同的病原物诱导因子构建在同一植物表达载体中, 可增加诱导因子, 扩大转基因植物的抗病谱。将烟草的两个具有高度病原物特异性诱导的启动子EAS4和hsr203J串联置于含双边界序列植物双价表达载体p2301NG的*gus*基因前, 转化烟草的结果表明, 正常生长情况下, 转基因烟草检测不到GUS活性或活性极低, 而受疫霉激发子*parasiticein*、*Phytophthora nicotiana*的孢子悬浮液和*Ralstonia solanacearum*的菌悬液诱导后, 转基因烟草叶片中可检测到明显的GUS活性(王丹丹等2009)。这表明双病原物诱导启动子具有良好的诱导活性, 可用于植物遗传转化。

2 人工启动子与组织特异性表达

利用人工启动子可提高外源基因在特定部位表达的强度, 增强外源基因表达效率, 还可以降低因外源基因过表达对寄主植物带来的负担, 减轻对作物农艺性状的不良影响, 从而改良农作物品质, 提高作物的抗逆境能力和抗病性等。

植物基因的启动子区通常包含众多调控元件, 这些调控元件共同完成基因转录的精细调节。随着对这些调控元件的深入了解, 根据需要设计符

合要求的细致而精巧的组织特异表达启动子将成为可能。张秀春等(2009)利用植物防御基因中的病原诱导响应元件和最小35S启动子(-62~+1),人工合成了启动子SAR,并以*gus*基因为报告基因,在转基因拟南芥中研究人工启动子的表达特性。结果表明,SAR启动子在子叶、毛刺、根茎交接处和根系中优势表达,在老叶中的表达量高于幼叶,说明SAR启动子具有组织和发育表达特异性。Cazzonelli和Velten (2008)通过叶片瞬时表达和稳定遗传转化植株来检测含DR (directly-repeated)盒组合的人工启动子(SynPro3和SynPro5)对报告基因(荧光素酶)的调控效果。这些人工启动子在转基因烟草所有发育阶段和大多数组织中都显示出了报告基因的强表达。与SynPro5相比,SynPro3在叶中显示出相对较高的荧光素酶表达,而相对于SynPro3,SynPro5在其它维管组织,如根和茎中表现出相对较高的荧光素酶活性。SynPro3和SynPro5启动子中的DR元件的排列在组织特异性表达中有重要作用。

在植物转基因研究中,使用天然启动子往往不能得到满意的结果,尤其是在特异表达或诱导表达时,表达水平不够理想。因此选择合适的启动子或对启动子进行改造,是增强外源基因特异表达的重要手段。Lv等(2009)将小启动子(35Smini或GRPmini)结合在特异表达启动子(GRPp或4CL1p)的5'端形成双向启动子(35Smini-GRPp、35Smini-4CL1p或GRPmini-GRPp),这些双向启动子能够指导*gus*和*gfp*基因在所有独立的转基因烟草的维管特异表达。转基因植物的维管特异性二元双向启动子可用于同时调控某些维管特异性功能基因的表达。这一方法还可用于其它植物中极性启动子的生物技术研究。

使用人工启动子除了可增强外源基因组织特异性表达外,还可利用组织特异性启动子的不同片段与组成型CaMV35S启动子组合,抑制35S调控基因在各种组织中的表达,减少因外源基因过表达给植株带来的能量耗损。Cai等(2007)将水稻的组织特异性启动子P_{D540}的不同片段(D540-S、D540-P、D540-S/P)与CaMV35S结合调控GUS表达。结果显示,P_{D540-S+35S}:GUS在植物茎中的GUS活性比P_{35S}:GUS的低57%,P_{D540-P+35S}:GUS在小花

序中,GUS活性比P_{35S}:GUS的低78%,而P_{D540-S/P+35S}:GUS在叶、茎、小花序和根中的GUS活性分别比P_{35S}:GUS的低79%、74%、91%和96%。由此可说明D540-S含有强负调控元件,可抑制基因在茎中的表达,D540-P的强负调控元件抑制基因在小花序中的表达。这种对不同组织特异性启动子的负调控元件的鉴定研究,为目的基因表达调控提供了一种新的选择。

3 人工启动子与基因的高效表达

启动子的转录活性强弱决定了目的基因的表达量。研究证明,通过增加启动子数目或在SD序列(shine-dalgarno sequence)上游安置翻译增强子均能提高外源基因的表达效率。Cazzonelli和Velten (2008)将源于植物病毒的DR插入到35S启动子上游,研究DR作为增强子元件的能力,分析转基因烟草中具有多拷贝或多个DR组合的人工启动子的活性发现,拷贝数越多表达目的基因活性越强。另外由不同DR元件形成的人工启动子的活性显著强于同种DR元件形成的人工启动子。Yang等(2009)将不同拷贝数的GAAATA元件(分别是1、2、3和4拷贝)分别与PNZIP启动子的-133到+1区域的片段相结合,构建成不同的人工嵌合启动子。GUS活性分析显示,GAAATA元件的拷贝串联重复都能增强转基因烟草叶片GUS的瞬时表达,并且4拷贝串联重复的GAAATA元件比其它3种拷贝数的GUS活性高。人工构建启动子研究表明,随着作用元件拷贝数的增加,人工构建启动子的调控强度也随之提高;有多种顺式元件构成的启动子比仅包含一种作用元件的启动子效果更好,效果最好的启动子应包括2种或3种不同的作用元件(McGarvey等1999)。

将单向启动子人工改造为高效双向表达启动子,从而提高基因表达效率,在基因工程研究中具有重要价值。通过在CaMV 35S启动子上游反向连接51 bp的Pmini启动子即(CaMV 35S的小启动子),可实现启动子的双向转录功能(Xie等2001)。同样,Zhang等(2008)通过在CaMV 35S启动子的5'端连接Pmini元件形成人工双向启动子,并分别将*gusA*和*gfp*与双向启动子两端融合,构建成双可视报告基因融合双向启动子的植物二元表达载体pBDGG。GUS和GFP定量分析显示,在不同转基

因烟草系中GUS活性差异显著, 介于8~250 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ (蛋白)之间, 而野生型烟草的GUS活性低于0.03 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ (蛋白)。同样, GFP含量在不同转基因烟草系中差异也显著, 即从0.9~1.8 μg GFP·mg⁻¹ (蛋白)。说明利用这一方法已成功构建了人工高效组成型双向启动子, 并能驱动报告基因高效表达。

在双向启动子两端分别连接不同的功能基因及其组合, 可以一次转入多个功能基因及其组合, 从而提高转基因效率, 增强基因表达。Li等(2004)将2个35S启动子分别插其复式增强子元件的上游和下游, 构建了双向双35S启动子, 与单向35S核心启动子相比, 双向双35S启动子驱动的GUS基因表达量高出206倍。同样, 用CsVMV启动子构建的双向双启动子比单向核心启动子驱动的GUS基因表达量增加200倍。由此表明, 双向双启动子可用于增强转基因表达量以及指导多个转基因的同时表达。

通过生物信息学分析, 将基因表达的调控元件与人工启动子模块相结合, 可驱动目的基因在植物中的高效表达。Sawant等(2001)利用高表达植物基因数据库的核苷酸序列特点, 设计了一个完整表达盒启动子(Pcec), 其在烟草叶中驱动*gusA*瞬时表达的活性高出天然CaMV 35S启动子约9倍, 在T₁代转基因烟草中, Pcec驱动的*gusA*的平均表达量分别比35S启动子在叶片、根、中叶脉中高出2、4、2.5倍。

4 人工启动子与 RNA干扰载体的构建

RNA干扰(RNAi)通过转录后或者在转录水平上对基因进行沉默, 为植物抵抗病毒侵染提供了一个有力手段(Waterhouse 和Fusaro 2006)。利用人工合成双向启动子构建的RNAi载体能够有效地提高植物的抗病性。通过病毒DNA双向启动子驱动小RNA干扰, 转基因木薯增强了对非洲木薯斑点病毒的抗性(Vanderschuren等2007)。

对RNAi技术的应用, 过去常用质粒或病毒载体内源性表达siRNA, 然后筛选稳定表达株, 在细胞中持续抑制靶基因的表达(Hammold等2001)。但是表达siRNA需要合成较长序列, 且序列中的发卡结构增加了后续退火和连接的难度。现已有更成熟的方法获得siRNA。利用2个相对排列的U6

启动子构建RNAi载体, 可在体内直接转录生成siRNA, 并具有较高的抑制活性(Tran等2003)。Kaykas等及Jian等多个实验室在此基础上人工构建H1-U6双启动子载体, 大大提高了载体的稳定性, 并应用其构建随机siRNA文库进行高通量筛选, 拓展了此类载体在基因规模化功能研究中的应用(Kaykas和Moon 2004; Jian等2007)。以pEGFT-C1为原始载体, 插入相向排列的H1-U6启动子表达框, 构建了双启动子RNAi载体, 并利用此载体从*hUbe2w*的5个候选RNAi靶点中筛选出2个有效靶点。结果显示, 两个靶点能在mRNA水平和蛋白质水平显著降低*hUbe2w*的表达(张莹莹等2008)。与siRNA表达载体相比, H1-U6双启动子RNAi载体无需合成反向互补的长片段DNA, 不仅节约费用, 而且小片段DNA与载体的高效连接更有利于载体的快速构建(Tran等2003)。

5 构建人工广谱病原诱导启动子的设想

只采用单一病原物的诱导启动子, 抗性是单一的, 限制了功能基因对入侵病原物的抗性范围。尽管有些单一启动子可受几种病原物诱导表达, 但是其诱导因子还是有限的。植物在环境中常同时遭受多种病原物的攻击, 需要的是广谱抗病性(王丹丹等2009)。所以构建广谱病原诱导启动子对植物抗病基因工程的研究有重要的意义。病原诱导启动子为人工启动子提供了丰富的“原材料”。大量病原诱导基因及其启动子现在已得到了广泛的研究, 其中GCC类元件和W-box元件(Eulgem等2000)研究得最清楚。W-box [(T)TGAC(C/T)]是WRKY转录因子的结合位点, 越来越多的证据表明, W-box是许多病原诱导植物基因的主要顺式作用元件。串连排列的W-box往往与病原的诱导特性有关。欧芹PR2基因的D box和马铃薯*gst1*基因的Gst1 box都具有病原诱导表达的特性(Rushton和Somssich 1998)。PRms基因启动子-246处的ERE元件(ATTGACC)和ZmPR4启动子序列-285~-279处的ERE元件也具有病原诱导活性(Moreno等2005; Raventos等1995)。Peng等(2004)从烟草中克隆到3个受病原物诱导的植物启动子PPP1、PPP2、PPP3, 这些启动子在转基因烟草和拟南芥中受致病性青枯菌的诱导。随着对启动子作用元件和抗病调控机制研究的深入, 成功分离

或人工构建更理想启动子的可能性会越来越大。自由组合不同的启动子元件构建成人工合成的启动子, 有望得到诱导因子广、本底活性低、启动表达快等特点的人工病原物诱导型启动子, 为构建植物病原诱导特异型启动子提供了新思路。因此, 可将人工启动子应用于作物遗传转化研究和病原物诱导型启动子的研究, 提高作物的抗病性。

植物抗病育种中缺乏可以直接利用的抗源, 常规育种很难得到抗病品种。利用基因工程技术可以打破传统育种中种间不亲和现象, 消除杂交障碍, 极大地拓宽了抗性基因的来源和应用。但实践证明, 抗性基因的高效表达虽然提高了植物的抗病力, 但外源基因的过表达会导致植株能量过多耗损, 从而降低其产量。因此, 转基因抗病必须解决好广谱抗性、持久抗性和消除副作用等关键问题。或者说必须解决好怎样控制目的基因表达和控制什么基因表达的问题(Gurr和Rushton 2005)。

鉴于*npr1*基因在转基因拟南芥中过量表达只是提高植株的抗病性而无其他显著性有害影响这一性质, *npr1*基因作为植物广谱抗病性基因已备受关注。在水稻中过量表达拟南芥*npr1*基因(non-expressor of pathogenesis-related genes 1), 可提高转基因水稻对*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*的抗性, 而且RNA点杂交表明抗病性的提高需要*npr1*基因的高表达(Chern等2001)。由*npr1*基因编码的NPR1是植物抗病信号网络中的关键结点, 直接参与植物的系统获得抗性(SAR)和诱导系统抗性(ISR)(Leon-Reyes等2009)。水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯等逆境信号分子通过NPR1调节TGA类和WRKY类转录因子与DNA的结合, 影响抗病相关基因的转录, 引起植物体内活性氧的爆发, 激发超敏反应, 从而增强抗病性(McDowell等2003; Wang等2006)。可利用人工启动子控制*npr1*基因表达, 各种诱导因子引起*npr1*的表达量增加, 产物NPR1蛋白调节TGA类和WRKY类转录因子的活性, 让后者与PR (pathogenesis-related protein)基因的上游启动子的结合, 来增强PRs基因的表达水平, 有望解决抗病基因工程中广谱抗性, 持久抗性和消除负作用等问题。

6 展望

利用逆境、病原物诱导型启动子驱动抗逆、抗病基因在改良作物的抗性研究中已成为热点。然而, 目前能应用于转基因研究的诱导型启动子仍然很少, 理想的病原物诱导型启动子几乎没有。因此, 对于新的抗性相关启动子的构建仍然是今后启动子研究的重点, 以便通过构建人工启动子得到我们所期望的理想病原诱导启动子。F-box、GST1-box、S-box、W-box具有诱导因子广、本底活性低、启动表达快、不受诱导等特点。我们拟采用串连F-box、GST1-box、S-box、W-box二聚体等4个作用元件与35S minimal promoter组合, 构建人工病原物诱导型启动子片段, 精确控制目的基因在需要的时间和组织中表达并适时关闭。用人工启动子控制*npr1*基因的表达, 使多种诱导因子引起*npr1*的表达量增加, 产物NPR1作用于TGA类、WRKY类等转录因子, 促进植物自身多种病程相关蛋白的表达, 有望增强植物对多种病原物的抗性。

参考文献

- 王丹丹, 王荣, 唐丽丽, 刘爱新, 孔维文(2009). 含双病原物诱导启动子植物安全表达载体的构建. 植物病理学报, 39 (2): 153~159
- 张秀春, 崔百明, 任艳利, 李文彬, 彭明(2009). 人工合成启动子SAR在拟南芥中的表达分析. 热带亚热带植物学报, 17 (1): 49~53
- 张莹莹, 李朝, 杨志新, 许龙, 朱恒奇, 周晓巍, 黄培堂(2008). 应用H1-U6双启动子RNAi载体筛选人泛素结合酶hUBE2W的RNAi有效靶点. 生物工程学报, 24 (11): 1975~1980
- Cai M, Wei J, Li XH, Xu CG, Wang SP (2007). A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. Plant Biotechnol, 5: 664~674
- Cazzonelli CI, Velten J (2008). In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters. Transgenic Res, 17: 437~457
- Chen CH, Lin HJ, Feng TY (1998). An amphipathic protein from sweet pepper can dissociate harpin_{ps} multimeric forms and intensify the harpin_{ps}-mediated hypersensitive response. Physiol Mol Plant Pathol, 52: 139~149
- Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong XN, Ronald PC (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. Plant J, 27 (2): 101~113
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci, 5: 199~206
- Gurr SJ, Rushton PJ (2005). Engineering plants with increased disease

- resistance: how are we going to express it? *Trends Biotechnol*, 23: 283~290
- Hammer K, Mijakovic I, Jensen PR (2006). Synthetic promoter libraries—tuning of gene expression. *Trends Biotechnol*, 24: 53~55
- Hammold SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2: 110~119
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 51: 463~499
- Heintzman ND, Ren B (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci*, 64: 386~400
- Huang HE, Ger MJ, Yip MK, Chen CY, Pandey AK, Feng TY (2004). A hypersensitive response was induced by virulent bacteria in transgenic tobacco plants overexpressing a plant ferredoxin-like Protein (PFLP). *Physiol Mol Plant Pathol*, 64: 103~110
- Jian R, Cheng XX, Jiang J, Deng SL, Hu FQ, Zhang JL (2007). A cDAN-based random RNA interference library for functional genetic screens in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 1904~1912
- Juven-Gershon T, Kadonaga JT (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol*, DOI:10.1016/j.ydbio.2009.08.009
- Kaykas A, Moon RT (2004). A plasmid-based system for expressing small interfering RNA libraries in mammalian cells. *BMC Cell Bio*, 5: 16
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FK, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ (2009). Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS—RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol*, 149: 1797~1809
- Li ZJT, Jayasankar S, Gray DJ (2004). Bi-directional duplex promoters with duplicated enhancers significantly increase transgene expression in grape and tobacco. *Transgenic Res*, 13: 143~154
- Lv XM, Song XD, Rao GD, Pan X, Guan LP, Jiang XN, Lu H (2009). Construction vascular-specific expression bi-directional promoters in plants. *J Biotechnol*, 141: 104~108
- McDowell JM, Woffenden BJ (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol*, 21: 178~184
- McGarvey JA, Denny TD, Schell MA (1999). Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPSI production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology*, 89: 1233~1239
- Moreno AB, Penas G, Rufat M, Bravo JM, Estopà M, Messeguer J, Segundo BS (2005). Pathogen-induced production of the anti-fungal AFP protein from a spergillus giganteus confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant-Microbe Interact*, 18: 960~972
- Peng JL, Bao ZL, Li P, Chen GY, Wang JS, Dong HS (2004). Harpin_{Xoo} and its functional domains activate pathogen-inducible plant promoters in *Arabidopsis*. *Acta Bot Sin*, 46 (9): 1083~1090
- Phuong-Phan TT, Nguyen HD, Schumann W (2010). Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*. *Pro Exp Purification*, 71: 174~178
- Raventos D, Jensen AB, Rask MB, Casacuberta JM, Mundy J, Segundo BS (1995). A 20 bp cis-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize *PRms* gene. *Plant J*, 7 (1): 147~155
- Roychoudhury A, Sengupta DN (2009). The promoter-elements of some abiotic stress-inducible genes from cereals interact with a nuclear protein from tobacco. *Biologia Plant Arum*, 53 (3): 583~587
- Rushton PJ, Somssich IE (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Op in Plant Biol*, 1: 311~315
- Rushton PJ, Reinstadler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 14: 749~762
- Sawant S, Singh PK, Madanala R, Tuli R (2001). Designing of an artificial expression cassette for the high-level expression of transgenes in plants. *Theor Appl Genet*, 102: 635~644
- Schlabach MR, Hu JK, Li MM, Elledge SJ (2010). Synthetic design of strong promoters. *PNAS*, 107: 2538~2543
- Tran N, Cairns MJ, Dawes IW, Arndt GM (2003). Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription. *BMC Biotechnol*, 3: 21
- Vanderschuren H, Akbergenov R, Pooggin MM, Hohn T, Grissem W, Zhang P (2007). Transgenic cassava resistance to African cassava mosaic virus is enhanced by viral DNA-A bidirectional promoter-derived siRNAs. *Plant Mol Biol*, 64: 549~557
- Venter M (2007). Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends Plant Sci*, 12: 118~124
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong XN (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog*, 2: 1042~1050
- Waterhouse PM, Fusaro AF (2006). Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science*, 313: 54~55
- Xie MT, He YH, Gan SS (2001). Bidirectionalization of polar promoters in plants. *Nat Biotechnol*, 19: 677~679
- Yang YT, Yu YL, Yang GD, Zhang JD, Zheng CC (2009). Tissue-specific expression of the *PNZIP* promoter is mediated by combinatorial interaction of different cis-elements and a novel transcriptional factor. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkp126
- Zhang CX, Gai Y, Wang WQ, Zhu YY, Chen XM, Jiang XN (2008). Construction and analysis of a plant transformation binary vector pBDGG harboring a bi-directional promoter fusing dual visible reporter genes. *J Genet Genomics*, 35: 245~249
- Zhu Q, Song BT, Zhan C, Ou YB, Xie CH, Liu J (2008). Construction and functional characteristics of tuber-specific and cold-inducible chimeric promoters in potato. *Plant Cell Rep*, 27: 47~55