

小麦 *Glu-D3* 和 *Glu-B3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物设计与 PCR 扩增

赵惠贤¹ 郭蔼光¹ 胡胜武² 范三红¹ 张大鹏¹ 任思霖¹ 王瑞娟^{1*}

(¹ 西北农林科技大学生命科学院, 农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100; ² 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 用 CTAB 法提取小麦基因组 DNA, 根据 GenBank 中公布的已知 *LMW-GS* 基因序列, 设计并合成染色体位点特异 PCR 引物 1~7; 利用特殊小麦材料——六倍体普通小麦阿勃二体、1A、1B 和 1D 缺体, 四倍体小麦及二倍体的一粒小麦和节节麦的基因组 DNA 为模板, 在优化的 PCR 体系下进行特异性扩增和引物验证。结果表明: 引物 3 和引物 4 为小麦谷蛋白 *Glu-D3* 位点 *LMW-GS* 基因特异 PCR 引物, 用其进行扩增时, 循环反应条件为: 94 变性 1 min, 62 退火 1 min, 72 延伸 2 min。扩增产物大小约 1.60 kb, 包括了启动子和完整编码区。引物 5 和 7 为小麦谷蛋白 *Glu-B3* 位点 *LMW-GS* 基因特异 PCR 引物, 用其进行扩增时, 循环条件为: 94 变性 1 min, 64 退火 1 min, 72 延伸 2 min。扩增产物大小约 1.45 kb 左右, 包括了启动子和完整编码区。此外, 用引物 3 和 4 通过 PCR 技术克隆到小偃 6 号小麦 *Glu-D3* 位点 *LMW-GS* 基因 (登录号为 AY263369); 该基因编码的 *LMW-GS* 含 9 个 Cys 残基。这是首次发现含 9 个 Cys 残基的 *LMW-GS* 基因。它可能是小偃 6 号加工品质优良的主要原因之一。

关键词 普通小麦; 特异染色体位点; 低分子量麦谷蛋白基因; PCR
中图分类号: S512

Development of Primers Specific for *LMW-GS* Genes at *Glu-D3* and *Glu-B3* Loci and PCR Amplification

ZHAO Hui-Xian¹, GUO Ai-Guang¹, HU Sheng-Wu², FAN San-Hong¹, ZHANG Da-Peng¹, REN Si-Lin¹, WANG Rui-Juan¹

(¹ Key Lab of Agricultural Molecule Biology, College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech, University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi; ² College of Agronomy, Northwest Sci-Tech, University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract The genomic DNA was extracted from wheat cultivars using CTAB method. Based on the known *LMW-GS* gene sequences reported in GenBank, the primer 1 - 7 for specific chromosome locus *LMW-GS* genes were designed and synthesized. Using of the genomic DNA from special wheat germplasm, including hexaploid wheat Abbozanida disome, 1A, 1B and 1D nullisomes of Abbozanida, diploid and tetraploid wheat as template, amplified specific locus *LMW-GS* genes under the optimal reaction system to test these primers. The results showed that, Primer 3 and 4 were the specific for *LMW-GS* genes at *Glu-D3* locus in wheat, its cycling reaction profile was: 1 min at 94, 1 min at 62, 2 min at 72. The size of the PCR product was about 1.60 kb, including promoter and the whole CDS. While primer 5 and 7 were the specific for the *LMW-GS* genes at *Glu-B3* locus in wheat, its cycling reaction profile was: 1 min at 94, 1 min at 64, 2 min at 72. The size of the PCR product was about 1.45 kb, including promoter and the whole CDS. Moreover, *LMW-GS* codon by cloned gene at *Glu-D3* locus of Xiaoyan No. 6 contained 9 Cys residues. It was the first time to find a gene of *LMW-GS* with 9 Cys residues. This may be one of the major reasons that Xiaoyan No. 6 has good processing quality.

Key words *Triticum aestivum* L.; Specific chromosome locus; *LMW-GS* gene; PCR

小麦种子麦谷蛋白是由高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS)组成。它们分别由第一同源群染色体长臂上 *Glu-1*

位点(即 *GluA1*、*GluB1*、*GluD1* 位点)和短臂上 *Glu-3* 位点(即 *GluA3*、*GluB3*、*GluD3* 位点)基因编码,二者对小麦加工品质均有重要影响。有关小麦

*基金项目: 杨凌农业生物技术育种中心项目(1994-14)和国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-A-11-01)资助。

作者简介: 赵惠贤(1965-), 女, 陕西临潼人, 副教授, 博士, 主要从事生化与分子生物学教学和研究。Tel: 029-7082662. E-mail: Hui-xianzhao212@hotmail.com

Received(收稿日期): 2002-12-31, Accepted(接受日期): 2003-06-26.

HMW-GS 结构及其编码基因的研究较为深入,已从小麦中克隆出多个优质 HMW-GS 基因^[1,2],并开始将这些优质基因用于改良小麦品质的研究^[3,4]。近年来关于小麦 LMW-GS 结构及其与加工品质关系的研究取得了一定进展^[5,6],但是关于普通小麦特定染色体位点 LMW-GS 基因的研究国内外报道很少。

本研究根据 GenBank、EMBL 等库中公布的已知 LMW-GS 基因序列,设计合成了小麦谷蛋白 *GluB3* 位点和 *GluD3* 位点特异 LMW-GS 基因的 PCR 引物,用六倍体、四倍体和二倍体小麦的基因组 DNA 为模板,在优化的 PCR 体系下进行特异性扩增,以验证和筛选所设计的染色体位点特异的 LMW-GS 基因的 PCR 引物。旨在为小麦优质 LMW-GS 基因及其启动子的克隆奠定基础,为利用基因工程进行小麦品质改良提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 供试材料及来源

供试材料有六倍体小麦(染色体组为 AABBDD)阿勃二体(Abb)、阿勃 1A 缺体(1AN)、1B 缺体(1BN)和 1D 缺体(1DN),四倍体小麦墨西哥黑卡(染色体组为 AABB)及二倍体的一粒小麦(染色体组为 AA)和节节麦(染色体组为 DD)。这些材料分别由西北农林科技大学农学院薛秀庄研究员和中国农业科学院品种资源研究所张学勇研究员提供。此外,供试材料还有我国优异小麦品种小偃 6 号。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[7]。

1.2.2 染色体位点特异的 LMW-GS 基因 PCR 引物的设计 根据 EMBL, GenBank 等库中公布的已知 LMW-GS 基因序列,设计了小麦谷蛋白 *GluB3* 位点和 *GluD3* 位点特异的 LMW-GS 基因 PCR 引物共 7 个(表 1),由上海 Sangon 公司合成。

表 1 设计合成的引物及其碱基序列

Table 1 Primers synthesized and their sequences

| 引物 Primer | 碱基序列 Base Sequences(5'—3') |
|--------------|-------------------------------|
| 1 | CACCAATCCACCATGAAGAC |
| 2 | TATCAGTAGCCACCAACTCC |
| 3 | TTGTA GAAACTGCCATCCTT |
| 4 | GTCACCCCTGCATCGACATA |
| 5 | TCCTGAGAAATGCATGACATG |
| 6 | CCAATCCACCATGAAGACCTTC |
| 7 | GTAGCCACCAACTCCGGTCC |

其中,引物 1~4 为 *GluD3* 位点 LMW-GS 基因设计。引物 1 位于基因上游 - 12~8 bp 处,引物 2 位于编码区末端;引物 3 大致位于基因上游 - 600 bp 处;引物 4 大致位于终止密码子下游 73 bp 处。引物 5~7 为 *GluB3* 位点 LMW-GS 基因设计。引物 5 位于基因上游 - 400~-380 bp 处,引物 6 位于 - 10~8 bp 处,引物 7 位于编码区末端。

1.2.3 目的基因扩增的 PCR 条件 参考 D'ovidio 等^[8]的方法,并对其 PCR 体系进行了优化。各引物对 PCR 扩增反应条件如下(引物 1 和 2,3 和 4 用反应条件 1;引物 5 和 7,6 和 7 用反应条件 2)。

反应条件 1: 95 预变性 1 min;循环反应条件为 94 1 min,62 1 min,72 2 min,反应 30 循环后,再 72 延伸 7 min。

反应条件 2: 95 预变性 1 min;循环反应条件为 94 1 min,64 1 min,72 2 min,反应 30 循环反应后,再 72 延伸 7 min。

1.2.4 PCR 产物的回收 PCR 反应完成后,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小和特异性。用北京鼎国公司的 DNA 回收试剂盒按操作指南纯化目的片段。

1.2.5 目的片段的克隆及重组子的筛选 将回收的目的片段克隆到 Promega 公司的 pGEM-T easy 载体上。按照试剂盒说明书操作。用 - 互补法初步筛选重组子;质粒 DNA 的提取纯化用北京鼎国公司试剂盒。质粒酶切反应参照限制性内切酶 *EcoR* 试剂盒说明书及基因工程实验指导(郭蔼光等编写的学生实验指导手册)。

1.2.6 PCR 产物的测序 由上海 Sangon 公司完成。

1.2.7 DNA 及氨基酸序列分析 DNA 及推测出的氨基酸序列的同源性分析用 NCBI 网上的 Blast 和 DNA man 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 LMW-GS 基因 PCR 优化体系的建立

为利用设计的引物(表 1)对小麦基因组 DNA 进行稳定的 PCR 扩增,对 LMW-GS 基因的 PCR 反应条件进行了优化。确定出本实验条件下小麦 LMW-GS 基因稳定的 PCR 反应体系为:20 μL 反应体积中, Mg²⁺ 浓度 2.5 mmol/L, dNTP 浓度 200 μmol/L, 模板 DNA 量 30~60 ng, 各引物量均 50 ng, *Taq* 酶 0.5 U。

2.2 引物的 PCR 验证和筛选

根据所设计引物 1~7 的位置可预测出,用引物

1和2扩增出的产物将是1D染色体短臂 *Glur-D3* 位点上 *LMW-GS* 基因编码区,用引物3和4扩增出的产物应包括启动子和完整编码区;用引物5和7扩增的产物为1B染色体短臂 *Glur-B3* 位点上 *LMW-GS* 基因,应包括启动子和完整编码区,用引物6和7扩增将得到的产物只包含完整的编码区^[6,8,9]。

利用六倍体小麦特殊遗传材料(阿勃二体 Abb、1AN、1BN 和 1DN)、四倍体小麦和二倍体一粒小麦和节节麦的基因组 DNA 为模板,用不同的引物对在上述优化的 PCR 体系下进行扩增,以验证我们设计的 *LMW-GS* 基因的 PCR 引物是否为染色体位点特异的。

实验结果表明,引物1和2、引物6和7扩增产物特异性不强,有2~3条非特异性扩增条带出现(未附图)。其原因可能有二:一是PCR反应条件不合适,有待进一步研究;二是这2对引物设计不合理,它们是在 *LMW-GS* 基因的保守区内,并不是结合在特定位点 *LMW-GS* 基因上,无法扩增出特异产物。

引物3和4、引物5和7的PCR扩增产物电泳结果分别如图1和2所示。

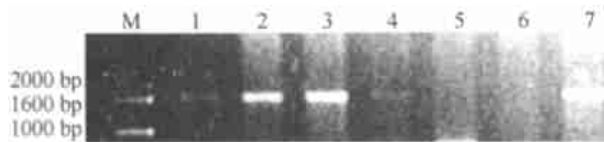


图1 用引物3和4扩增时产物的琼脂糖凝胶

Fig. 1 Agarose gel of amplification products obtained with primer 3 and 4

泳道1~7分别为 Abb、1AN、1BN、1DN、一粒小麦、墨西黑卡和节节麦

Lane 1~7 indicating Abbozanida disome, 1A nullisome, 1B nullisome, 1D nullisome, *T. urartu*, *Mxiheika* and *Ae. squarrosa*, respectively

由图1可以看出,用引物3和4进行PCR扩增时,含1D基因组的Abb、1AN、1BN和节节麦均扩增出一条带,该产物约为1600bp,而不含1D染色体组的1DN、墨西黑卡和一粒小麦都未扩增出条带,从而证明了引物3和4的确为 *Glur-D3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物。

由图2可以看出,用引物5和7进行PCR扩增时,含1B基因组的阿勃二体、1AN、1DN和墨西黑卡均扩增出一条带,约为1450bp;而不含1B染色体组的1BN和一粒小麦均未扩增出条带,从而证明了引物5和7的确为 *Glur-B3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物。

这些实验结果与我们预测的结果相吻合。这充

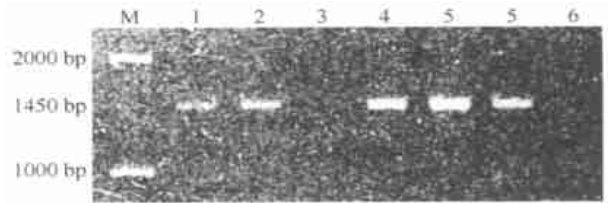


图2 用引物5和7扩增时产物的琼脂糖凝胶

Fig. 2 Agarose gel of amplification products obtained with primer 5 and 7

泳道1~6分别为 Abb、1AN、1BN、1DN、墨西黑卡和一粒小麦

Lane 1~6 indicating Abbozanida disome, 1A nullisome, 1B nullisome, 1D nullisome, *Mxiheika* and *T. urartu*

分证明了引物3和4是小麦谷蛋白 *Glur-D3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物;引物5和7为小麦谷蛋白 *Glur-B3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物。该结果可以被用于小麦优质低分子量麦谷蛋白基因及其启动子克隆的研究。

2.3 PCR扩增产物的克隆

以我国优异小麦种质小偃6号基因组DNA为模板,用筛选出的 *Glur-D3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物3和4进行PCR扩增。经1.5%琼脂糖凝胶电泳及DNA marker标准分子量分析,表明为一条约1600bp的扩增单带(图3)。将扩增片段回收纯化后,插入pGEM-Teasy载体上,得到重组质粒,并用EcoR酶切验证,获得插入片段大小正确的阳性克隆,将其中一个重组质粒命名为pGEM-XYGuD3-LMWGS1。

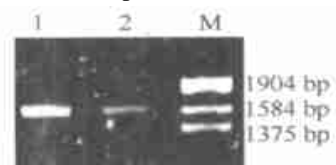


图3 纯化的PCR产物电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of purified PCR products

1, 纯化的PCR产物; 2, PCR产物; M, DNA标准分子量

Lane 1, Purified PCR products; Lane 2, PCR products; M, DNA marker

2.4 克隆DNA片段的序列分析

对pGEM-XYGuD3-LMWGS1中的插入片段XYGuD3-LMWGS1进行测序,结果表明该片段长度为1594bp,与GenBank中Colot等报道的小麦 *Glur-D3* 位点 *LMW glutenin-1D1* 基因序列(登录号为X13306)比较同源性为98%;与Ikeda等^[10,11]报道的小麦 *LMW-GS* 基因(group 10)序列(登录号为AB062876)比较同源性为99%。可以肯定克隆到的序列就是 *Glur-D3* 位点 *LMW-GS* 基因。

用DNA man软件对测定序列进行翻译,结果表

明其读码框为 606..1520 bp; *XYGlurD3-LMWGS1* 核苷酸序列及推测的编码氨基酸序列见图 4。该片段包括了完整的编码区及其上游 605 bp 序列。据报道单子叶植物谷类种子醇溶谷蛋白基因上游约 300 bp 序列即包括了胚乳特异性表达所必需的顺式元

件^[9,12]。因此 pGEM-XYGlurD3-LMWGS 中克隆的 DNA 片段包括了 *LMW-GS* 基因完整编码区及其胚乳特异性表达启动子。已将其在 GenBank 登录(登录号 AY263369)。

The sequence of cloned *XY-GlurD3LMWGS* DNA fragment and its deduced amino acids

```

1      TTGTAGAAACTGCCATCCTTTACATGTAAAGCGGATTGGATGAGTCATGTCATGCTCTAT
61     AGACGTCAGTTTATCTTATCATCTTACAGGAAAAGTACAAAAGTTAGTTTTCTGAAAAGCAA
121    CCGAATATAGAAGAACTCCACACTCAAGGCTTTACTAATCGAGCATATCCTAACAGCC
181    CACACATGATTGCAAACTTAGTCATACACAAGTTTTGCCTTTCTTGTTTACGGCTGACAG
241    CCTATACAAGGTTCCAAACTCGGTTGTAAGTGTACTATCTTGATAAGTGTGTGACAT
301    GTAAAGTTAATAAGGTGAGTCATATATAGCAAATATCGGGCTTTCTGTACTTTGTGTGTG
361    ATCGTATGCACAACATAAAATCAACTTTGATGATCAATATATCCAAAAGTACGCTTGTAG
421    CTAGTGCAAACTAACACAATGTAACAAAATAATTCATTTTCAGATGGACCCAAACAGAAT
481    TATTAAGCTGATGCAAGAAGGAAAAGAGGTGCTTCTGGGCTACTATAAATAGGCATG
541    AAGTATAAAGATCATCACAAAGCACAAGCATCAGAACCAAGCAACACTAGTTAACACCAAT
601    CCACCATGAAGACCTTCTCGTCTTTGCCCTCCTCGCCGTTGCGGCGACAAGTCAATTGC
1      M K T F L V F A L L A V A A T S A I A
663    CCAGATGGAGACTAGATGCATCCCTGGTTTTGGAGAGACCATGGCAGCAGCAACCATTACC
20     Q M E T R C I P G L E R P W Q Q Q P L P
723    ACCACAACAGACATTTCCACAACAACCACTATTTTCACAACAACAACAACATTTCTCTCA
40     P Q Q T F P Q Q P L F S Q Q Q Q L F P Q
783    ACAACCATCATTTTCCGAGCAACAACCACCATTTTGGCAGCAACAACCACCATTTTCTCA
60     Q P S F S Q Q Q P P F W Q Q Q P P F S Q
843    GCAACAACCAATTCTACCACAGCAACCACCATTTTCCGAGCAACAACAACACTAGTTCTACC
80     Q Q P I L P Q Q P P F S Q Q Q Q L V L P
903    GCAACAACCAACATTTTCACAGCAACAACAACCAGTTTTACCTCCACAACAATCACCTTT
100    Q Q P P F S Q Q Q Q P V L P P Q Q S P F
963    TCCACAACAACAACAACAACAACAGCTGGTGCACAACAATCCCTGTTGTTACGCCATC
120    P Q Q Q Q H Q Q L V Q Q Q I P V V Q P S
1023   CATTTTGCAGCAGCTAAACCCATGCAAGCTATTCCCTCCAGCAGCAGTGCAGCCCTGTGGC
140    I L Q Q L N P C K L F L Q Q Q C S P V A
1083   AATGCCACAACGTTGCTAGGTCGCAAAATGTTGCAGCAGAGCTGTTGCCATGTGATGCA
160    M P Q R L A R S Q M L Q Q S C C H V M Q
1143   ACAACAATGTTGCCAGCAGTTGCCGCAAAATCCCCCAACAATCCCGCTATGAGGCAATCCG
180    Q Q C C Q Q L P Q I P Q Q S R Y E A I R
1203   TGCTATCATCTACTCCATCATCTTCCAAAGAACAAACAACAGGTTTCAGGGTTCCATCCAATC
200    A I I Y S I I L Q E Q Q Q V Q G S I Q S
1263   TCAGCAGCAGCAACCCCAACAGTTGGGCCAATGTGTTTCCCAACCCCAACAACAGTCGCA
220    Q Q Q Q P Q Q L G Q C V S Q P Q Q Q S Q
1323   GCAGCAACTCGGGCAACAACCTCAACAACAACAATGGCACAGGGTACCTTTTTCAGCC
240    Q Q L G Q Q P Q Q Q Q L A Q C T F L Q P
1383   ACACCAGATAGCTCAGCTTGAGGTCATGACTTCCATTGCGCTCCGTATCCTGCCAACCGAT
260    H Q I A Q L E V M T S I A L R I L P T M
1443   GTGCAGTGTAAATGTGCCGTTGTACAGAACCACCACTAGTGTGCCATTGACGTTGCCAC
280    C S V N V P L Y R T T T S V P F D V G T
1503   CGGAGTTGGTGCCTACTGATAAGGAAAGATCTCTAGTAATATATAATTGGGTCACCGTTG
300    C V G A Y * *
1563   TTTAGTCGATGGATATGTCGATGCAGCGGTGAC

```

图 4 克隆的小偃 6 号 *XYGlurD3-LMWGS1* 基因及推测蛋白的序列

Fig. 4 The sequence of nucleotide and deduced amino acids of cloned *XYGlurD3-LMWGS1*

同样,认为用引物 5 和 7 扩增的产物为 *Glu-B3* 位点上包括启动子和完整编码区的 *LMW-GS* 基因。

此外,很值得一提的是,迄今 GenBank 中报道的所有已知 *LMW-GS* 都只含有 8 个保守的 Cys 残基^[10];而本研究克隆的我国优异种质小偃 6 号 *Glu-D3* 位点 *LMW-GS* 基因编码的 *LMW-GS* 含有 9 个 Cys 残基,即除了 8 个保守的 Cys 残基外,还多一个 Cys 残基(见图 3 画线处)(这不是 PCR 扩增时碱基错配所致,因为扩增时用了高保真酶 pfu);这就增加了小偃 6 号种子中该 *LMW-GS* 形成分子间二硫键的机会(即能形成更大分子谷蛋白聚合体)。这可能是小偃 6 号加工品质优良的主要原因之一。

3 结论

通过上述试验可得出如下结论:

(1) 引物 3 和 4 为小麦谷蛋白 *Glu-D3* 位点 *LMW-GS* 基因特异引物。用其进行 PCR 扩增时,反应条件为:95 预变性 1 min;循环反应条件为 94 1 min,62 1 min,72 2 min,反应 30 循环后,再 72 延伸 7 min。其扩增产物包括了启动子和完整编码区。

(2) 引物 5 和 7 为小麦谷蛋白 *Glu-B3* 位点 *LMW-GS* 基因特异 PCR 引物。用其进行 PCR 扩增时,循环反应条件为:95 预变性 1 min;循环反应条件为 94 1 min,64 1 min,72 2 min,反应 30 循环反应后,再 72 延伸 7 min。其扩增产物包括了启动子和完整编码区。

(3) 通过 PCR 技术克隆到的小偃 6 号 *Glu-D3* 位点 *LMW-GS* 基因(登录号 AY263369)所编码的 *LMW-GS* 含有 9 个 Cys 残基,这是首次发现。这可能是该品种加工品质优良的主要原因之一。

References

- [1] Anderson O D, Greene F C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet*, 1989, **77**:689—700
- [2] Bustos A De, Rubio P, Jouve N. Molecular characterization of the inactive allele of the gene *GluA1* and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenin of wheat. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**:1085—1094
- [3] Barro F, Rooke L, Bekes F. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(12):1295—1299
- [4] Alvarez ML, Guelman S, Halford N G, Lustig S, Reggiardo M I, Ryabushkina N, Schewry P, Stein J, Vallejos R H. Silencing of HMW glutenin in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**:319—327
- [5] Nieto-taladriz M T, Ruiz M. Variation and classification of B low molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**:1155—1160
- [6] D'ovidio R, Marchitelli C. Sequence similarity between allelic *Glu-B3* genes related to quality properties of durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**:455—461
- [7] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**:4321—4325
- [8] D'ovidio R, Simeone M, Masci S, Porceddu E. Molecular characterization of a *LMW-GS* gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**:1119—1126
- [9] Wang X-L(王新力), Suo G-Y(索桂英), Peng X-X(彭学贤). The combination control of plant gene transcription. *Advance of Bio Engineering* (生物工程进展), 2001, **21**(2):40—45
- [10] Ikeda T M, Naganamine T, Fukuoka H, Yano H. Identification of new low molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**:680—687
- [11] Ciaffi M, Lee Y K. The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats. The genes from D-denome species. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**:135—148
- [12] Zhou X-J(周先锦), Fan Y-L(范云六). Tissue-specific expression and regulation of rice seed storage protein gene prolamin 4a. *Scientica Sinica* (Series B) (中国科学 B 辑), 1992, **11**:1176—1181