

## ACA 基因启动子的克隆及功能初探

# Cloning of ACA Gene Promoter and Preliminary Study of its Function<sup>\*</sup>

刘召华<sup>1,2</sup>, 郭洪年<sup>1</sup>, 郑光宇<sup>2</sup>, 田颖川<sup>1\*</sup>

LIU Zhao-Hua<sup>1,2</sup>, GUO Hong-Nian<sup>1</sup>, ZHENG Guang-Yu<sup>2</sup> and TIAN Ying-Chuan<sup>1\*</sup>

1. 中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080

2. 北京师范大学, 北京 100875

1. Institution of Microbiology Chinese Academy of Sciences, National Key Laboratory of Plant Genomics, Beijing 100080, China

2. Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**摘 要** 根据已知的 ACA 基因的 5'端序列设计三个基因特异的反向引物(GSP-1, GSP-2, GSP-3)分别与 11 个简并引物(AD1-AD11)配对, 进行热不对称嵌套 PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)扩增, 获得了 ACA 基因起始密码子上游约 700bp 的片段。为检测其表达特性, 构建了该片段与 Gus 嵌合基因的表达载体 pBpAG, 在真空条件下通过农杆菌介导, 转化了植物的叶、果实、种子三种不同组织, Gus 瞬时表达染色结果显示, 该 DNA 片段具有种子特异的启动子活性。对该启动子的一些顺式元件进行了讨论。

**关键词** TAIL-PCR, ACA 启动子, GUS, 种子特异表达

**中图分类号** Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0139-05

**Abstract** Using total DNA isolated from *Amaranthus caudatus* as the template, a DNA fragment of about 700bp upstream of the coding sequence of *Amaranthus caudatus* agglutinin(ACA) gene was amplified by TAIL-PCR and cloned. To examine the regulatory function of this DNA fragment, it was inserted into a plant expression vector containing GUS gene to substitute the CaMV 35S promoter and the resulted recombinant plasmid was designated as pBpAG. The expression vector pBpAG was transferred to different tissues of plants, via *Agrobacterium*-mediated transformation in vacuum condition. Transient expression of GUS in the transformed tissues was detected by histochemical GUS staining and the results showed that the GUS activity was expressed specifically in seeds. These preliminary results indicate that this DNA fragment upstream of the ACA coding sequence could very possibly be a promoter with seed specificity. Some putative cis-elements within the promoter were discussed.

**Key words** TAIL-PCR, ACA promoter, GUS, seed-specific expression

植物种子通常贮存着大量的蛋白质, 不但是人类和动物食用植物蛋白的主要来源, 而且近年来随着分子生物学技术的发展, 它已成为植物基因工程中一个极为重要的工具, 作为生物反应器用于制药或者某些具有重要价值的工业材料

的生产。目前虽有成功报道<sup>[1]</sup>, 但是结果并不理想, 主要原因是外源基因在目标植物中的表达水平还不够高。为了使有价值的外源基因在植物种子中高效专一表达, 寻找具种子特异表达特性的启动子或者其相关调控序列具有重要意义。

Received: May 13, 2004; Accepted: June 18, 2004

This work was supported by Grant from the State "863" High-Tech Project(No. 2001AA212071).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62642577; E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

国家高技术研究与发展项目资助(No. 2001AA212071)。

已有研究表明,不同种类的植物有相似的基因调控和蛋白加工机制,通过基因工程手段转入的外源基因能在目标植物中正确表达,所产生的蛋白质亦能进行正常的修饰和转运<sup>[2-3]</sup>,因此种子贮存蛋白基因的启动子可以用来构建嵌合植物表达载体,实现异源蛋白在转基因植物中的高效表达。

尾穗苋凝集素(ACA)是一种存在于尾穗苋(*Amaranthus caudatus*)种子中的贮藏蛋白,属苋菜凝集素家族。该凝集素含有丰富的人体必需氨基酸,具有很高的营养价值<sup>[4]</sup>。虽然目前对此种蛋白在分子水平上的直接报道并不多见,但是 Rinderle 等<sup>[5]</sup>运用血清学方法分别对尾穗苋的种子、叶片、茎的蛋白提取液进行了免疫检测,结果显示只有在种子的蛋白提取液中才可以检测到该蛋白的存在,这提示 ACA 基因可能是种子特异表达的。而且其家族的另一成员,与其有高达 97.7% 同源性<sup>[6]</sup>的 *AmA1* 基因也只在种子中有表达<sup>[7]</sup>。基于以上两个结果,我们推断 ACA 基因应该是种子特异表达的,因此,分离该启动子,研究其所调控的外源基因在转基因植物中的表达特点具有重要意义。

用“TAIL-PCR”技术克隆了 ACA 基因的启动子,构建了 ACA 启动子-*GUS* 嵌合基因的植物表达载体,通过农杆菌介导真空法转化植物组织后,观察 *GUS* 基因在植物各组织中的表达情况。本文报道上述研究的初步结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,土壤农杆菌 LBA4404;质粒 pBG438, pBI121 由本实验室构建或保藏, pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司。

1.1.2 植物:尾穗苋(*Amaranthus caudatus*)由美国 IOWA 州立大学区域植物引种站馈赠,本实验室保存并繁殖;新鲜青椒(*Capsicum annuum* L.)、扁豆(*Dolichos lablab* L.)从菜市场购买;烟草无菌植株由本实验室培植。

1.1.3 酶和试剂:各种限制性内切酶购自 MBI 公司, T4 DNA 连接酶购自 Biolabs 公司, *Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.4 PCR 引物: ACA 基因 5' 端三个反向特异引物 (Gene specific primer, GSP) 即 GSP1: 5' > GTG TAG CGA GAT TTG ATG TGA AC < 3', GSP2: 5' > CGA CTT CAA ATT GAG CTA ATG GA < 3', GSP3: 5' > CAC ATA ATC ACT GGT AAT CCT GC < 3'; 11 个简并引物 (Arbitrary degenerate primer, AD) 即 AD1: 5' > NTC GA(G/C) T(A/T)T (G/C)G(A/T) GTT < 3', AD2: 5' > NGT CGA (G/C)(A/T)G ANA (A/T)GA A < 3', AD3: 5' > (A/T)GT GNA G (A/T)A NCA NAG A < 3', AD4: 5' > TG(A/T) GNA G(A/T)A NCA (G/C)AG A < 3', AD5: 5' > AG(A/T) GNA G(A/T)A NCA (A/T)AG G < 3', AD6: 5' > CA(A/T) CGI CNG AIA (G/C)GA A < 3', AD7: 5' > TC(G/C) TIC GNA CIT (A/T)GG A < 3', AD8: 5' > (G/C)TT GNT A(G/C)T NCT NTG C < 3', AD9: 5' > (A/T) CA GNT G(A/T)T NGT NCT G < 3', AD10: 5' > TCT TIC GNA CIT NGG A < 3', AD11: 5' > TTG IAG NAC IAN AGG < 3'; 根据克隆测序所获知的 ACA 启动子序列设计的引物,即 Sense: 5' > GCAAGCTT CCG ACA GGA TAT TCT AA < 3' (含 *Hind*III 位点), Antisense: 5' > TTGGATCC GTG ATC GAT GAT TGT CTA GCG C < 3' (含 *Bam*H I 位点)。以上简并引物由微生物研究所何朝族研究员惠赠,其他引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 尾穗苋 DNA 的提取:以尾穗苋顶部完全展开的叶片为材料提取植物总 DNA,具体方法参考文献[8]。

1.2.2 TAIL-PCR 扩增:参见文献[9]。取 50ng 尾穗苋总 DNA,在 20 $\mu$ L 体系中,以 GSP-1 与 11 个简并引物分别配对,进行第一次 PCR 扩增,所得产物稀释 50 倍后取 1 $\mu$ L 作模板,以 GSP-2 和相应的简并引物开始第二次 PCR 扩增;依理进行第三次 PCR。TAIL-PCR 具体程序见表 1。

表 1 克隆 ACA 基因启动子序列的 TAIL-PCR 反应参数  
Table 1 The parameters of TAIL-PCR used to amplify the promoter of ACA gene

Reaction (primers)	Program code	Number of cycle	Parameters
First reaction (GSP1/AD)	1	1	93 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C
	2	5	94 $^{\circ}$ C, 30 s; 62 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min
	3	1	94 $^{\circ}$ C, 30 s; 25 $^{\circ}$ C, 3 min; ramping to 72 $^{\circ}$ C over 3 min; then 72 $^{\circ}$ C 2.5 min
	4	15	94 $^{\circ}$ C, 30 s; 68 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 68 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min;
	5	1	94 $^{\circ}$ C, 30 s; 44 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min
2nd and 3rd reaction (GSP2/AD) and GSP3/AD	6	1	72 $^{\circ}$ C, 5 min
	7	15	94 $^{\circ}$ C, 1 min
			94 $^{\circ}$ C, 30 s; 64 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 64 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min;
			94 $^{\circ}$ C, 30 s; 46 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2.5 min
	5	1	72 $^{\circ}$ C, 5 min

1.2.3 目的片段的回收、克隆及重组子的筛选:PCR 反应完成后,用琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小和特异性,按照 Omega 公司胶回收试剂盒操作指南纯化目的片段,将回收

到的目的片段按照试剂盒提供的方法克隆到 Promega 公司的 pGEM-T Easy 载体上。大肠杆菌的转化,质粒的提取,纯化及酶切等操作参照文献[10]。目的重组子中所插入的片

段序列由上海申能博采生物工程有限公司测定。

1.2.4 ACA 基因启动子的扩增及表达载体的构建:取 50ng 尾穗苋总 DNA,在 20μL 反应体系中,以 Sense 和 Antisense 引物进行 PCR 扩增。扩增条件为:先于 94℃ 预变性 3min,然后以 94℃ 变性 1min,60℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,进行 35 个循环,最后又 72℃ 延伸 5min。将所得片段克隆到 pGEM T-Easy 中,所得重组质粒命名为 pPaca。经测序证明为 ACA 基因上游片段后,用 BamH I 和 Hind III 双酶切 pBG438<sup>[11]</sup> 和 pPaca 质粒,连接 pBG438 大片段和 pPaca 小片段,即得到含 ACA 启动子-GUS 嵌合基因的表达载体,命名为 pBpAG。

1.2.5 土壤农杆菌介导的真空转化及共培养:将未成熟青椒和扁豆种子分别从其果实中剥离出来,同时将两者的果实及无菌烟草叶片切成小块,除无菌烟草叶片外,对其他组织的灭菌要先用 70% 的乙醇洗 1~2min,然后用 10% 的次氯酸钠洗 1min,最后用无菌水洗 5 遍。将灭菌后的组织置于培养基<sup>[12]</sup> 上于 25℃,黑暗中预培养 1d。含 pBpAG 或 pBI121 质粒的农杆菌的培养及真空转化按文献[12]所提供的方法进行,稍作改动。转化完毕后,先用无菌滤纸吸去多余的菌液,后将其置于铺有无菌滤纸的 1/2MS 培养基上共培养 2d(条件同前)。

1.2.6 GUS 活性的组织化学染色:GUS 染色按照文献[13]进行。

2 结果与讨论

2.1 TAIL-PCR 扩增及目的片段的克隆

通过三次 TAIL-PCR,我们初步获得了 4 个与理论相符,即第二和第三次扩增产物之间的大小差距与 GSP-2 和 GSP-3 之间的大小差距相当的扩增产物,图 1 显示了第二次和第三次 TAIL-PCR 产物电泳检测比较结果。由于对应的简并引物相同,第二次和第三次产物在大小上的差距实际上就是 GSP-2 和 GSP-3 两引物间所隔片段的大小(约 120bp),为方便辨别,我们将每对引物的第二次和第三次扩增产物分别上样于两个相邻的点样孔中进行电泳检查。从图 1 中可以看出含 AD3、AD4 和 AD8 三个简并引物的两次 TAIL-PCR 产物在凝胶上都显示出特异的条带,且每个引物的前后两次 PCR 产物大小相差均约 100bp,与 GSP-2 和 GSP-3 在基因组 DNA 上相隔的碱基数相当;同时我们还注意到以 AD11 作为引物之一的第三次 TAIL-PCR 扩增产物中出现一 700 多 bp 的明亮条带,虽然其第二次 TAIL-PCR 的相应扩增产物在琼脂糖凝胶上显示不清晰,但是经过这样三次“半嵌套”式的 PCR,在最后产物中仍能出现这种特异的扩增条带,推测其也可能是我们所要的目的片段。将 AD4、AD8 和 AD11 参与的第三次扩增产物中的目的片段回收,并分别克隆到 pGEM-T Easy 上,经电击转化、蓝白斑筛选及酶切检测,获得了目的重组子(资料略)。

2.2 PCR 产物的序列分析

我们对三个测序结果进行了整理分析,发现此三个序列(以其相应长度为限)除少数几个碱基有差异外,其余部分序

列都是相同的,而且三个序列的 3' 端近 80 个碱基的组成与已发表的 ACA 基因的 5' 非编码区(5'UTR)<sup>[14]</sup> 一致,对比结果见图 2。这一结果说明:由 AD11 参与扩增所获得的片段确实是我们所需要的目的片段,即 ACA 基因的启动子部分。虽然三个序列之间存在个别碱基的差异,但这一般不会对启动子的活性产生明显影响。

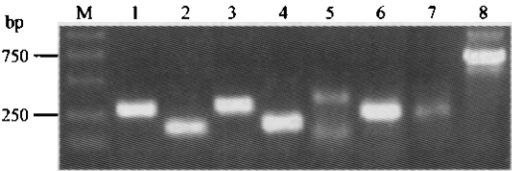


图 1 第二次和第三次 TAIL-PCR 产物电泳检测图

Fig. 1 Results of the second and the third time TAIL-PCR

M: DL2000 DNA ladder; 1~8: the second and the third time TAIL-PCR products when primer pairs AD3 + GSP2, AD3 + GSP3, AD4 + GSP2, AD4 + GSP3, AD8 + GSP2, AD8 + GSP3, AD11 + GSP2, AD11 + GSP3 were used respectively.

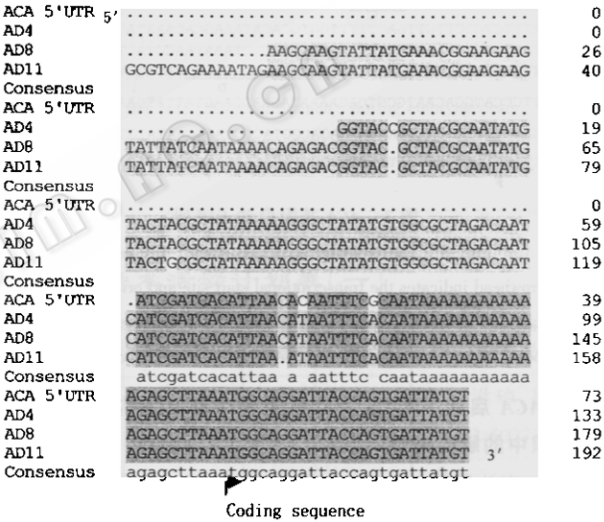


图 2 AD4、AD8、AD11 三简并引物分别参与扩增所获得的三个序列与已发表的 ACA 基因的 5' 非翻译区序列之间的比较

Fig. 2 Comparison of three sequences from TAIL-PCR using AD4, AD8 and AD11 arbitrary primers respectively with the published sequence of 5'-UTR of ACA cDNA. The right of the arrowhead is the coding sequence.

用于表达载体构建的 ACA 基因启动子片段的序列如图 3 所示(该序列已被 GenBank 所收录,登录号为 AY552752)。不难看出该段序列包含了与基因表达相关的三个重要调控元件,即:(1)富含 AT 序列。Ståhlberg 等<sup>[15]</sup> 认为,某些 AT 丰富的区段是转录因子结合的重要部位,这些区段对下游基因的高效转录和表达具有重要意义。在我们克隆的这段 634 个碱基对的序列中 AT 含量达 65% 以上。(2)TATA-box,位于 -33bp 处。(3)CAAT-box,位于 -74bp 处。另外还发现几个与种子特异表达相关的可能元件:1. B-box,该元件的序列通常较长,包括 distB 和 proxB,在种子贮藏蛋白基因启动子中极为常见,它可与其它元件相互作用,驱动强种子特异表

达<sup>[16]</sup>。其核心保守序列为 GCCAC, Shen 等<sup>[17]</sup>研究表明该核心序列一旦出现碱基突变, 就会大大降低其作为 ABREs (abscisic acid-responsive elements) 的功能; 2. RY 重复序列 (CATG-CATG/TGCATGCA), 该序列在单双子叶植物的种子特异启动子中广泛存在<sup>[18-19]</sup>, 序列较为保守。在我们所克隆到的序列中发现了两个与其类似的序列, 分别位于 -367bp 和 -423bp 处; 3. (CA)<sub>n</sub> 元件, 它通常存在于一些种子贮藏蛋白基因的调控序列中, 该元件对基因的表达有着正负双重调控作用<sup>[19]</sup>; 4. G-box (CAAGTG 或 CACGTG), 位于 -320bp 处, 该序列高度保守, 可作为 ABREs, 对基因的种子特异表达有重要调控作用<sup>[20]</sup> (各可能元件的位置见图 3)。以上分析结果表明, 我们所克隆到的启动子很可能是种子特异性启动子。

```

-634 CGACAGGATATTCTAACCATCAACAAAAGTTGATAGCACTATAGCAGAA -585
-584 GAAACCTAGCATTATATGAGTATAATTTTTTTTGAAGGAAAACCAACTG -535
-534 AGTGGTACTGATCAGCTTATTAAGTGGAGCCAGCAAGATTAAATAATA -485
-484 CAAAACAAGCAATATCTAGAAAGATGCAAAAGAGCTCGGATTAGTAATAT -435
-434 CACCATCACATAAGGCATGTAAATCAATGCTGTGTTCCCATGCGCTTA -385
-384 TGTGGTGTACAAAGGTTTGCATCCCAAGCTGCCACCTACAGATTTACAAA -335
-334 AAAAAAGCTAAATCAAGTGAAGTTAAGCAAGGGTTATCAAGTTTATCAA -285
-284 ATTTCTCCCTTGTGTGACTTTTTTGGTGACATAAAGCACAAATAGACAAAA -235
-234 TATTGGATTAAATATTTCAACAAGAACTCTAAATACCTACTAAAAAA -185
-184 TTGAACATATGAATTAACCTAATCCTGTACAAACACACTACATCTAGTCAT -135
-134 TTCCCATGGACAATGCGTCAGAAAATAGAAGCAAGTATTATGAAACGGAA -85
-84 GAAGTATTATCAATAAAACAGAGACGGTACGCTACGCAATATGTACTGCG -35
-34 CTATAAAAAGGGCTATATGTGGCGCTAGACAATCATCGATCACggatcc +9

```

AAGCTT

A B C D E F

图 3 ACA 基因启动子序列

Fig. 3 The promoter sequence of the ACA gene

The arrowhead indicates the transcriptional start site and orientation; putative regulation elements: A: RY-like elements, B: the core of the B-box, C: G-box, D: (CA)<sub>n</sub> element, E: CAAT-box, F: TATA-box.

## 2.3 ACA 启动子-GUS 嵌合基因表达载体的构建及其在植物组织中的瞬时表达

### 2.3.1 表达载体的构建:

由于在扩增 ACA 启动子时在 5' 端和 3' 端的引物上分别引入了 HindIII 和 BamHI 位点, 所以通过这两个酶即可将 ACA 启动子从 pPac 质粒上切下, 与用同样酶酶解的 pBG438<sup>[11]</sup> 连接即得到含 ACA 基因启动子 (Paca)-GUS 嵌合基因的植物表达载体 pBpAG。在 pBpAG 中, 原本在 pBG438 上的 CaMV35S 启动子被 Paca 取代, 这样 GUS 基因的表达受到的是 Paca 启动子和 NOS 转录终止序列 (NOS-T) 的调控。由于在此载体中的 GUS 基因是带有内含子的<sup>[11]</sup>, 所以其在细菌中不可能表达 GUS 蛋白, 避免了形成假阳性的可能性。pBpAG 结构如图 4 所示。

### 2.3.2 GUS 基因瞬时表达的检测:

将真空转化后暗培养 2d 的不同材料经 X-Gluc 染色后, 在显微镜下观察照相, 结果发现由 pBpAG 转化的各种材料均出现蓝斑, 而被含 pBpAG 质粒的农杆菌侵染的材料只有种子的胚 (包括辣椒种子和扁豆种子) 上可见蓝色斑块; 所有的负对照都没有蓝色斑点出现 (见图 5)。这些结果表明, ACA 基因的启动子可驱动 GUS 基因在植物的种子胚中特异表达。从蓝色深浅看, 作正对照的种子胚与试验种子胚两者颜色相差不大, 而 35S 是一个强组成型启动子, 可驱动其下游基因在植物的各种组织器官中高

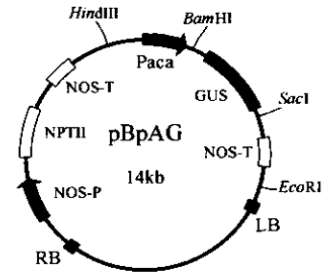


图 4 植物表达载体 pBpAG 结构图

Fig. 4 Map of the plant expression vector pBpAG

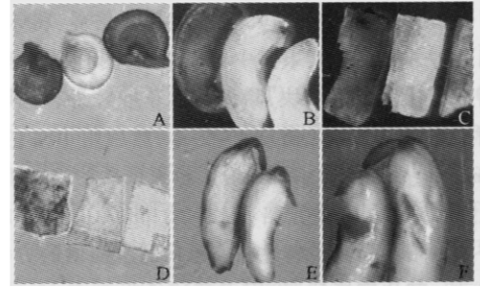


图 5 土壤农杆菌侵染的植物组织的 GUS 染色

Fig. 5 GUS staining of plant tissues infiltrated

with *A. tumefaciens*

A: seeds of *Capsicum annuum* L.; B: fruits of *Dolichos lablab* L.; C: fruits of *Capsicum annuum* L.; D: leaves of *Nicotiana glauca* cv. SR1; E, F: seeds of *Dolichos lablab* L.

The samples from left to right in A, B, C, D were: positive control; negative control; and the sample transformed with *A. tumefaciens* containing pBpAG; the samples on left and right in E were transformed with pBpAG and non-transformed respectively; the samples on left and right in F were positive control and transformed with pBpAG respectively.

水平表达, 因此推测 ACA 基因启动子可能是一个种子特异强启动子, 然而该启动子表达的确切活性和组织特异性尚需用稳定表达的转基因植物进一步证实。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Goddijn OJM, Pen J. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol*, 1995, 13: 379-387
- [2] Sun SSM, Larkins BA. Transgenic plants for improving seed storage proteins. In S-d Kung, R Wu, eds, *Transgenic Plants*. 1993, Vol 1: Engineering and Utilization. Academic Press, San Diego, pp. 339-372
- [3] Habben JE, Larkins BA. Improving protein quality in seeds. In J Kigel, G Galili, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 791-810
- [4] Vietmeyer ND. Lesser known plants of potential use in agriculture and forestry. *Science*, 1986, 232: 1379-81
- [5] Rinderle SJ, Goldstein IJ, Remsen EE. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*, 1990, 29(46): 10555-10561
- [6] Transue TR, Smith AK, Mo H et al. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat Struct Biol*, 1997, 4: 779-783

- [7] Raina A, Datta A. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, **89**: 11774 - 11778
- [8] Paterson AH, Brubaker CL, Wendel JF. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, **11**: 122 - 127
- [9] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from Pl and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1994, **22**: 674 - 681
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [11] Qin HM, Guo HN, Jia YT *et al*. Effect of UTRs from TMV-RNA on the expression of foreign gene in transgenic plants. *Chin Sci Bulletin*, 2000, **45**(18): 1681 - 1685
- [12] Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M *et al*. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 1997, **122**: 101 - 108
- [13] Jefferson RA. Assaying Chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, **5**: 387 - 405
- [14] Guo HN, Jia YT, Zhou YG *et al*. Effects of transgenic tobacco plants expressing ACA Gene from *Amaranthus caudatus* on the population development of *Myzus persicae*. *Acta Botanica Sinica*, 2004, **46**(9): 1100 - 1105
- [15] Stålberg K, Ellerström 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. *Plant*, 1996, **199**: 515 - 519
- [16] Ezcurra I, Ellerström M, Wycliffe P *et al*. 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*, 1999, **40**: 699 - 709
- [17] Shen Q, Ho THD. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA responsive complexes each containing a G-box and anovel cis-acting element. *Plant Cell*, 1995, **7**: 295 - 307
- [18] Ellerström M, Stålberg K, Ezcurra I *et al*. Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm specific transcription. *Plant Mol Biol*, 1996, **32**: 1019 - 1027
- [19] Kao CY, Cocciolone SM, Vasil IK *et al*. Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1171 - 1179
- [20] Chandrasekharan MB, Bishop KJ, Hall TC. Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J*, 2003, **33**(5): 853 - 866