

三七SE基因启动子的克隆及序列分析

卢荣江, 刘迪秋, 葛锋*, 陈朝银

昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明650500

摘要: 鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)基因是三七皂苷生物合成途径中的关键基因。本文采用染色体步移(genomic walking)技术, 克隆出三七SE基因上游1 872 bp的启动子片段。生物信息学分析表明, 该启动子除了含有基本的TATA-box和CAAT-box元件外, 还包含多个与细胞分裂素响应、抗病以及糖类和储藏蛋白合成等相关的作用元件。

关键词: 三七; 鲨烯环氧酶; 启动子

Cloning and Sequence Analysis of Promoter of SE in *Panax notoginseng*

LU Rong-Jiang, LIU Di-Qiu, GE Feng*, CHEN Chao-Yin

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: The squalene epoxidase (SE) is considered to be a key enzyme involved in *Panax notoginseng* biosynthesis pathway. A 1 872 bp promoter fragment was cloned from *P. notoginseng* using genomic walking technique. The bioinformatics analyses showed that the fragment contained the conserved promoter sequence, such as TATA-box, CAAT-box. Furthermore, it contained several elements related to cytokinin response, disease-related, the synthesis of carbohydrates and proteins.

Key words: *Panax notoginseng*; squalene epoxidase; promoter

启动子是位于结构基因5'上游且能与RNA聚合酶发生特异性识别以及结合的一段DNA序列, 是基因的重要组成部分, 支配生物体内基因表达的起始时间和程度。通常, 根据基因的转录方式将植物基因启动子分为组成型启动子(即基因的表达不受外界环境、时间和空间的影响, 在不同的组织中都可以表达)、诱导型启动子(在某些物质的刺激下, 该类启动子可提高目的基因的转录水平)和组织特异性启动子(该类启动子调控目的基因在植物体内某些特定的组织中表达)(聂丽娜等2008)。启动子存在其固有的保守区域, 通过对多种高等植物基因启动子DNA及其侧翼序列分析发现, 位于转录起始位点上游(32±7) bp处的TATA-box序列以及(-31±2) bp和(-110~80) bp处的GC-box序列较为保守(Joshi 1987; 张小辉和祁艳霞2008)。

目前, 研究启动子的功能已成为研究表达调控的重要内容。通过将启动子部分片段与报告基因(包括葡萄糖苷酸酶基因和绿色荧光蛋白基因等)融合并构建植物表达载体, 再转化模式植物(拟南芥或烟草), 检测报告基因在转基因植株中的表达情况, 进而确认启动子功能(吕山花等2011; 刘红双等2013; 赵学彬等2013)。

三七为五加科人参属植物, 是我国传统中药材, 主产于我国云南省(Luo等2011)。三七总皂苷是三七的主要药理成分, 其具有抗高血压、抗血栓、抗动脉粥样硬化、保肝和神经保护等疗效(Ng 2006), 且具有安全、见效快和无副作用等特点(张微微和李莹2012)。目前, 对三七总皂苷生物合成途径中关键酶基因的克隆与调控研究已有一些研究(石磊等2010), 但迄今, 对三七鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)基因上游启动子的研究尚未见报道。SE作为三七总皂苷生物合成途径的关键酶, 分析其启动子序列, 有助于探究SE基因在三七总皂苷合成途径中的作用。本研究通过克隆SE基因全长DNA序列, 设计特异性引物, 采用染色体步移(genome walking)技术从三七基因组DNA中成功克隆出SE基因的启动子序列。通过生物信息学分析获得与该基因表达调控有关的一些顺式作用元件信息, 为进一步研究SE基因功能及其在三七总皂苷生物合成途径中的调控机制, 以及如

收稿 2014-05-06 修定 2014-07-25

资助 国家自然科学基金项目(31260070)。

* 通讯作者(E-mail: gefeng@tsinghua.org.cn; Tel: 0871-65920621)。

何通过调控启动子来提高SE基因的表达水平,进而提高三七总皂苷合成提供理论依据。

材料与方法

1 材料与试剂

三七[*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen]植株采自云南省文山州。Genome Walking Kit、Taq DNA聚合酶和相关试剂购于大连TaKaRa生物工程有限公司,胶回收试剂盒购于上海生工生物工程有限公司,pGEM[®]-T Easy载体购于Promega公司,大肠杆菌感受态Trans1-T1购于北京TransGen生物技术有限公司。

2 实验方法

2.1 Tail-PCR分离三七SE基因启动子

采用改良的CTAB法(李荣华等2009)提取叶片基因组DNA,以提取的总DNA作为模板,SE基因的上下游引物(Niu等2014),进行PCR,克隆SE基因全长DNA序列。根据获得的SE基因5'端序列,用Primer 5.0设计3条同向且退火温度较高的特异性引物SE-SP1、SE-SP2和SE-SP3。SE-SP1: 5' AG-CAACCCCGGCGCCGACGATGATG 3', SE-SP2: 5' GCTATGATCTGTTCCAACTCCGTGG 3', SE-SP3: 5' CCCAAAAGGAAAGCAAAGATC-CATCC 3'。

以纯化的三七基因组DNA为模板,分别使用Genome Walking Kit试剂盒中提供的4种独特的简并引物AP1、AP2、AP3、AP4以及SE-SP1、SE-SP2、SE-SP3为引物。第一轮巢式PCR反应,取0.5 μg三七叶基因组DNA作为模板,以AP1、AP2、AP3和AP4为上游引物,SE-SP1为下游引物,进行第一次巢式PCR,反应程序如下: 94 °C启动1 min; 98 °C预变性1 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 共进行5个循环; 94 °C变性30 s, 25 °C退火3 min, 72 °C延伸2 min, 1个循环; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 共15个循环,最后72 °C延伸10 min。再取第一轮巢式PCR反应产物1 μL作为第二轮巢式PCR反应的模板,以AP3为上游引物,SE-SP2为下游引物,进行第二轮巢式PCR,反应程序如下: 94 °C变性30 s, 65 °C退

火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 共15个循环,最后72 °C延伸10 min。取第二轮巢式PCR反应产物1 μL作为模板,以AP3引物为上游引物,SE-SP3引物为下游引物,进行第三轮巢式PCR,反应程序如下: 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 共15个循环,最后72 °C延伸10 min。分别取第一轮、第二轮和第三轮巢式PCR反应液各5 μL,进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,将第三轮PCR扩增的特异性条带用胶回收试剂盒回收纯化。

2.2 SE基因启动子的克隆

纯化后的巢式PCR产物连接到pGEM[®]-T Easy载体上,热激转化到大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞中,涂布于含有氨苄青霉素的LB平板上,随机挑取10个单克隆于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中37 °C培养约6 h,以菌液作为模板,选用M13通用引物进行PCR扩增,然后用1.0%的琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测。依据电泳检测结果,将获得的阳性克隆子送往上海生工生物工程有限公司测序。

实验结果

1 三七SE基因启动子的克隆

实验使用简并引物AP3,经过3轮巢式PCR,从三七叶基因组DNA扩增获得一条长为2 069 bp的特异性条带(图1)。将目的片段纯化后,克隆测序结果显示,巢式PCR获得片段全长2 069 bp,其3'端与获得的SE基因全长的5'端有194 bp相同,与之前的实验设计相吻合,可见克隆的片段即为SE基因翻译起始密码子ATG上游序列,命名为SEP。

将PCR产物胶回收,回收后的目的片段进行TA克隆获得连接产物pGEM-T-SEP。热激转化大肠杆菌,氨苄青霉素筛选后,使用M13通用引物进行菌液PCR检测鉴定,结果如图2所示,初步说明已获得阳性克隆,且大小与预期相符。

2 SE启动子的序列分析

用TSSP-TCM在线软件(Shahmuradov等2005)对SE基因启动子序列进行分析,利用PLACE软件

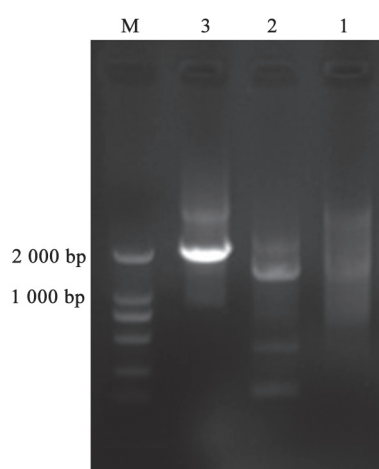


图1 SE基因启动子的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of SE gene promoter

M: DL2000 DNA marker; 1: 第一轮PCR扩增产物; 2: 第二轮PCR扩增产物; 3: 第三轮PCR扩增产物。

<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> (Prestridge 1991; Higo等1999)对三七SE基因启动子序列进行元件预测。如表1和图3所示, 该启动子除了含有绝大多数真核生物启动子所具有的保守序列元件TATA-box和CAAT外, 还具有Inr元件INRNTPSADB, 这3个元件普遍存在于真核蛋白编码基因中。启动子序列中还包含多个与激素以及非生物胁迫等相关的顺式作用元件。激素响应作用元件包括: 脱落酸响应调控元件DRE2COREZ-MRAB17; 赤霉素响应元件PYRIMIDINEBOXH-VEPB1和PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A; 细胞分裂素响应相关元件ARR1AT; 乙烯相关调控元件WBOXNTERF3。非生物胁迫响应相关顺式作用元件主要包括: 低温响应元件LTRE1HVBLT49; 与盐诱导相关的调控元件GT1GMSCAM4; 光响应元

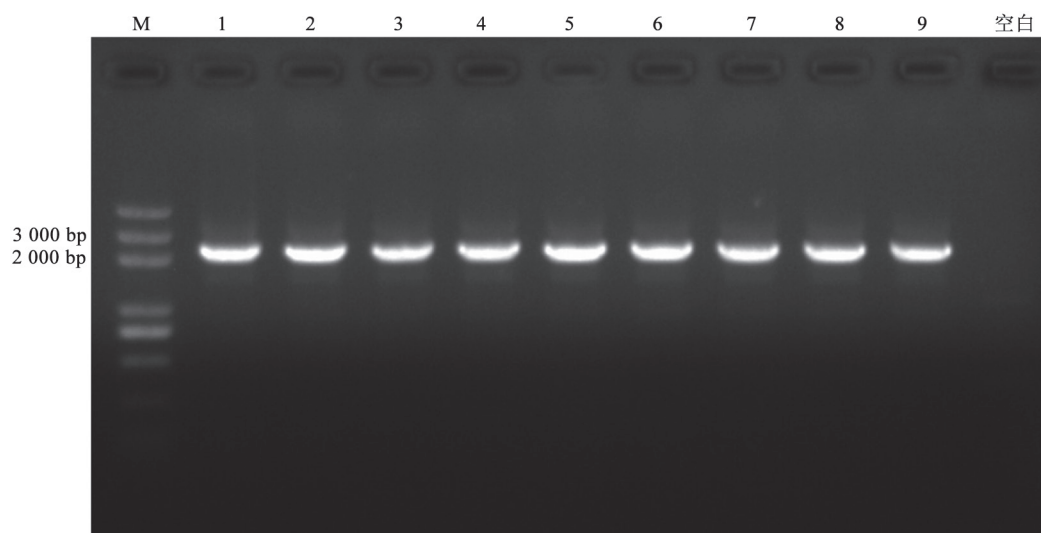


图2 pGEM-T-SEP大肠杆菌菌液PCR检测

Fig.2 PCR detection of pGEM-T-SEP in *E. coli*

M: DL5000 DNA marker; 1~9: 菌液样品。

件-10PEHVPSBD; 黑暗应答元件ACGTATERD1。这些作用元件的发现可以初步说明SE基因的转录水平可能受到激素(如脱落酸、赤霉素、细胞分裂素和乙烯)及非生物胁迫(高盐、低温和光照)等多种理化因素的调节。同时在SE启动子序列中还发现DOFCOREZM、OSE1ROOTNODULE和CACT-FTPPCA1等器官特异性表达的元件, 初步说明SE在植物体内的表达可能具有组织特异性。

讨 论

启动子作为转录调控的关键区域, 是近年来基因工程研究的热点。启动子在转录过程中起重要作用, 而转录调控是基因调控的重要手段, 研究启动子序列为揭示基因表达调控机制提供了重要证据。SE是三七总皂苷生物合成途径中的关键酶, 目前未见其启动子的研究报道, 本文通过染色体步移技术, 成功克隆出三七SE基因起始密码子上

游1 875 bp序列, 离起始密码子最近的转录起始位点为A (定义为+1位)位于起始密码子上游93 bp处。通过PLACE在线软件分析发现该启动子序列含有大量的顺式作用元件(图3和表1)。其中, 典型的控制元件TATA-box (与RNA聚合酶II结合的核心元件) (Butler和Kadonaga 2002)位于转录起始位点上游-32 bp处, 还有CAAT-box (可能与RNA聚合酶的某处结合, 并控制着转录起始的频率, 对转录的起始无直接影响) (Breathnach和Chambon 1981)和Inr元件INRNTPSADB, 这3个元件已被证实为参与蛋白编码基因的核心启动子构件(谢在春等

2007)。另外, *SE*基因启动子中还发现有多种与逆境诱导相关调控元件: GT1GMSCAM4 (参与盐诱导相关的调控元件) (Park 2004)、LTRE1HVBLT49 (低温响应元件) (阴霞等2014)、-10PEHVPSBD (光响应元件) (Tian等2011)、ACGTATERD1 (黑暗应答元件) (Simpson等2003), 以及其他与一些植物激素响应的调控元件, 如脱落酸响应调控元件DRE2COREZMRAB17、赤霉素响应元件PYRIMIDINEBOXHVEPB1和PYRIMIDINEBOXOS-RAMY1A、乙烯相关调控元件WBOXNTERF3 (Nishiuchi等2004)。同时在*SE*基因启动子序列发

```

-1774 GAGTGTGCATATTTTGGAGTGCTTTCATTTCAATCCATATATTCAACAACAATTGGCAGAAGCTGATTA
      植物激素调节元件
-1704 TTGTATATACACCTCCACTGCAATTGAAATTGAAACCACAAATGAAATGGATTTTGAGATTTTTTTGT
-1634 GGGTCAGATCAGATGGAATGGAGTGGTGTGCGCGGAGCAAATGAATAGGTTTGGTTTTACCTTCA
-1564 AGTAGGAAGAATAGATAAGACTTGTTTTTAAGTTTAATATTTTATTTATTTATGGTTATCATATTACTT
      GATA-box 植物激素调节元件
-1494 TCTTTGTAGGAAATTAAGGTCAAATCGGAAAAATGAACGAATTCGACATAAATGTCACCTTAAATATT
      与抗病相关的元件
-1424 TAATTAACGAAAAATAAATTTAAGGACGATCTTAAACTATATAACAACCTAGATACACAGCAGTGTTA
-1354 TTCAGCTCATCTAATATTATACACCTAATTTATACATTTAATTGGAGGCACATACATCAACCAATATTTA
-1284 TGTTTGAATTAATTTAAAATAATACTACTATCACATAAAAAATGTCACATAATACTCACATATACAAA
      Skn-1_motif
-1214 CATGCATAACCGGGGCCCCACATGTTAGGCGGAGCACACAATATGCATGTGTATGTATGTAATACATA
-1144 AAACTTTTTTTATGTGATAACATTATCTTAATTTTATACGTTCTCACTCATTTAACACCTAATTT
      GATA-box
-1074 TCTGTCCGCACTATTACTATTATTTTGTCTCTCCCTCATTTATAACTATTCTAGCATCCCATGAC
-1004 CATGCTGTGTAAATATACTTTATTTTAAACATTTGATTTTTCCTATAAATATAAAAAAAGGGATA
      乙烯相关调控元件 与细胞分裂素响应相关
-934 TAAATCTATCAACCCCATATTTATGAAAAAATATATCTGCCCCATAAGAATGTAGTAGTGTGATA
      与盐诱导相关的调控元件 GATA-box
-864 GATTTTGACGATAAATATGGTTGTGCTGGCACCAAAACAACAATACCGAACGCCAAACCCCATATAGC
-794 CAAGACCATTTAGACCCTTAAATGCCACCATTCTCCACCCTTTCATTTGCTACCCACCAAAACAAT
-724 TAATCTTACAAAAATATCTTTAAGACAAAAATAACGTTTGAGACACAACTATTCATAAATATTTT
      TATA-box
-654 ATAAACTGTAGATGTGACATACTTCACCTCAGCATATTGTGTGGGGCCGAAAATATATTGAAATAATTT
-584 GTTGATCAATATGCTGAGGTGGAGTATAACACATCAGCAGTTTATAAATAGTTTGTGTCTGTAGCACTA
      CAAT-box TATA-box
-514 CCCTAAGACAAAATAGTGGTAGCCTCACACGGACAAGATCTTCTCCTTTTCAAATAAATGGGACTCTT
-444 TATTTTAGGATCTAAATTTAAATGTGTTAAATATGACATCATGACGACATGAGAGGATTTATTTAAA
      与细胞分裂素响应相关
-374 TTAAATAATCATAAAATGAGGAGTCTCTATTTTGAATGGGAGAATCCTAATATGCCCCACACATG
      赤霉素响应调控元件
-304 ATTTTGGTAATTACCACCACCGTATTCCTCTGCTCTTACACGTAATAAAGTGACAAATTTTTTTGC
-234 TCTTGCAGAAATTTTTTATGTCTGAATATATATGCTTTGAAGTGTGTTATGCTGCGTGCAATAATAA
-164 TAATAAAAAATAAATATAACCAACACACATTATTTAATTTAATTTACATTTTGAATATTTATCTTTA
-94 GTTGTGAAAAATAAAAATGAGGGACCGGTTTGTTTTCTTTAGAAAAGTAGGCATATAAAATGCGC
      与盐诱导相关的调控元件 +1 TATA-box
-24 CATTTTGGGACGATGCTTCACTCAAAATTCAGCAGAACAACGTAAGGCATTGTAGAGAGAGAG
      与细胞分裂素响应相关 转录起始位点(TSS)
+47 AGAGAGAGAGAGAGTTGTTTCAGAGAGAAAACGTGAACGTCCAACCAACCATG
      翻译起始位点

```

图3 *SE*基因启动子序列

Fig.3 The promoter sequence of *SE* gene

表1 SE基因启动子所含顺式作用元件

Table 1 The *cis*-acting elements in SE gene promoter

元件名称	序列	元件功能	数量**
DRE2COREZMRAB17	ACCGAC	脱落酸响应调控元件	1
WBOXNTERF3	TGACY*	乙烯相关调控元件	1
GT1GMSCAM4	GAAAAA	与盐诱导相关的调控元件	4
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTICC	赤霉素响应元件	1
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	赤霉素响应元件	1
ARR1AT	N*GATT	与细胞分裂素响应相关	9
GATABOX	GAGA	组织特异相关元件	6
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	低温响应元件	1
-10PEHVPSBD	TATTCT	光响应元件	5
CACTFTPPCA1	YACT	叶肉特异表达相关元件	14
EBOXBNNAPA	CANNTG	储藏蛋白表达相关的顺式元件	14
DOFCOREZM	AAAG	参与茎组织特异性表达的元件	5
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	组织特异性表达元件	2
ABRELATERD1	ACGTG	启动子元件1	3
BIHD1OS	TGTCA	与抗病相关的元件	2
ACGTATERD1	ACGT	黑暗应答元件	6
INRNTPSADB	YTCANTYY	Inr元件	2

Y*: C/T; N*: A/G/C/T; **: 以上数量针对当前核苷酸序列, 不包括互补链。

现了GATABOX、CACTFTPPCA1和DOFCOREZM等器官特异性表达相关作用元件, 推断SE基因启动子在植物体内可能具有组织特异性表达。序列分析还发现位于-1 476处的互补链有一段TT-GACC序列, 与文献报道的WRKY转录因子的核心结构域的识别序列(C/T)TGAC(T/C) (即W-Box)相吻合(Ülker和Somssich 2004), 而WRKY类转录因子在植物次生代谢起重要作用(戴怡龄2008), 据此推断WRKY转录因子可能通过与SE启动子区的W-box作用元件相结合, 驱使下游SE基因表达, 进而增加三七皂苷的含量。

我们下一步准备构建SE基因启动子与葡萄糖苷酸酶基因的融合表达载体, 拟转化烟草对启动子的功能进行分析, 从而明确该启动子在三七皂苷生物合成途径中的作用。然而, 目前可应用于转基因研究的启动子数量不多, 研究者需要进一步挖掘更多新的抗逆相关的启动子和相关的顺式作用元件, 研究一些重要顺式作用元件与相关转录因子的互作是今后研究启动子的重要内容。

参考文献

戴怡龄(2008). 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的AP2类转录调控因子的克隆与功能研究[学位论文]. 上海: 复旦大学生命科学学院遗传学研究所

- 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 孙莉丽, 郭培国, 缪绅裕, 陈健辉(2009). 改进的CTAB提取植物DNA方法. 实验室研究与探索, 28 (9): 14~16
- 刘红双, 马建, 王云鹏, 马景勇(2013). 水稻PR10a基因启动子的克隆及其活性检测. 农业与技术, 33 (12): 19~21
- 吕山花, 孙宽莹, 樊颖伦(2011). 拟南芥根特异表达基因启动子在烟草中的表达. 西北植物学报, 31 (6): 1105~1109
- 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李琳, 于卓, 陈明, 李连城, 马有志(2008). 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展. 植物遗传资源学报, 9 (3): 385~391
- 石磊, 葛锋, 刘迪秋, 陈朝银(2010). 三七总皂苷生物合成与关键酶调控的研究进展. 西北植物学报, 30 (11): 2358~2364
- 谢在春, 潘秋辉, 于永春, 孙奋勇(2007). 真核蛋白编码基因核心启动子元件. 医学分子生物学杂志, 4 (2): 132~135
- 阴霞, 陈雯, 王磊, 杨若韵, 薛璟祺, 高俊平(2014). 激素和非生物胁迫对月季*RhPIPI1*启动子活性的调节作用. 园艺学报, 41 (1): 107~117
- 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 陈雪梅(2004). 植物基因启动子研究进展. 遗传学报, 31 (12): 1455~1464
- 张小辉, 祁艳霞(2008). 真核生物启动子TATA-box·GC-box和CAAT-box的分析. 安徽农业科学, 36 (4): 1380~1381, 1395
- 张微微, 李莹(2012). 三七总皂苷用于脑血管病的研究及可能机制. 中华老年心脑血管病杂志, 14 (6): 663~666
- 赵学彬, 唐桂英, 单雷(2013). 植物II型启动子功能研究的常用方法及其进展. 生命科学, 25 (6): 580~587
- Breathnach R, Chambon P (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Annu Rev Biochem, 50 (1): 349~383
- Butler JE, Kadonaga JT (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. Genes Dev, 16 (20): 2583~2592

- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res*, 27 (1): 297~300
- Joshi CP (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res*, 15 (16): 6643~6653
- Luo HM, Sun C, Sun YZ, Wu Q, Li Y, Song JY, Niu YY, Cheng XL, Xu HX, Li CY et al (2011). Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers. *BMC Genomics*, 12 (Suppl 5): S5
- Ng TB (2006). Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *J Pharm Pharmacol*, 58 (8): 1007~1019
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K (2004). Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem*, 279 (53): 55355~55361
- Niu Y, Luo H, Sun C, Yang TJ, Dong L, Huang L, Chen S (2014). Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes *FPS*, *SS*, *SE*, and *DS* in the medicinal plant *Panax notoginseng*. *Gene*, 533 (1): 295~303
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH et al (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 135 (4): 2150~2161
- Prestridge DS (1991). SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput Appl Biosci*, 7 (2): 203~206
- Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammerman AJ (2005). Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Res*, 33 (3): 1069~1076
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*, 33 (2): 259~270
- Tian J, Shen HX, Zhang J, Song TT, Yao YC (2011). Characteristics of chalcone isomerase promoter in crabapple leaves (*M. cv. 'royalty'*) and transient expression assay modified in onion epidermal cell. *Afr J Biotechnol*, 10 (50): 10232~10240
- Ülker B, Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 7 (5): 491~498