

甜菜树贝壳杉烯合酶基因的克隆与原核表达

刘洪伟¹, 王 帅¹, 王 强², 王 伟³, 杨艳芳¹, 刘锡葵^{*4}, 邱德有¹

(1. 林木遗传育种国家重点实验室 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 四川农业大学 农学院, 成都 611130; 3. 中国医学科学院/中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 4. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 本文作者研究了赤霉素合成途径中的关键酶—贝壳杉烯合酶, 对其功能的研究可以为以后优化品种提供基因层面的基础。首先通过 RACE-PCR 技术, 从甜菜树叶片中克隆得到贝壳杉烯合酶基因 (*Ent-kaurene synthase gene, YIKS*) 的全长 cDNA, 共 2 512 bp (GenBank 登录号为 KP872698), 其 ORF 长度为 2 232 bp, 共编码 743 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量大小为 84 987, 蛋白质等电点为 5.264, 表明该蛋白质呈酸性。将该基因构建到表达载体 pET32a 中, 得到重组质粒 pET-32a-YIKS。通过将 pGG/An2、pIRS 和重组质粒 pET-32a-YIKS 3 个质粒共转入菌株 BL21(DE3) 中, 得到重组菌株, 并进行发酵。通过 SDS-PAGE 分析发现, 重组蛋白成功得到了表达。最后通过对发酵产物进行萃取, 并使用 GC-MS 进行检测, 确定了该基因所编码的酶确实是贝壳杉烯合酶。

关键词: 甜菜树; 贝壳杉烯合酶; 原核表达; 气质联用

中图分类号: Q 943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)05—0479—07

Cloning and Expression of the *Ent*-Kaurene Synthase Gene from *Yunnanopilia longistaminata* (W.Z.Li, C.Y.Wu et D.Z.Li) (Opiliaceae)

LIU Hongwei¹, WANG Shuai¹, WANG Qiang², WANG Wei³,
YANG Yanfang¹, LIU Xikui^{*4}, QIU Deyou¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 4. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: *Yunnanopilia longistaminata* is a wild woody vegetable in China, and its tender stems and leaves are edible. So far, studies of *Y. longistaminata* have mostly been focused on tissue culture,

收稿日期: 2015-05-06

基金项目: 中国林业科学研究院林业研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(RIF2014-01); 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAFYBB2012042)。

作者简介: 刘洪伟(1987—), 男, 山东莒县人, 农学博士, 助理研究员, 主要从事紫杉醇相关分子生物学方向的研究。

E-mail: lhwei1987@126.com

* 通信作者: 刘锡葵(1967—), 男, 湖南湘潭人, 副研究员, 主要从事野生食用蔬菜和药用植物资源化学与持续利用方面的研究。

E-mail: liuxikui@mail.kib.ac.cn

引用本文: 刘洪伟, 王帅, 王强, 等. 甜菜树贝壳杉烯合酶基因的克隆与原核表达[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(05): 479-485.

physiology and biochemistry, while less concentrated on the gene level. Gibberellin (GA) can enhance vegetative growth, such as the bolting, and the growth of stems and leaves. Using molecular biology methods, we studied the *ent*-kaurene synthase, a key enzyme in the synthesis pathway of gibberellins. *Ent*-kaurene synthase gene (*YIKS*) was cloned from the leaf of *Y. longistaminata* through RACE-PCR. The full gene length was 2 512 bp (GenBank accession number KP872698). Results showed that the ORF length of *YIKS* was 2 232 bp and the molecular weight of its encoded protein (YIKS) was 84 987. The theoretical isoelectric point of YIKS was 5.264, which suggested that YIKS protein was acidic. The gene was cloned into the vector pET32a to get the plasmid pET-32a-YIKS. Plasmids pIRS, pGG/An2 and pET-32a-YIKS were co-transformed into BL21 (DE3) strain to obtain a new recombinant strain, and then the recombinant strain was used for fermentation. The SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein was expressed successfully. Finally, we used n-hexane to extract the fermentation products and the GC-MS analysis confirmed that the gene in this study was *Ent*-kaurene synthase encoding gene.

Keyword: *Yunnanopilia longistaminata*, *ent*-kaurene synthase, prokaryotic expression, GC-MS

甜菜树 (*Yunnanopilia longistaminata* (W.Z.Li) C.Y.Wu et D.Z.Li (Opiliaceae)) 是我国特有的野生食用木本蔬菜植物^[1-2], 为山柚子科甜菜树属的乔木植物, 主要分布在我国云南红河流域海拔在 900~1 500 m 的亚热带森林中^[3]。作为一种有待开发的野生食用植物资源, 吴志霜等^[4]对它的营养成分进行了报道, 发现其氨基酸和维生素 C 等营养物质的含量都比其他植物丰富。柳建军等对它的脂溶性化学成分进行了分析^[5], 分离得到了 10 个化合物, 并发现甜菜树提取物具有一定抗氧化活性^[6]。刘锡葵等从甜菜树中分离鉴定出两种紫杉烷类物质^[3], 可能成为一种新的紫杉烷类物质的来源植物, 并证明其主要甜味功能因子成分为艾杜醇 (iditol)^[7]。

作为以嫩茎叶为食用部位的甜菜树, 研究其营养生长的基因调控能够为良株筛选提供基因层面上基础及参考。许多研究指出, 赤霉素能促进芹菜、苜蓿、茼蒿、莴菜、白菜、菠菜等多种植物茎叶的生长和产量的增加^[8]。在植物赤霉素的合成途径中, 首先由古巴焦磷酸合酶 (Copalyl pyrophosphate synthase, CPS) 催化 GGPP 形成中间产物内根-古巴焦磷酸 (*Ent*-copalyl diphosphate, CDP), CDP 再由内根-贝壳杉烯合酶 (*Ent*-kaurene synthase, KS) 催化合成内根-贝壳杉烯 (*Ent*-kaurene), 所以 KS 是赤霉素合成途径中的第 2 个关键酶^[9]。在水稻中内根-贝壳杉烯合酶 OsKS1 催化赤霉素生物合成的第二步反应, 且其只在水稻叶片和茎中表达, 而萌发中的

种子和根中不表达, 说明 OsKS1 仅与水稻地上部分生长发育相关, 不参与种子的萌发和根的生长^[10]。但到目前为止, 编码 KS 的基因在多种植物中都被相继克隆得到^[11], 但在甜菜树上尚未见报道。

本研究中利用 RACE-PCR 技术首次从甜菜树中克隆得到了 KS 基因的 cDNA 全长, 并将其构建到原核表达载体 pET32a 中得到重组质粒, 并和质粒 pGG/An2 (含有一个玉米的 *ent*-CPS 基因 *An2*^[12])、pIRS^[13] 共转到表达菌株 BL21 (DE3) 进行发酵, 通过 GC-MS 对发酵产物进行了研究, 现将有关方法和结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

长蕊甜菜树幼苗由中科院昆明植物研究所刘锡葵副研究员实验室培育, 在温室种植 20 d 到生长状态良好, 取幼嫩叶片 1 g, 迅速用液氮冷冻, 存于 -80 °C 备用。细菌蛋白质提取试剂盒、克隆载体 pUC-19、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3): 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 表达载体 pET32a 由中国医学科学院药物研究所王伟副研究员提供。质粒 pGG/An2、pIRS 及 pET-28-OsKS (含有一个水稻的 KS 基因 *OsKS1*^[14]) 由四川农业大学的王强教授构建。

1.2 甜菜树叶片 RNA 的提取

使用北京天恩泽基因科技有限公司的柱式植物 RNAout2.0 试剂盒, 按照其说明书步骤提取冻存

的甜菜树叶总 RNA,并在样品上柱后纯化之前,加 TAKARA 公司的 DNase I 进行处理,去除 DNA。cDNA 的合成使用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit,按照说明书的步骤合成 5' 和 3' RACE Ready cDNA。

1.3 基因 RACE、全长克隆与序列分析

通过分析本课题组的甜菜树转录组数据(尚未发表),得到 KS 基因的片段,并设计 RACE-PCR 引物 YLKS5-1:CCAGATAATCCAGACAGTTAGCGTTT;YLKS3-1:ATGGGCAAAGAATGGCGTGTT。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,65 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。

然后通过 RACE-PCR 扩增得到甜菜树 KS 基因的两端序列,利用 MegAlign 拼接出全长,并命名该基因为 *YloKS*。设计 ORF 扩增引物 YLKS1:ATGTTTAAAGCAGATGAGCTCTCCGTT;YLKS2:TTAATTTTGCAGCAAATTTTGCAGAT。使用 KAPA 公司的 HIFI 热启动高保真酶进行扩增,PCR 条件如下:95 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 20 s,62 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,共 32 个循环;72 °C 延伸 10 min。将 PCR 得到的片段进行胶回收,然后连接到 pUC-19 克隆载体上送到中美泰和公司进行测序验证。

1.4 表达引物的设计和载体构建

使用软件 Primer 5 分析克隆到的 KS 基因序列的以及原核表达载体 pET32a 的酶切位点,分别选用 *Bam*H I 和 *Not* I 两个酶切位点(下划线处标出),并设计引物,上游引物为 YLKS-PET-1-1:CGGGATCCATGTTTAAAGCAGATGAGCTCTCCGTT,下游引物为 YLKS-PET-2-1:TTGCGGCCGCTTAATTTTGCAGCAAATTTTGCAGAT。以含有 *YIKS* 的 pUC-19 质粒为模板,使用 KAPA 公司的 HIFI 热启动高保真酶进行 PCR 扩增,PCR 条件如下:95 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 20 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,共 3 个循环;98 °C 变性 20 s,62 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,共 28 个循环;72 °C 延伸 10 min。

将得到的 PCR 产物使用 Axygen 公司的 PCR 产物回收试剂盒进行回收,和表达载体分别使用 *Kpn* I 和 *Not* I(NEB 公司)进行双酶切。酶切 2 h 后再次进行纯化,并用的 T4 DNA 连接酶(NEB 公司)16 °C 连接 6 h。转化大肠杆菌 DH5 α ,倒置 37 °C 过夜培养,菌落 PCR 筛选阳性菌株。将阳性菌株送北

京中美泰和公司测序验证。

1.5 重组蛋白的原核表达

将 3 种质粒 pGG/An2、pISR 和重组质粒 pET-32a-YIKS(或 pET-32a 或 pET-32a-OsKS)共转化到大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,涂到含有氯霉素(Chlor, 34 μ g/mL)、壮观霉素(Spec, 50 μ g/mL)和氨苄霉素(Amp, 50 μ g/mL)的平板上,37 °C 倒置培养过夜。以 pGG/An2、pISR 和空载体 pET-32a(+)3 个质粒共转入菌株 BL21(DE3)中,得到的菌株作为阴性对照;以 pGG/An2、pISR 和 pET-28-OsKS 3 个质粒共转入菌株 BL21(DE3)中,得到的菌株作为阳性对照;以 pGG/An2、pISR 和重组质粒 pET-32a-YIKS 3 个质粒共转入菌株 BL21(DE3)中,得到的菌株进行实验。挑取 5 个单克隆到 2 mL 含有 3 种抗生素的液体 LB 培养基中,活化 12 h。

取 600 μ L 活化的菌液加入到装有 60 mL TB 培养基的玻璃三角瓶中,37 °C 培养 2.5 h。然后,加入 660 μ L 50% 的无菌甘油和 6 mL 的 10 $\times$ 磷酸缓冲液。在 18 °C 预培养 1 h 后,取出三角瓶,加入 100 μ L 5 mg/mL 的 IPTG,在 18 °C 下表达 72 h。

取出 10 mL 表达得到的菌液,8 000 r/min 离心 8 min,去上清液。加入 2 mL 细菌蛋白质溶解液,充分混匀后 37 °C 孵育 3 h,离心取上清液,得到总蛋白质并进行 SDS-PAGE 电泳,检测 *YIKS* 基因的重组蛋白是否表达。

1.6 发酵产物的萃取及 GC-MS 分析

在 50 mL 发酵菌液中加入 50 mL 的正己烷萃取 8 h,每隔 2 h 左右摇晃一下。然后,500 W 超声 5 min,使萃取更充分。4 °C 过夜。取 35 mL 正己烷吹,最后定容到 1 mL,待 GC-MS 检测。

样品的 GC-MS 分析采用 Agilent 7890A/5975C 完成,所用的柱子为 HP-5MS(30 m $\times$ 250 μ m ID $\times$ 0.25 μ m)。采取不分流方式进样,每次进样 1 μ L。分离程序为:80 °C,2 min;10 °C/min 的速度升温到 210 °C;以 3 °C/min 的速度升温至 240 °C;240 °C 保持 3 min。进样口温度为 250 °C,质谱四级杆检测器温度为 150 °C。质谱条件为仪器默认条件。

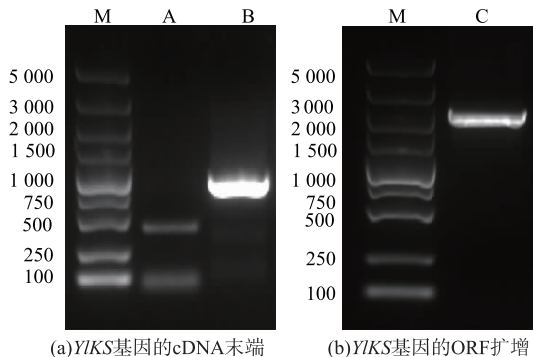
2 结果与分析

2.1 *YIKS* 基因的克隆和序列分析

以甜菜树叶片的 RNA 通过反转录得到的 cDNA 为模板,利用 3' 和 5' RACE 扩增得到 406

bp 3' RACE-PCR 产物和 860 bp 5' RACE-PCR 产物(见图 1(a))。拼接得到 *YIKS* 的 cDNA 全长序列为 2 512 bp, GenBank 登录号为 KP872698。利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现, 该 cDNA 全长包含有一个 ORF 长度为 2 232 bp。以 5' RACE-PCR 模板为模板, 利用 ORF 扩增引物进行扩增, 得到长度为 2 232 bp 和预测相同大小的片段(见图 1(c)), 且序列完全和拼接的 ORF 一致。

对 *YIKS* 的 ORF 序列进行分析发现其编码 743 个氨基酸, 使用 DNASTAR 中的 EditSeq 预测得出其编码的蛋白质相对分子质量约为 84 987, 蛋白质等电点为 5.264, 表明该蛋白质呈酸性。



M: DL5000 Marker; A: 3' RACE-PCR 产物; B: 5' RACE-PCR 产物; C: ORF PCR 产物

图 1 *YIKS* 基因的 cDNA 末端及 ORF 扩增

Fig. 1 Cloning of the cDNA ends and ORF of *YIKS*

2.2 表达载体 pET-32a-*YIKS* 的构建及原核表达

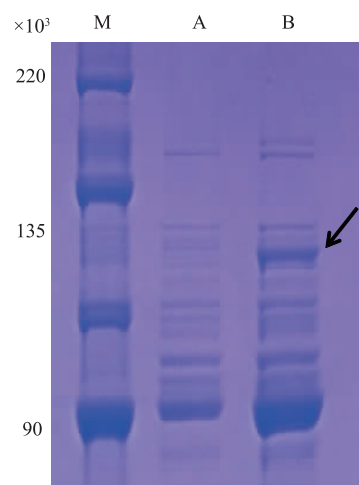
将转化 pET-32a-*YIKS* 表达载体的菌株进行 PCR 鉴定, 鉴定结果为阳性。比对测序结果表明, *YIKS* 基因片段已成功连接到表达载体中。

以转入 pET-32a 载体的菌株作为对照, 来分析 pET-32a-*YIKS* 载体中 *YIKS* 基因的表达情况。两种

重组菌株表达后收集菌体并裂解, 上清液进行 SDS-PAGE 电泳验证, 结果发现表达的重组蛋白约在 103 000 位置(见图 2), 与预测的融合蛋白一致。

2.3 产物 GC-MS 分析

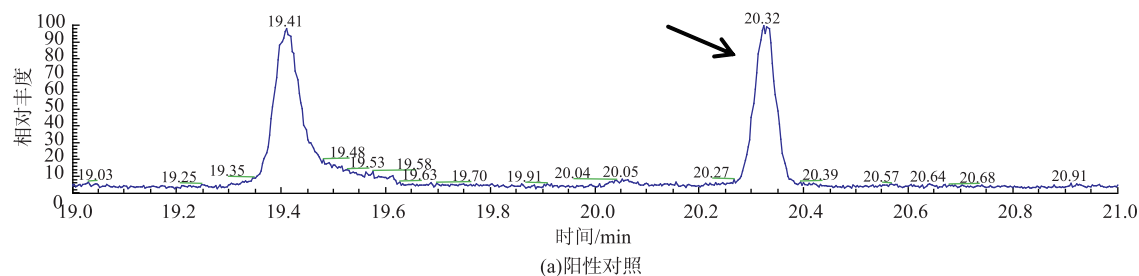
将对照和样品发酵得到的菌液用正己烷抽提, 将抽提溶剂氮吹, 定容至 1 mL, 用 GC-MS 进行检测。结果显示: 阳性对照中贝壳杉烯在 GC 中保留时间(RT)为 20.32 min(图 3(a)), 样品在 20.31 min 处也存在特征峰(图 3(b)), 而转入空载质粒的阴性对照则在此时间没有相应的特征峰(图 3(c))。图 4(a)显示为水稻的贝壳杉烯合酶产物的 GC-MS 图谱, 图 4(b)显示为甜菜树的贝壳杉烯合酶产物的 GC-MS 图谱, 两者质谱图基本一致。通过色谱的保留时间和质谱数据可以判断, 本实验中得到的基因确实为贝壳杉烯合酶基因。



M: 蛋白相对分子质量标准; A: pET32a 重组菌蛋白质; B: pET-32a-*YIKS* 重组菌蛋白质

图 2 *YIKS* 重组蛋白 PAGE 电泳

Fig. 2 PAGE analysis of the *YIKS* recombinant protein



(a) 阳性对照

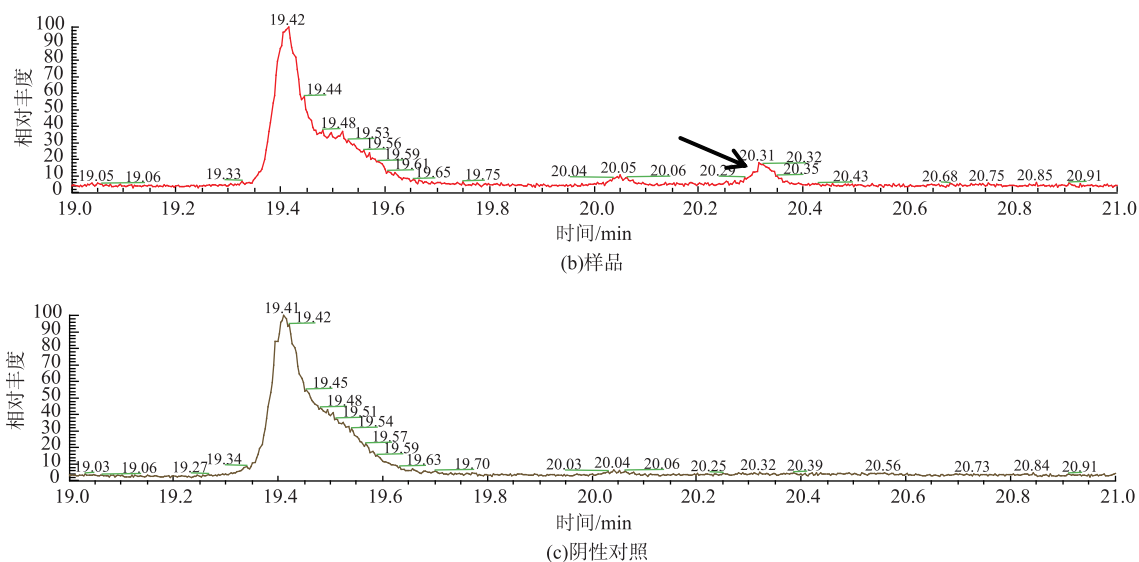


图3 大肠杆菌中发酵产物的GC结果分析

Fig. 3 GC analysis of the fermentation product in *E. coli*

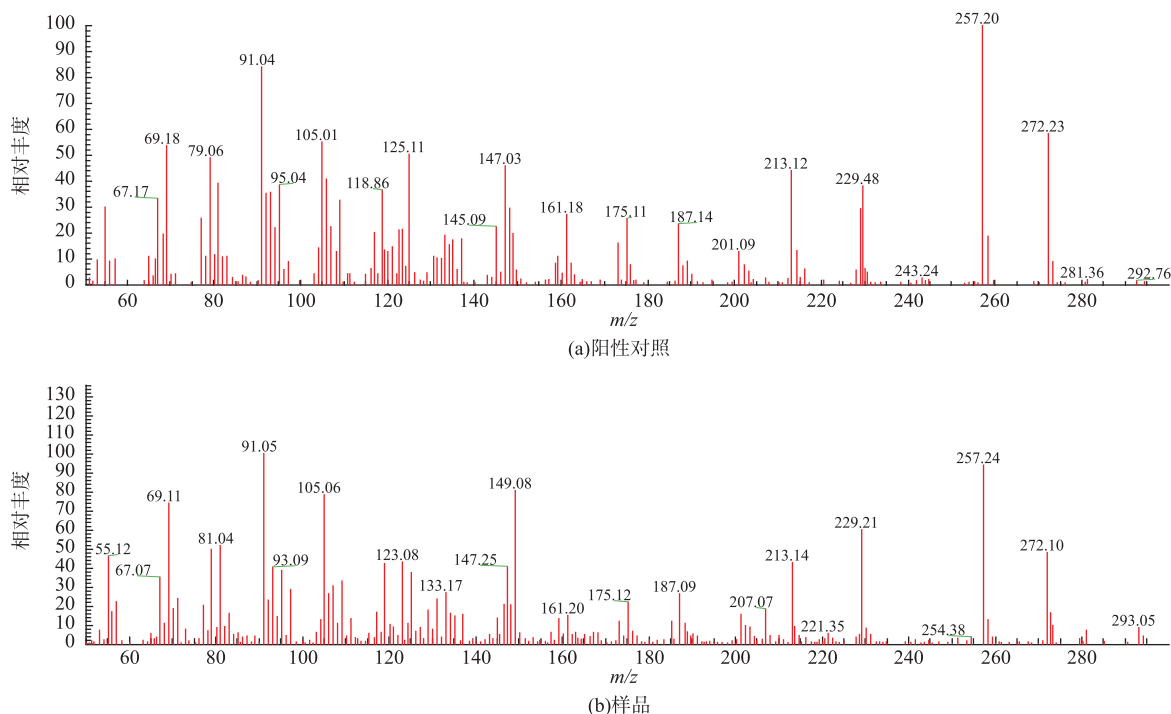


图4 发酵产物贝壳杉烯的GC-MS结果分析

Fig. 4 GC-MS analysis of the fermentation product *ent*-kaurene

3 结语

甜菜树在我国云南地区,作为一种甜味野生蔬菜,深受当地民众的喜爱,近年发现其具有紫杉烷类化合物^[6],使人关注它的萜类化合物代谢途径。我们从代谢的角度入手,研究了此植物赤霉素合成途

径中的关键酶——贝壳杉烯合酶。本文中借助大肠杆菌系统进行反应,在大肠杆菌中,虽然有甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(The methyl erythritol phosphate, MEP)途径,但是异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(Dimethylallyl diphosphate, DMPP)的合成很少, Cyr

等^[13]将 MEP 途径中的两个限速酶基因脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶基因 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatesynthase gene, *DXS*) 和脱氧木酮糖磷酸还原异构酶基因 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductase gene, *DXR*), 以及异戊烯基焦磷酸异构酶基因 (Isopentenyl diphosphate isomerase gene, *IDI*) 基因剪切信号肽后, 重组到 pCDFDuet 载体中, 得到的 pIRS 重组质粒转入大肠杆菌能够增加 IPP 和 DMPP 的产量, 同时将 *GGPPS* 基因和 *CPS* 基因重组到 pACYCDuet 质粒中得到 pGG/An2 重组质粒, 可以用来在大肠杆菌中合成 GGPP。本文中将 pGG/An2、pIRS 和重组质粒 pET-32a-YIKS 3 个质粒共转入菌株 BL21(DE3) 中, 得到重组菌株, 进行发酵, 通过对发酵产物进行萃取, 应用 GC-MS 进行检测, 确定了 *YIKS* 基因表达的酶具有贝壳杉烯合酶的功能。通常情况下, 需要对二萜合酶功能验证时, 需要先将蛋白质进行表达并得到可溶性的蛋白质, 再在体外反应体系中加入底物 GGPP 进行测试, 本文中

使用合成生物学技术, 使大肠杆菌能够合成底物 GGPP, 这种验证二萜合酶的方法更省时省力, 方便经济, 在二萜合酶的研究中具有很大的优势。

赤霉素能促进蔬菜的细胞分裂、细胞伸长、叶片扩大和茎伸长生长, 促进侧枝生长、抽苔等^[15]。甜菜树的食用部位是嫩茎叶, 所以研究赤霉素对甜菜树茎叶的生长是非常重要的。作为赤霉素合成途径中的关键酶之一的 KS 在苹果^[11]、梨^[16]中都有研究。在水稻中, 如果 KS 基因缺失突变体表现为严重矮化、不能开花^[10], 这种现象可以用在对矮化苗的选育中, 尤其在矮化的果树砧木研究中有突出作用^[11, 16]。目前, 编码 KS 的基因在其他多种植物上相继得到克隆^[17-20], 我们首次报道从甜菜树中克隆得到 KS 基因, 并通过原核表达验证其功能。甜菜树作为中国云南红河流域的一种野生食用木本蔬菜植物, 深受当地居民的喜爱, 现在也逐渐开始了人工种植, 但价格依然昂贵, 对该基因的研究可以为以后对甜菜树不同株高的选育提供一定基础。

参考文献:

- [1] LI Wenzheng. A new species of *Melientha* (A new recorded genus of opiliaceae from china) [J]. **Acta Botanica Yunnanica**, 1989, 11(4): 407-408. (in Chinese)
- [2] WU Zhengyi, LI Dezhu. *Yunnanopilia*-a primitive new genus of opiloaceae from yunnan plateau, China and its biogeographic significance [J]. **Acta Botanica Yunnanica**, 2000, 22(3): 248-250. (in Chinese)
- [3] LIU X K, LIU J J. New source for L-Iditol and taxanes [J/OL]. Nature Precedings, 2008[2017-04-22]. <http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.1502.1>.
- [4] WU Zhishuang, WANG Yuehua. Analysis of nutritional components in tender leaves and stems of wild plant *Yunnanopilia-longistaminea* [J]. **Journal of Plant Resources and Environment**, 2005, 14(1): 60-61. (in Chinese)
- [5] LIU Jianjun, LIU Xikui. Chemical constituents from *Yunnanopilia longistaminea* [J]. **Natural Product Research and Development**, 2008, 20(suppl): 8-10, 13. (in Chinese)
- [6] LIU Jianjun, XU Lisong, LIU Xikui. Antioxidant activity of wild edible vegetable *Yunnanopilia longistaminata* [J]. **Food Science**, 2008, 29(8): 125-127. (in Chinese)
- [7] LIU Xikui, XIAO Jianqing. Isolation and identification of a sweet function factor from the endemic wild vegetable of *Yunnanopilia longistaminata* [J]. **Food Science and Technology**, 2009, 34(5): 207-209. (in Chinese)
- [8] LIU Zhenqi. Preliminary studies of gibberellin physiological function [J]. **Plant Physiology Communications**, 1965, 5: 29-31. (in Chinese)
- [9] SAKAMOTO T, MIURA K, ITOH H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice [J]. **Plant Physiology**, 2004, 134(4): 1642-1653.
- [10] MARGIS P M, ZHOU X R, ZHU Q H, et al. Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway [J]. **Plant Cell Reports**, 2005, 23(12): 819-833.
- [11] DENG Xiaoyun, DAI Hongyi, LIANG Meixia. Cloning and expression analysis of *ent*-kaurene synthase gene *MdKS* in apple (*Malus domestica* Borkh) [J]. **Acta Agriculture Boreali-Sinica**, 2013, 28(2): 46-51. (in Chinese)
- [12] HARRIS L J, SAPARNO A, JOHNSTON A, et al. The maize *An2* gene is induced by Fusarium attack and encodes an ent-copalyl diphosphate synthase [J]. **Plant Molecular Biology**, 2005, 59(6): 881-894.

- [13] CYR A, WILDERMAN P R, DETEMAN M, et al. A modular approach for facile biosynthesis of labdane-related diterpenes[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2007, 129(21): 6684-6685.
- [14] XU M, WILDERMAN P R, MORRONE D, et al. Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family[J]. **Phytochemistry**, 2007, 68(3): 312-326.
- [15] YE Zixin. The application of gibberellic acid in vegetable production [J]. **Agriculture and Technology**, 1997, 33(6): 486-487. (in Chinese)
- [16] CHENG Feifei, OU Chunqing, JIANG Shuling, et al. Cloning and expression analysis of *ent*-kaurene synthase gene in pear[J]. **Journal of Shenyang Agricultural University**, 2011(6): 677-682. (in Chinese)
- [17] YAMAGUCHI S, SAITO T, ABE H, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) [J]. **The Plant Journal**, 1996, 10(2): 203-213.
- [18] YAMAGUCHI S, SUN T, KAWAIDE H, et al. The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis[J]. **Plant Physiology**, 1998, 116(4): 1271-1278.
- [19] RICHMAN A S, GIJZEN M, STARRATT A N, et al. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*; recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway[J]. **The Plant Journal**, 1999, 19(4): 411-421.
- [20] SAWADA Y, KATSUMATA T, KITAMURA J, et al. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness [J]. **Journal of Experimental Botany**, 2008, 59(12): 3383-3393.

会 议 消 息

会议名称(中文): 2017 年全国生物技术大会

所属学科: 生物技术与生物工程

开始日期: 2017-09-23

结束日期: 2017-09-25

所在城市: 湖北省 宜昌市

具体地点: 宜昌市馨岛国际酒店

主办单位: 中国生物工程学会

协办单位: 三峡大学 湖北省生物工程学会

承办单位: 安琪酵母股份有限公司

摘要截稿日期: 2017-07-15

全文截稿日期: 2017-07-15

联系人: 蒋玉清

联系电话: 010-64807678

E-MAIL: xh@im.ac.cn

会议网站: <http://www.biotechchina.org/Notice/show/id/201>

会议背景介绍: 由中国生物工程学会主办, 安琪酵母股份有限公司承办的“中国生物工程学会第 11 届学术年会暨 2017 年全国生物技术大会”, 定于 2017 年 9 月在湖北省宜昌市举行。大会安排特邀报告及多个专题会场, 设有成果及产品展示平台, 诚挚地邀请国内外生命科学研究与生物技术应用领域的专业人员到会交流。

征文范围: 生物技术及相关领域科学研究、生物技术与生物产业发展战略与对策、行业分析。

论文要求: 研究论文要求报道较为完整和全面的原创性研究工作; 综述性文章要求结合自己的研究工作, 分析和评述本领域相关的现状和发展、国内外最新的研究进展和动态、科技成果转化应用等方面内容, 要有独立见解和指导性意见; 未在公开出版物或全国性学术会议上发表过。