

玉米淀粉合成酶基因*GBSS*启动子的克隆与鉴定

曾礼华^{1,*}, 汪瀚宇^{2,*}, 谢程程², 曹墨菊^{2,**}

¹四川师范大学生命科学学院, 成都610101; ²四川农业大学玉米研究所, 农业部西南玉米生物学与遗传育种重点实验室, 成都611130

摘要: 以玉米自交系‘18红’的基因组DNA为模板采用PCR技术对玉米淀粉合成酶基因*GBSS* (*ZmGBSS*)的启动子进行克隆, 获得了1 884 bp的扩增片段(P_{ZmGBSS}), 应用启动子分析软件PlantCARE进行分析, 发现该片段含有多个不同的调控元件。通过半定量RT-PCR分析表明, 在授粉15 d的胚乳中*ZmGBSS*的表达量最高, 其次为胚, 在根和叶中的表达量较低。通过不同诱导培养基对胚乳进行培养, 发现脱落酸(ABA)诱导后*ZmGBSS*的表达量明显提高, 葡萄糖和赤霉素(GA)诱导后的表达量有所降低。通过构建启动子 P_{ZmGBSS} 瞬时表达载体, 并利用基因枪对不同受体进行转化分析, 结果发现胚乳中 P_{ZmGBSS} 的启动活性最高, 其次为胚, 根和叶中最弱。对转化后的胚乳进行诱导培养, 发现ABA诱导可使报告基因*LUC*的表达明显增强。以上结果表明, 启动子 P_{ZmGBSS} 为胚乳特异启动子且能够被ABA正向调控。

关键词: 玉米; *GBSS*基因; 启动子; 克隆

Clone and Identification of Granule-Bound Starch Synthase Gene Promoter in Maize

ZENG Li-Hua^{1,*}, WANG Han-Yu^{2,*}, XIE Cheng-Cheng², CAO Mo-Ju^{2,**}

¹College of Life Sciences of Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; ²Key Laboratory of Maize Biology and Genetic Breeding on Southwest, Ministry of Agriculture, Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: The genome DNA of maize inbred line ‘18 Hong’ was used as template for the promoter isolation of maize *GBSS* gene and a fragment with length of 1 844 bp was obtained. Based on the analysis with the PlantCARE software, several *cis*-regulation elements were found within the sequence of P_{ZmGBSS} . The semi-quantitative RT-PCR for *ZmGBSS* showed that 15 day endosperm after pollination with the highest expression, the embryo second, both root and leaf with relatively low expression. Detached maize 15 day endosperms after pollination were incubated in different treatments, it suggested the expression of *GBSS* gene was up-regulated significantly with abscisic acid (ABA) induction, the expression was little down-regulated with glucose and gibberellin (GA). Transcriptional analysis revealed that it is mainly expressed in endosperm and is induced by ABA. The 1 884 bp promoter region of the *GBSS* gene (P_{ZmGBSS}) was fused with the *LUC* reporter gene to get the transient expression vector. Bombardment transformations were conducted with different receptors, such as leaf, root, endosperm and embryo. Transient expression assay showed that P_{ZmGBSS} could drive the *LUC* gene and it was highly expressed in the endosperm relative to the embryo, the leaf and root with lowest expression. The activity of 1 884 bp promoter P_{ZmGBSS} was relative low compared with *ubiquitin* promoter. The P_{ZmGBSS} may be a promoter specific to endosperm. These results suggested that the *LUC* activity drove by P_{ZmGBSS} increased significantly when treated with ABA. So it was concluded that the promoter P_{ZmGBSS} is an endosperm specific promoter and can be activated by ABA induction.

Key words: maize; *GBSS* gene; promoter; clone

随着转基因技术研究的不断深入及应用范围的不断扩大, 利用转基因技术将外源基因导入植物受体以实现作物抗性的增加、品质的改良或产量的提高等育种目标, 已成为作物品种改良的重要手段。然而, 目前转基因植物中外源基因的表达量普遍较低, 严重制约着转基因技术的推广应

用。启动子作为基因表达调控重要元件, 在植物

收稿 2015-06-19 修定 2015-08-03

资助 “十二五”国家“863”项目(2011AA10A103和2012AA-101202-4)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: caomj@sicau.edu.cn; Tel: 13882439529)。

转基因表达的时、空、量三维调控系统中扮演重要的角色。对基因表达强度、基因表达的时空特异性等具有决定性的作用(路静等2004; 王颖等2003; 张春晓等2004)。组成型启动子是植物基因工程中应用最早、最为广泛的一类启动子, 尽管它能高效、非特异地启动外源基因表达, 但这种外源基因的组成型表达往往会造成资源的非必要浪费, 同时大量异源蛋白的积累也会打破植物原有的代谢平衡, 阻碍植物的正常生长。为了使外源基因在植物体内高效发挥作用, 同时又减少对植物的不利影响, 在特定组织器官或特定发育时期表达的特异性启动子的研究和应用越来越受到广泛重视(刘晓娜等2007; 马三梅和王永飞2007; 李永春等2002; 魏艳丽等2013; Hu等2011; Russell和Fromm 1997)。

种子作为粮食作物的主要贮藏器官, 含有丰富的碳水化合物, 特别是淀粉、蛋白质和脂肪, 已成为品质改良的主要目标。目前在水稻、小麦和玉米等作物已有大量的种子特异性启动子被克隆研究, 如玉米醇溶蛋白(Zein)基因、淀粉合成酶基因(*zsS3a*)、小麦谷蛋白(glutenin)基因、颗粒淀粉合成酶基因(*GBSS*)、水稻的淀粉分支酶基因(*SBE1*)、AGP小亚基基因等(李永春等2002; 魏艳丽等2013; Gu等2006; Joshi等2015; Kluth等2002; Hu等2011; Russell和Fromm 1997)。随着大量种子特异性启动子的克隆研究, 一些与种子特异性基因表达相关的调控元件被发现(Higo等1999; Wu等2000), 如GCN4基序、RY基序和脱落酸应答元件(ABRE)等。这些调控元件在不同的发育时期、不同的植物类型分别发挥着不同的调控作用, 调控元件的作用有正向、负向和多向之分, 不同调控元件之间又存在着相互作用, 调控元件还受到调节因子和外界环境的影响(Chen等2006; Ezcurra等1999; Lu等1998; Reidt等2000), 因此调控机制十分复杂。有研究表明, 玉米淀粉合成相关基因启动子*PzsS3a*和*ZmSSI*均受到ABA的诱导(Hu等2011, 2012)。水稻的 α -淀粉合成酶基因的启动子受蔗糖诱导(Lu等1998)。迄今有关玉米淀粉合成关键酶基因启动子的克隆已有报道, 但所克隆启动子的活性偏低, 种类偏少, 难以应用。目前在玉米转基因研究中所用的胚乳特异启动子多采用水稻胚乳

特异启动子如*gt1* (乔光明等2007)等。而有关玉米淀粉合成酶基因*GBSS*的启动子克隆及研究尚未见报道。

因此, 本研究拟通过PCR技术对玉米淀粉合成酶基因*GBSS*的启动子进行克隆, 利用瞬时表达、荧光测定、实时定量PCR等方法对启动子活性进行定性和定量分析, 旨在了解其表达特异性, 并根据启动子序列所含的调控元件, 对可能影响该启动子活性的调控因子进行分析, 为玉米基因工程育种中启动子选择及利用提供重要参考。

材料与方法

1 材料

玉米(*Zea mays* L.)自交系‘18红’。克隆载体为pEasy-B-Z Vector (全式金公司)。植物表达载体为35S启动子驱动的表达质粒载体pBI221。

2 方法

2.1 启动子的克隆及序列分析

采用改良的2×CTAB法提取玉米自交系‘18红’叶片的基因组DNA。基于已发表的玉米*GBSS*基因的mRNA序列(Bao等2012) (GenBank登录号HQ423252.1), 利用Primer 5软件对*ZmGBSS*起始密码子ATG上游的2 000 bp区域设计引物, 为了便于后续目的片段克隆及连接, 特在每对引物上加酶切位点, 引物序列为P_{ZmGBSS}-F: 5'-CCCAAGCTTC-CGAAATTCAATGGGCATGG-3'和P_{ZmGBSS}-R: 5'-CGCGGATCCCATGCCGATTAATCCACTGCAT-3'。以‘18红’的基因组DNA为模板, 利用梯度PCR扩增目的启动子。梯度PCR反应条件为: 94 °C预变性8 min; 94 °C变性1 min, 57~62 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min 50 s, 32个循环; 72 °C延伸5 min。采用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收目的DNA片段并进行测序分析。利用软件Plant-CARE对克隆的启动子序列进行结构预测分析。

2.2 *ZmGBSS*基因表达的组织特异性分析

以‘18红’种子萌发10 d后的根和叶, 以及‘18红’授粉15 d的胚和胚乳为材料, RNA的提取及cDNA第一链的合成分别按照天根试剂盒的操作说明进行。利用*Actin*基因对cDNA的质量进行检测。

基于玉米*GBSS*基因的mRNA序列设计半定量引物GBSSQP-F: 5'-ACAACAACCCATACTTC-3'

和*GBSSQP-R*: 5'-TAGTTGCTCTTGAGGTAG-3'。

以18S rRNA作为内参对定量模板进行均一化, 所用引物为18S-F: 5'-CTGAGAAACGGCTACCA-CA-3'和18S-R: 5'-CCCAAGGTCCAACACTAC-GAG-3'。

2.3 *ZmGBSS*表达的诱导因素分析

为了检测目的启动子是否受到其他因子的诱导影响, 将‘18红’授粉后15 d的胚乳分别在5种处理培养基上暗培养24 h, 5种培养基配方为: (1)甘露醇200 mmol·L⁻¹; (2)葡萄糖200 mmol·L⁻¹; (3)蔗糖200 mmol·L⁻¹; (4)甘露醇200 mmol·L⁻¹+ABA 50 μmol·L⁻¹; (5)甘露醇200 mmol·L⁻¹+GA₃ 1 μmol·L⁻¹; 每种处理均含CaCl₂ 20 mmol·L⁻¹、琥珀酸20 mmol·L⁻¹和氯霉素10 μmol·L⁻¹, pH 5.0。提取诱导培养后的胚乳总RNA, 反转录合成cDNA, 利用qRT-PCR检测不同诱导培养基对*ZmGBSS*表达的影响。qRT-PCR所用引物同半定量分析。

2.4 *ZmGBSS*启动子瞬时表达载体的构建

首先将扩增得到的*ZmGBSS*启动子连接到克隆载体pEasy-B-Z上, 得到重组克隆载体pEasy-B-Z-*ZmGBSS*。瞬时表达载体构建以植物表达载体pBI221-LUC作为基础载体。分别利用*Hind*III和*Bam*HI酶切植物表达载体pBI221-LUC和重组克隆载体pEasy-B-Z-*ZmGBSS*。37 °C恒温酶切2 h, 65 °C加热10 min, 使限制性内切酶失活, 于1%的琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯下将克隆载体的目的启动子以及表达载体的线性载体目的条带进行回收。将启动子*P*_{*ZmGBSS*}代替35S启动子与pBI221-LUC线性载体相连, 获得目的启动子*P*_{*ZmGBSS*}的瞬时表达载体pP_{*ZmGBSS*}-LUC。同时构建对照载体pUbi-LUC和内参载体pUbi-GUS。

2.5 基因枪转化

取‘18红’授粉15 d的果穗, 用75%酒精消毒, 再用解剖刀削去籽粒顶端部分, 剥开种皮, 用镊子挑出胚和胚乳, 分别置于高渗培养基上作为基因枪转化受体。每皿放15~20个胚乳。同样取‘18红’出苗10 d的根和叶作为受体进行转化。利用Bio-Rad公司DuPont PDS1000/He型基因枪, 以7.584 Mpa系统压力和0.095 Mpa真空度, 转化玉米受体。以组成型表达载体pUbi-GUS为内参, 与构建好的瞬时表达载体按质量比为1:4的比例混合分别转化。

2.6 瞬时表达产物的定量检测

以组成型表达载体pUbi-GUS为内参, 对转化受体检测*LUC*基因表达情况, 每个转化事件, 轰击3皿, 每皿20块, 每皿轰击3次。为了消除基因枪转化率的影响, 在微弹载体制备时加入内参质粒pUbi-GUS, 检测载体和内参质粒比为4:1, 用以平衡基因枪转化率, 同时以pUbi-GUS与pUbi-LUC质量比为1:4的比例混合液转化事件为对照。每个处理加入2 mL荧光素酶检测系统里的CCLR溶液(Cell Culture Lysis Reagent, 5×), 在-70 °C预冷的研钵中研磨成匀浆状, 加入2 mL离心管中10 000 r·min⁻¹离心5 min, 取上清。

GUS荧光值的测定: 取1.5 mL离心管加入150 μL预热的GUS反应缓冲液, 加入150 μL转化后受体提取的上清液, 混匀, 取100 μL混合液加入1 900 μL反应终止液中, 作为荧光测定时的0 h空白对照。37 °C反应2 h, 立即取出100 μL加入反应终止液中。用Fluoroskan Ascent FL荧光/化学发光微孔检测仪在355 nm的激发光、460 nm发射光下检测0和2 h的GUS的荧光值, 2 h与0 h的荧光值相减得到GUS酶荧光值。

LUC发光值的测定: 取50 μL的上清液置于96孔微孔检测板中, 加入荧光素酶检测系统中的反应液, 混匀, 立即使用Fluoroskan Ascent FL延迟12 s检测LUC发光值。用GUS值/LUC值作为表达量来评价启动子在受体中的启动活性。

实验结果

1 *ZmGBSS*基因的半定量分析

以玉米自交系‘18红’授粉15 d后胚乳、胚以及‘18红’出苗10 d后的叶片和根为材料, *GBSSQP-F*和*GBSSQP-R*为引物进行半定量PCR分析, 以18S rRNA为内参基因, 扩增结果(图1)可以看出, *ZmGBSS*基因

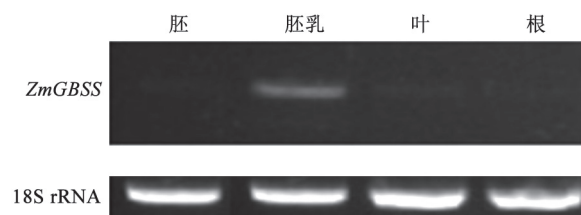


图1 *ZmGBSS*基因半定量PCR结果

Fig.1 Semi-quantitative RT-PCR analyses of *ZmGBSS* gene

在胚乳中表达量相对于在根、胚、叶中比较高,说明*ZmGBSS*可能为胚乳特异性启动子。

2 *ZmGBSS*基因启动子的克隆及序列分析

基于*ZmGBSS*基因的mRNA序列,在玉米基因组中比对得到相应的DNA序列,根据DNA序列设计引物,通过PCR扩增得到ATG起始密码子上游2 000 bp左右的序列。以玉米自交系‘18红’的叶片DNA为模板,引物为P_{ZmGBSS}-F和P_{ZmGBSS}-R,扩增结果如图2。

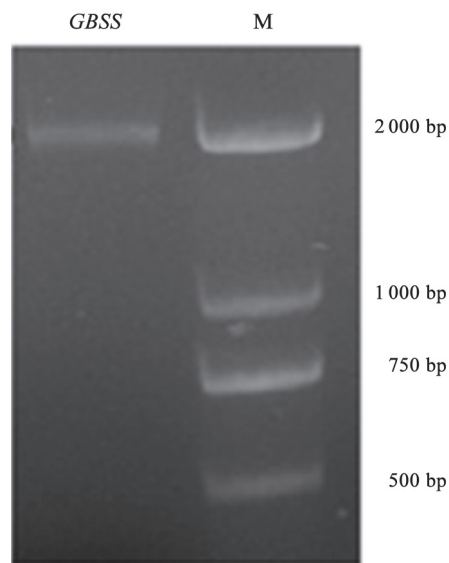


图2 *ZmGBSS*启动子序列的PCR扩增

Fig.2 The PCR amplification of *ZmGBSS* promoter sequences
M: Marker 2000.

通过回收目的片段并进行测序分析,将测序结果与NCBI上B73的基因组信息比对,其相似性

达97%。该启动子片段的大小为1 884 bp,位于-1 883~+1 bp (ATG)。利用软件PlantCARE对克隆的启动子序列进行结构预测分析,结果见表1。

由表1可以看出,启动子P_{ZmGBSS}包含有顺式作用元件Skn-1基序和GCN4基序,这两个顺式作用元件通常作为判断目的启动子是否是胚乳特异性启动子的重要标志。由表1还可以看出,启动子P_{ZmGBSS}同时含有2个ABRE顺式作用元件和2个GARE顺式作用元件,其中ABRE作用元件受ABA诱导,GARE作用元件受GA诱导。

3 启动子P_{ZmGBSS}的调控因素分析

为了检测目的启动子是否受到其他因子的诱导影响,将‘18红’授粉15 d的胚乳分别在5种不同的诱导培养基上黑暗培养24 h。将处理后的胚乳提取总RNA,反转录合成cDNA,通过qRT-PCR检测不同处理对*ZmGBSS*基因表达的影响。由玉米*ZmGBSS*基因的实时荧光定量检测结果(图3)可看出,相对于甘露醇处理,*ZmGBSS*基因受ABA诱导后表达量明显提高,提高了将近5倍。受蔗糖诱导后表达量有略微的提高。*ZmGBSS*基因的表达受葡萄糖和GA抑制。由此可见,ABA和蔗糖对玉米P_{ZmGBSS}的启动活性表现为正向调控,而葡萄糖和GA却表现为负向调控。

4 启动子P_{ZmGBSS}瞬时表达载体构建

利用HindIII和BamHI双酶切重组克隆载体pEasy-B-Z-GBSS产生1 884 bp的目的片段。将目的片段连接到已经被HindIII和BamHI双酶切的pBI221载体上,将重组质粒转化大肠杆菌,扩大培养,利用PCR检测,筛选出阳性菌株,用于制备基因枪转化载体。将构建好的表达载体送去测序,引

表1 通过PlantCARE推测*GBSS*启动子的顺式作用元件

Table 1 Putative *cis*-elements in the *GBSS* promoter sequence using PlantCARE

顺式作用元件	基序序列	位置/bp	功能	来源植物
Skn-1基序	GTCAT	-632	胚乳特异表达	水稻
GCN4基序	CAAGCCA	-562	胚乳特异表达	水稻
ABRE	TACGTG	-1 247; -97	ABA应答元件	拟南芥
ABRE	CGTACGTGCA	-577	ABA应答元件	大麦
G-box	CACGTA	-595; -389	光响应因子	金鱼草
GARE基序	AAACAGA	-1 340	GA应答元件	甘蓝
GARE基序	TCTGTTG	-1 416	GA应答元件	甘蓝
P-box	CCTTTTG	-1 718; -1 477	GA应答元件	水稻
O2-site	GATGACATGG	-1 369	玉米醇溶蛋白代谢调控	玉米
5'UTR Py富集区	TTTCTTCTCT	-48	转录增强	番茄

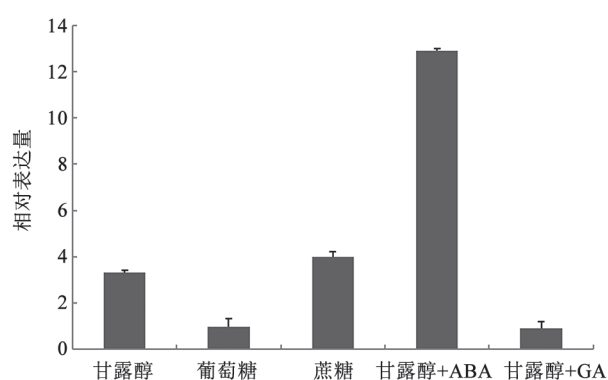


图3 不同处理下玉米胚乳中*GBSS*基因的qRT-PCR分析
Fig.3 qRT-PCR analysis of *ZmGBSS* expression in maize endosperm with different treatment

物为pBI221的通用引物。为了克服不同转化事件之间的误差,准确分析*P_{ZmGBSS}*的启动活性,本实验同时构建了组成型表达的对照载体pUbi-LUC和内参载体pUbi-GUS(图4)。内参载体主要用于与目的载体和对照载体进行共转化分析。

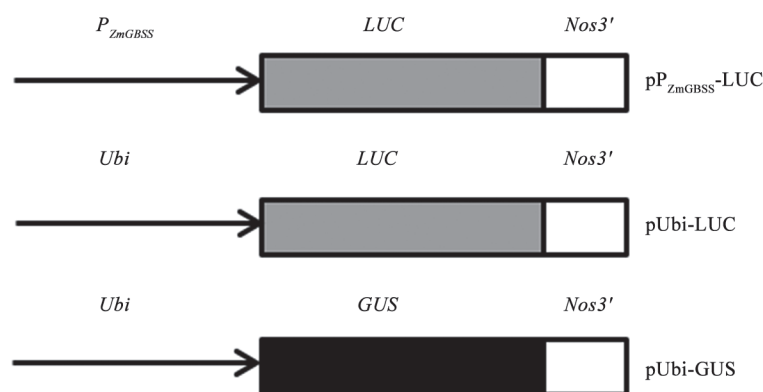


图4 瞬时表达载体的构建
Fig.4 The construction of transient expression vector

的表达相对高于根和叶。

4.3 启动子*P_{ZmGBSS}*的调控因子分析

基于前述对目的启动子序列的顺式作用元件分析,本研究将pUbi-GUS与目的启动子载体以质量比1:4的比例混合,用基因枪将混合液分别转化‘18红’授粉15 d后的胚乳。将转化后材料分别在3种不同诱导培养基中28 °C暗培养24 h,提取胚乳中的蛋白并检测荧光活性。

从测定结果(图7)可以看出,由*P_{ZmGBSS}*启动的*LUC*基因外源表达受ABA影响较大,表达效率提

4.1 目的启动子与*ubiquitin*启动子的活性比较

通过扩繁大肠杆菌得到大量的pUbi-GUS、pUbi-LUC和目的启动子载体p*P_{ZmGBSS}*-LUC。将目的启动子载体p*P_{ZmGBSS}*-LUC和pUbi-GUS以质量比4:1的比例混合,用基因枪转化方法将混合液分别转化‘18红’授粉15 d后的胚乳。转化材料在28 °C暗培养24 h后,提取胚乳蛋白并检测荧光活性。同样,将对照载体pUbi-LUC和pUbi-GUS以质量比4:1的比例混合,以同样的方式转化‘18红’授粉15 d的胚乳,每个转化重复3次,分别检测2个转化事件的荧光活性,结果(图5)表明,启动子*P_{ZmGBSS}*的活性明显低于玉米*ubiquitin*基因启动子。

4.2 启动子*P_{ZmGBSS}*的组织特异性分析

将pUbi-GUS与p*P_{ZmGBSS}*-LUC以质量比1:4的比例混合,用基因枪方法将混合液分别转化‘18红’授粉15 d后的胚乳、胚与‘18红’出苗10 d后的根、叶。转化后的材料在28 °C暗培养24 h,提取蛋白并检测荧光活性,结果(图6)表明LUC在胚乳和胚中

高了9倍左右。而在GA诱导下,表达效率提高了3倍左右。

讨 论

1 启动子表达的组织特异性

通过利用PlantCARE启动子分析软件对本研究所克隆的1 884 bp启动子*P_{ZmGBSS}*进行序列结构分析,发现该启动子含有作用元件Skn-1和GCN4基序,而这2个作用元件通常被认为是胚乳特异性启动子的典型特征。由此推断,玉米*GBSS*基因的启

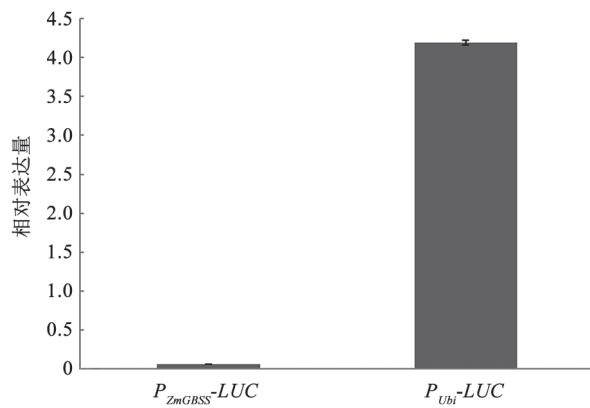


图5 目的启动子与ubiquitin启动子在授粉15 d胚乳中的表达分析

Fig.5 Expression of the target promoter and ubiquitin promoter in 15 DAP maize endosperm

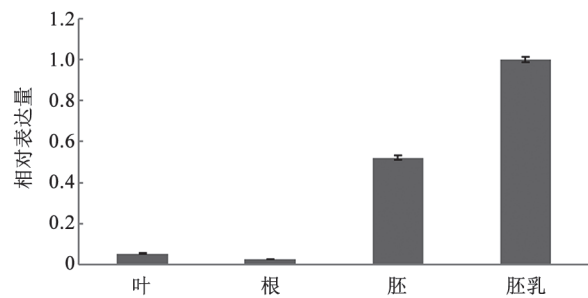


图6 pP_{ZmGBSS}-LUC在玉米不同组织中的表达分析

Fig.6 Tissue specific expression of pP_{ZmGBSS}-LUC in maize

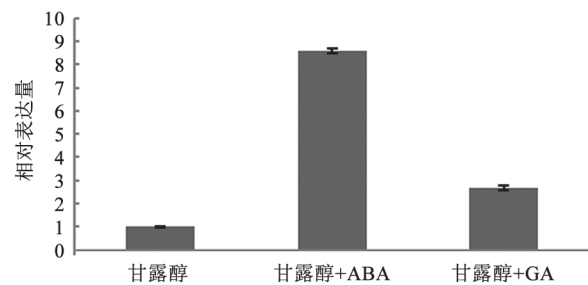


图7 启动子 P_{ZmGBSS} 在授粉15 d胚乳中的诱导表达

Fig.7 Expression of promoter P_{ZmGBSS} in transformed maize endosperm with different treatment induced

启动子具有胚乳特异性启动子的基本特征。本研究结合基因 $ZmGBSS$ 在根、叶、胚和胚乳中的表达分析,以及启动子 P_{ZmGBSS} 在根、叶、胚和胚乳中的瞬时表达分析,一致证明 $ZmGBSS$ 基因启动子为胚乳特异性启动子。

2 克隆启动子的活性检测

目前对克隆启动子的活性检测主要是采用瞬时表达的方法,该法简单快捷,周期短。由于LUC基因和GUS基因在许多物种中无本底效应,适合于外源表达活性检测,已成为最常用的报告基因。本实验将GUS基因作为转化的内参基因,目的是减少在基因枪转化过程中不同转化事件间存在的误差。以LUC基因作为目的启动子的活性检测报告基因,采用LUC荧光报告检测试剂盒测定LUC基因表达蛋白,尽可能减少实验分析中所产生的误差。本研究利用GUS和LUC双报告基因检测系统(Hu等2011),对克隆启动子 P_{ZmGBSS} 的活性进行检测,一定程度上可减少实验误差,提高检测结果的准确性。但本研究所克隆的启动子 P_{ZmGBSS} ,相对于玉米ubiquitin基因启动子具有较低的启动活性。这与Hu等(2011)对玉米胚乳特异启动子 $PzsS3a$ 的研究结果相类似。

由于瞬时表达受很多因素影响,因此利用基因瞬时表达实验对启动子活性进行研究,可能与体内启动子的真实表现存在差异。当瞬时表达结果与活体表达结果一致时,则说明测定结果比较可靠。当瞬时表达结果与活体表达结果不一致时,需采用其他方法进行进一步分析验证。

3 启动子调控元件的诱导因素分析

本研究利用PlantCARE软件对启动子 P_{ZmGBSS} 的序列结构进行分析,预测到2个ABRE顺式作用元件和2个GARE顺式作用元件,根据已有的研究报道,ABRE顺式作用元件受ABA诱导,GARE顺式作用元件受GA诱导。本研究通过对离体胚乳的活体表达和瞬时表达进行比较分析,结果发现,不论对离体胚乳的活体表达进行诱导分析,还是对离体胚乳的瞬时表达进行诱导分析,ABA均表现为对启动子 P_{ZmGBSS} 正向调控。这与来自玉米的其他种子特异性启动子研究结果相类似(Hu等2011, 2012)。而GA的分析结果却不尽一致,对离体胚乳的活体表达进行诱导分析表现为负向调控启动子的表达,但在对离体胚乳的瞬时表达进行诱导分析却表现为正向调控作用。因此关于GA的调控作用有待进一步实验的验证。对离体胚乳的活体表达分析显示蔗糖对 P_{ZmGBSS} 具有正向诱导作用,这与水稻上 α -淀粉合成酶基因启动子的研究结果相一致(Lu等1998)。

本研究通过对活体内目的基因的表达分析和对所克隆的目的启动子的瞬时表达分析, 一致证明玉米*ZmGBSS*基因启动子为胚乳特异启动子。通过对克隆启动子的序列分析, 预测到2个胚乳特异启动子顺式作用元件、2个ABA诱导作用元件和2个GA诱导作用元件。利用离体胚乳的体外诱导培养, 结合启动子的瞬时表达分析和内源目的基因的表达分析, 一致证明ABA对启动子*P_{ZmGBSS}*具有正向调控作用。这为进一步改良和利用玉米淀粉合成酶基因*GBSS*启动子提供重要参考。

参考文献

- 李永春, 张宪银, 薛庆中(2002). 蔗糖合酶基因启动子克隆及其转基因水稻植物中特异性表达. 作物学报, 28 (5): 586~590
- 刘晓娜, 付畅, 黄永芬(2007). 种子特异性启动子研究进展. 植物学通报, 24 (2): 218~225
- 路静, 赵华燕, 何奕昆, 宋艳茹(2004). 高等植物启动子及其应用研究进展. 自然科学进展, 14: 856~862
- 马三梅, 王永飞(2007). 种子特异性启动子的研究进展. 种子, 26 (1): 50~53
- 乔光明, 张明浩, 李忠诚, 陈正华(2007). 玉米颗粒结合型淀粉合成酶(*GBSS*)基因cDNA的克隆及植物表达载体的构建. 农业生物技术学报, 15 (4): 673~676
- 王颖, 麦维军, 梁承邨, 张明永(2003). 高等植物启动子的研究进展. 西北植物学报, 23 (11): 2040~2048
- 魏艳丽, 李慧伦, 李红梅, 王贻莲, 李纪顺, 杨合同(2013). 玉米醇溶蛋白*ze19*基因启动子克隆与功能分析. 玉米科学, 21 (1): 23~26
- 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
- Bao JD, Yao JQ, Zhu JQ, Hu WM, Cai DG, Li Y, Shu QY, Fan LJ (2012). Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. Mol Breed, DOI 10.1007/s11032-012-9754-3
- Chen PW, Chiang CM, Tseng TH, Yu SM (2006). Interaction between rice MYBGA and the gibberellin response element controls tissue-specific sugar sensitivity of α -amylase genes. Plant Cell, 18: 2326~2340
- Ezcurra I, Ellerstrom M, Wycliffe P, Stalberg K, Rask L (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. Plant Mol Biol, 40: 699~709
- Gu RL, Zhao L, Zhang Y, Chen XP, Bao J, Zhao JF, Wang ZY, Fu JJ, Liu TS, Wang JH, Wang GY (2006). Isolation of a maize beta-glucosidase gene promoter and characterization of its activity in transgenic tobacco. Plant Cell Rep, 25: 1157~1165
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Res, 27: 297~300
- Hu YF, Li YP, Zhang JJ, Liu HM, Chen ZY, Huang YB (2011). *Pzs-S3a*, a novel endosperm specific promoter from maize (*Zea mays* L.) induced by ABA. Biotechnol Lett, 33: 1465~1471
- Hu YF, Li YP, Zhang JJ, Liu HM, Tian ML, Huang YB (2012). Binding of ABI4 to a CACCG motif mediates the ABA-induced expression of the *ZmSSI* gene in maize (*Zea mays* L.) endosperm. J Exp Bot, 63 (16): 5979~5989
- Joshi JB, Geetha S, Singh B, Kumar KK, Kokiladevi E, Arul L, Balasubramanian P, Sudhakar D (2015). A maize α -zein promoter drives an endosperm-specific expression of transgene in rice. Physiol Mol Biol Plants, 21 (1): 35~42
- Kluth A, Sprunck S, Becher D, Lorz H, Luticke S (2002). 5' deletion of a *gbss1* promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. Plant Mol Biol, 49: 669~682
- Lu CA, Lim EK, Yu SM (1998). Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. J Biol Chem, 273: 10120~10131
- Reidt W, Wohlfarth T, Ellerström M, Czihal A, Tewes A, Ezcurra I, Rask L, Baumlein H (2000). Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. Plant J, 21: 401~408
- Russell DA, Fromm MR (1997). Tissue-specific expression in transgenic maize of four endosperm promoters from maize and rice. Transgenic Res, 6 (2): 157~168
- Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. Plant J, 23 (3): 415~421