

RNAi 靶向沉默 *opaque2* 基因对高粱醇溶蛋白含量的影响

蔡欣月¹, 李志江², 牛江帅¹, 包丹¹, 苏晨¹, 孙艺墨¹, 戴凌燕^{*1}

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学 食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为研究 *opaque2* 基因沉默对高粱醇溶蛋白含量的影响, 采用 RNAi 技术构建 *opaque2* 基因抑制表达载体, 利用农杆菌介导转化高粱幼胚, 测定转基因植株籽粒中醇溶蛋白含量, SDS-PAGE 电泳检测醇溶蛋白带型, 并使用透射电镜观察胚乳细胞中蛋白质体变化。结果表明, 与野生型相比, 5 株转基因植株中 4 株籽粒的醇溶蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$); 野生型和各转基因植株的醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳带型相同; 野生型胚乳细胞中淀粉粒排列紧密, 部分大淀粉粒融合成大块状, 蛋白质体数量较多且有一些体积较大; 而转基因植株淀粉粒排列疏松, 细胞中存在多处孔隙, 蛋白质体数量较少, 体积较小。*opaque2* 基因沉默引起胚乳细胞蛋白质体数量变少, 体积变小, 进而影响胚乳细胞内部结构和籽粒醇溶蛋白含量。

关键词: 高粱; RNAi; *opaque2* 基因; 醇溶蛋白; 含量

中图分类号: Q 789 文章编号: 1673-1689(2019)10-0072-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.011

Effects of RNAi Targeting *Opaque2* Gene Expression on the Kafirin Content in Sorghum

CAI Xinyue¹, LI Zhijiang², NIU Jiangshuai¹, BAO Dan¹, SU Chen¹, SUN Yimo¹, DAI Lingyan^{*1}

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to explore the effect of silencing *opaque2* gene on the kafirin content in sorghum, the suppressed expression vector of *opaque2* gene is constructed by RNAi technology, and then transformed to young embryos by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. The kafirin content in these transgenic seeds is determined and identified by SDS-PAGE, and also the changes of protein bodies in these endosperm cells are observed by transmission electron microscope. The results show that the kafirin content of four fifths of transgenic plants is significantly lower than that of the wild type ($P < 0.05$). Those of the protein bands between the wild type and all transgenic plants are similar. The starch granules in the endosperm cells of the wild type arranged

收稿日期: 2017-02-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000700; 2018YFD1000702); 国家级大学生创新创业项目(201610223005); 黑龙江省自然科学基金基金项目(C2016046); 国家自然科学基金项目(31101194)。

* 通信作者: 戴凌燕(1977—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事作物品质改良方面的研究。E-mail: dailingyan770416@126.com

引用本文: 蔡欣月, 李志江, 牛江帅, 等. RNAi 靶向沉默 *opaque2* 基因对高粱醇溶蛋白含量的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 72-78.

closely and most of them are fused into large blocks, and large numbers of protein bodies are indicated with large volumes. While the starch granules in the transgenic plants arrayed loosely and indicated many gaps in the endosperm cells, and while those numbers and volumes of the protein bodies are less and smaller than the wild type, respectively. In conclusion, *opaque2* gene silencing induced changes in number and volume of protein bodies in endosperm cells, which additionally affects the internal structure of endosperm cells and the kafirin content in sorghum.

Keywords: sorghum, RNA interference, *opaque2*, kafirin, content

高粱(*Sorghum bicolor*(L.) Moench)是世界主要粮食作物之一,也可作为动物饲料,在世界发达及发展中国家种植面积较大,广泛分布在亚、非和美洲等热带干旱、半干旱地区。在中国,高粱年均种植面积约为 722 400 hm²,产量可达 2 865 000 万 t,为世界第四大高粱主产国^[1]。高粱可在干旱边际土地上种植,不与玉米、小麦和水稻争夺农业用地。因此,随着世界总人口不断增加,极端气候频繁出现,可利用水资源日渐减少,土地盐渍化逐年加剧,高粱作为抗旱耐逆的经济作物,必将在农牧业生产中占有重要战略地位。

高粱籽粒包含淀粉、蛋白质、脂肪、纤维素和少量的灰分及蜡质。蛋白质约含 6.8%~19.6%,是高粱中除淀粉以外含量最多的成分^[2]。但是,高粱蛋白富含半胱氨酸,缺乏人体必需的赖氨酸和色氨酸,在禾谷类作物中消化率最低,约为 30%~80%^[3],且会导致以高粱为主要蛋白食物的人严重营养不良^[4]。高粱的主要贮藏蛋白为醇溶蛋白,约占高粱总蛋白的 77%~82%^[5],根据蛋白质分子量和氨基酸序列组成被分成 α 、 β 、 γ 和 δ 醇溶蛋白,与玉米相似^[6-7]。而 α -醇溶蛋白占高粱醇溶蛋白总量的 66%~84%^[8]。而转录因子 Opaque2 (O2) 可通过识别启动子上 O2 box(TCCACGT)来调控玉米 22 kDa α -醇溶蛋白和 15 kDa β -醇溶蛋白的基因表达^[9-10],O2 基因的突变能降低 α -醇溶蛋白的含量,在有的玉米近交品系中 α -醇溶蛋白能减少 60%以上^[11],并会增加富含赖氨酸和酪氨酸蛋白质的积累^[12]。随着社会和经济的发展,人们追求高生活品质的同时很注重保健。在食物方面更青睐营养价值高,有益于健康的粗粮食材,而高粱产品从古至今一直被人们所喜爱。因此,有望在高粱醇溶蛋白合成调控基础上,通过生物技术遗传转化改良高粱蛋白质的营养品质。

目前为止,高粱育种主要集中在增加产量、提

高抗性和降低单宁等方面,而在降低醇溶蛋白含量方面罕见报道。众所周知,传统育种针对性较差、分子机制不清楚、且费时耗力,收效小;而通过生物技术进行遗传转化可省时,收效大。近年产生的新技术 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)介导的基因沉默具有特异、高效的特点,植物中运用转基因技术所形成的 RNAi 可以遗传到下一代。本研究将构建的 *opaque2* 基因 RNA 抑制表达载体利用农杆菌介导转化高粱幼胚,通过测定转基因植株籽粒中醇溶蛋白含量,观察胚乳中蛋白质体形状变化,以及 SDS-PAGE 电泳检测等来分析 RNAi 靶向沉默 *opaque2* 基因对高粱醇溶蛋白含量的影响。以期筛选出籽粒中醇溶蛋白含量低的优质株系,为扩展高粱的遗传基础和加快高粱品质育种进程提供种质资源和方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

高粱品种 P898012 由美国密苏里大学哥伦比亚分校遗传转化中心张展元实验室惠赠;高粱组织培养中激素类 IAA、6-BA 和 IBA 均购自美国 Sigma 公司;头孢噻肟购自美国 Caisson 公司;草铵膦购自美国 Sigma 公司;限制性内切酶 *Bam*HI、*Spe*I、*Kpn*I、*Sac*I、*Hind*III 和 *Eco*RI、T4 DNA 连接酶、Taq 聚合酶,载体 T-Vector pMD20 等购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 产物纯化和质粒提取等试剂盒均购自天根生化科技有限公司(北京);TRIZOL 购自美国 invitrogen 公司;所有引物均由上海生工公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 RNAi 抑制表达载体构建 以 GenBank 核酸数据库中高粱 *opaque2* 基因序列(登录号 X71636)上第 1 个外显子设计引物。一对引物带有 *Bam*HI

和 *SpeI* 酶切位点; 另一对带有 *KpnI* 和 *SacI* 酶切位点。将 2 个扩增目的片段分别连接到植物载体 p130035SI-X 上, 然后再用 *HindIII* 和 *EcoRI* 将带有 35S、目标片段和 NOS 片段切下后连接到 pCambia3300 载体上, 用筛选抗性草铵磷(*Bar*)基因替换掉潮霉素(*hptII*)基因。

1.2.2 高粱幼胚遗传转化 高粱幼胚的遗传转化体系参照 Do 等的方法进行^[13]。取授粉 11~14 d 高粱籽粒, 经消毒后剥离幼胚作为外植体。将 *opaque2* 基因的 RNAi 抑制表达载体转入农杆菌 AGL1 中, 利

用农杆菌介导转化高粱幼胚, 通过诱导愈伤、草铵磷抗性筛选芽分化、根分化过程来获得再生转基因植株。

1.2.3 再生植株的阳性检测与分析

1) 再生植株的 PCR 检测。再生植株先通过叶片涂抹草铵磷溶液来进行初步筛选, 若叶片涂抹处未变黄焦枯, 则初步认定其为阳性转基因植株。然后提取叶片 DNA, 使用 *Bar* 基因和载体上序列设计引物进行 PCR 检测确定。构建载体及再生植株阳性检测的引物见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Opaque 2</i> 基因 (<i>Bam</i> HI 和 <i>Spe</i> I 酶切位点)	Opa-1F cgcGGATCCATGGAGCCTGTCTTC Opa-1R ctacACTAGTTCAGTTAGAAGCTCCT
<i>Opaque 2</i> 基因 (<i>Kpn</i> I 和 <i>Sac</i> I 酶切位点)	Opa-2F ccgGAGCTCATGGAGCCTGTCTTC Opa-2R cggGGTACCTCAGTTAGAAGCTCCT
<i>Bar</i> 基因	Bar-F ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGC Bar-R TCAAATCTCGGTGACGGGCAGG
检测序列	Vec-F GGTAATTAAGCAAACTTATCCAA Vec-R TAACATAGATGACACCGCGC

2) 转基因植株实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测。取叶片检测呈阳性植株开花 20 d 的籽粒, 用 Trizol 试剂盒分别提取胚乳总 RNA, 依据产品说明书, 使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒进行反转录。以高粱 actin 基因为内参(扩增引物为 actin-F:TTGGGTCAGAAA GGTTCAGG 和 actin-R:TGCTCATTCGATCAGCAAT C), 以 *opaque2* 基因序列设计引物(o2-F:CAAGCTG AAGAGCCAACCAT 和 o2-R:AGAGTTGATCCGGA GGAGGT), 利用 SYBR 荧光染料法进行 qRT-PCR 检测, 并分析 *opaque2* 基因的相对表达量。

1.2.4 高粱籽粒醇溶蛋白含量测定及 SDS-PAGE 电泳 高粱籽粒中醇溶蛋白含量测定参照文献[14]。各转基因植株收获籽粒后, 随机取 20 粒烘干至恒重后, 研磨至粉末状。称取高粱籽粒粉末 50 mg 加到 2.0 mL 离心管中, 按 1:10 比例(g/mL)加入含 4% DDT 的 60%叔丁醇提取液 500 μ L, 混匀后在 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜提取, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清测定醇溶蛋白含量。蛋白含量测定采用考马斯亮兰 G-250 方法。高粱籽粒醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳参照 Hamaker 的方法进行^[15], 略有修改。取 300 μ L 提取液减压蒸发溶剂, 使蛋白质沉淀。加入 100 μ L 5X

电泳上样缓冲液(不含溴酚蓝)溶解蛋白质。取 10 μ L 溶解蛋白样品与 10 μ L 的含有溴酚蓝的 5X 电泳上样缓冲液混合后沸水浴处理 5 min, 取 15 μ L 样品用 15%的分离胶电泳检测。

1.2.5 高粱籽粒透射电镜观察 高粱籽粒用 2.5% 戊二醛在 4 $^{\circ}$ C 固定, PBS 缓冲液冲洗 3 次。1%锇酸在 4 $^{\circ}$ C 后固定 2 h, 仍用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。使用 30%、50%、70%、90%和 100%系列的乙醇梯度脱水, 每次 10 min, 100%乙醇梯度脱水 2 次。然后用 Epon812 环氧树脂包埋, 在 37、45 $^{\circ}$ C 和 65 $^{\circ}$ C 温箱固化, 各级温度固化 24 h。经 UltracutE 超薄切片机切片, 醋酸双氧铀硝酸铅染色后, 用日立 H-7560 透射电子显微镜观察并拍照。

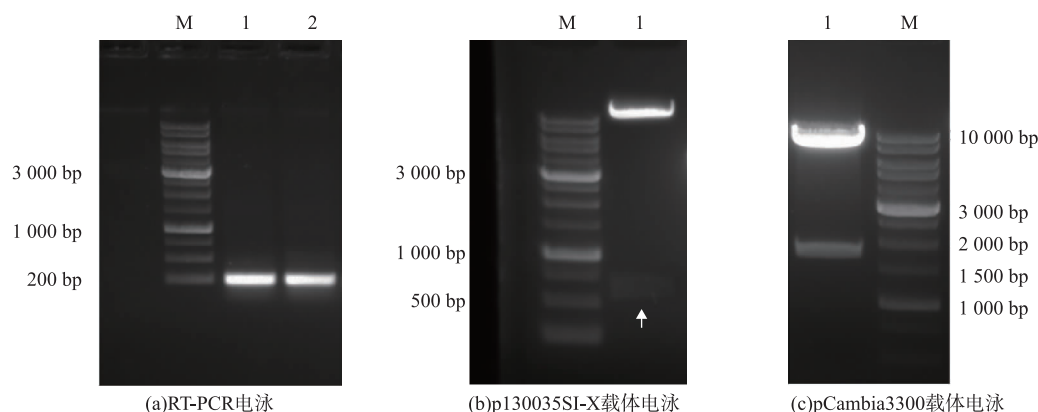
2 结果与分析

2.1 构建 RNAi 抑制表达载体

RNAi 抑制表达载体构建过程如图 1 所示。用高粱 *opaque2* 基因序列第 1 个外显子上带有 *Bam*HI 和 *Spe*I 酶切位点, *Kpn*I 和 *Sac*I 酶切位点的两对引物进行 RT-PCR, 分别扩增出 2 条长度约为 224 bp 的目标片段(图 1(a))。在将 2 条目标片段 1 正 1 反分别连接到植物载体 p130035SI-X 上后, 用 *Bam*HI

和 *SacI* 2 个内切酶酶切载体进行验证。由于载体上连接的 2 条目标序列间还存在 1 个 118 bp 长度的内含子,在酶切后产生除线性载体外的一个约 566 bp 的短片段(图 1(b))。由于载体 p130035SI-X 上的植物抗性筛选基因为 *hptII* 基因,其不利于高粱抗性植株的筛选。因此,使用 *HindIII* 和 *EcoRI* 将新构建的 p130035SI-X 载体上带有 35S 启动子、目标

片段和 NOS 终止子片段切下后连接到 pCambia3300 载体上,用筛选抗性 *Bar* 基因替换掉 *hptII* 基因。用 *HindIII* 和 *EcoRI* 2 个内切酶酶切新构建的 pCambia3300 载体进行验证,产生除线性载体外的一个约 1 700 bp 的片段(图 1(c)),结果表明带有 *opaque2* 基因片段的 RNAi 抑制表达载体构建成功。



M:DNA ladder;1:带有 *Bam*HI 和 *Spe*I 酶切位点引物扩增片段;2:带有 *Kpn*I 和 *Sac*I 酶切位点引物扩增片段

图 1 RNAi 载体构建电泳

Fig. 1 Electrophoregram of RNAi vector construction

2.2 农杆菌介导 *opaque2* 基因 RNAi 抑制表达载体转化高粱

以高粱幼胚为外植体,利用农杆菌将 *opaque2* 基因 RNAi 抑制表达载体转化高粱品种 P898012 的过程如图 2 所示。农杆菌转化幼胚共培养 3 d 后,幼胚长大并在胚周围产生色素(图 2(a))。在草铵磷抗

性筛选培养基上,抗性愈伤白色致密,而非抗性愈伤则水浸状褐色,甚至变黑(图 2(b))。在诱导芽分化的草铵磷抗性筛选培养基上,抗性愈伤组织可先后分化出从生苗,而有些愈伤则变黑坏死(图 2(c))。将苗转移到生根培养基上诱导生根(图 2(d))后,移苗至土中。

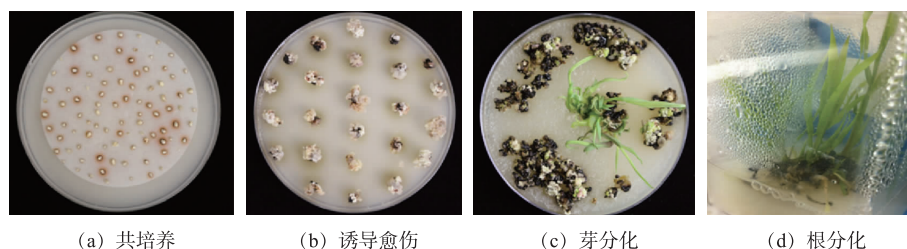


图 2 高粱遗传转化

Fig. 2 Genetic transformation of sorghum

2.3 阳性转基因植株检测与分析

2.3.1 转基因植株的 PCR 检测 再生幼苗叶片涂抹 100 mg/L 草铵磷,若涂抹叶片在 3 片以上未发生黄褐色焦枯,则初步认为其为阳性植株。取叶片提取 DNA,用 *Bar* 基因引物以叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增,目标片段约为 552 bp,结果见图 3(a),野

生型植株未扩增出目标条带,而有些转基因植株可扩增出目标条带。再用载体上两个插入片段间内含子设计的上游引物,和在其后载体上设计的下游引物,以 DNA 为模板进行 PCR 扩增,目标片段约为 591 bp,结果见图 3(b)。可见,在 pCambia3300 载体上扩增出极亮目标条带,而在以 H_2O 为模板的阴性

对照和野生型植株中均未扩出目标条带;有些转基因植株可扩增出目标条带。经过多次检测,将用不同引物可同时扩增出相应目标条带的植株确定为转基因植株,本试验共获得 5 株。

2.3.2 转基因植株的 qRT-PCR 检测分析 以高粱 *actin* 基因为内参,采用 qRT-PCR 对高粱胚乳中 *opaque2* 基因的表达量进行检测,见图 4。结果表明,除 1 号外,其余 4 株转基因植株中 *opaque2* 基因的表达量较对照显著降低($P<0.05$),但不同植株表现不同,12 号下降程度更大。可见,通过 RNAi 技术可对转基因高粱植株 *opaque2* 基因造成不同程度的干扰。

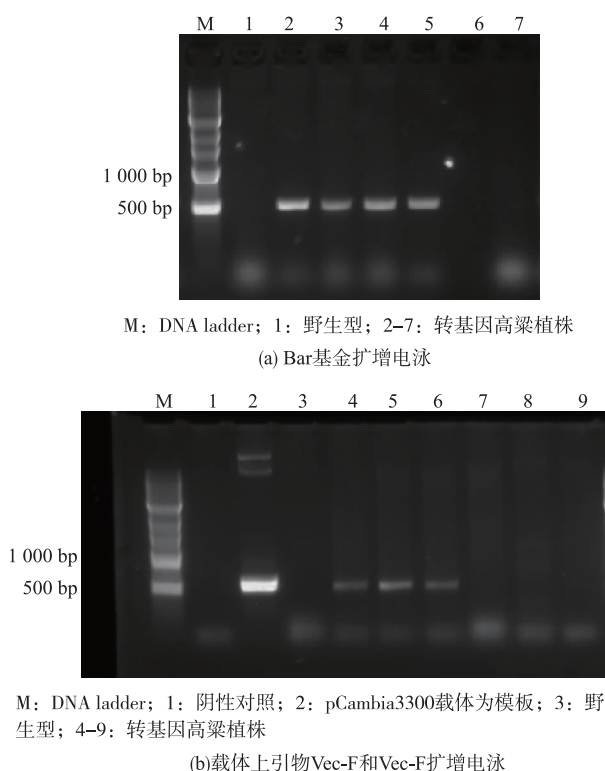


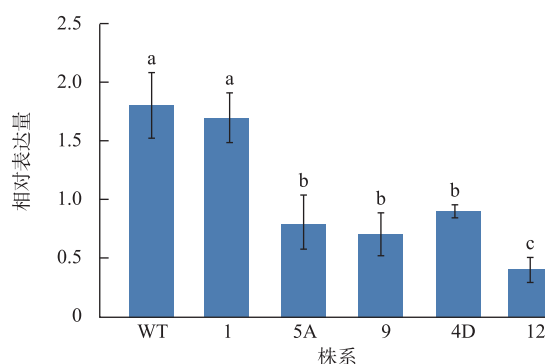
图 3 阳性植株检测电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of detecting the positive plants

2.4 高粱籽粒醇溶蛋白含量测定及 SDS-PAGE 电泳

2.4.1 籽粒中醇溶蛋白含量测定 RNAi 抑制 *opaque2* 转基因高粱籽粒醇溶蛋白含量见图 5。从图 5 中可见,与野生型相比,转基因植株中 4 株籽粒的醇溶蛋白含量显著降低($P<0.05$),只有 1 号植株醇溶蛋白含量未下降。可见,通过 RNAi 抑制 *opaque2* 基因可有效影响高粱籽粒中醇溶蛋白的合成和积累。文献[15]在玉米上的研究表明,以 *opaque2*(o2)

基因突变体 W64Ao2 为材料,运用 RNAi 技术抑制 *Ohp* (O2 heterodimerizing protein)、*Pbf* (Prolamine-box binding factor) 的突变体和 *Pbf/Ohp* 双基因突变体,其醇溶蛋白含量与野生型相比分别下降 83%、89% 和 90%,*opaque2*、PBF 及 OHP 三者间以效应物和协同作用的模式在转录水平上调控醇溶蛋白基因表达。但本实验中转基因植株中醇溶蛋白含量未与 RNAi 抑制 *opaque2* 基因程度完全吻合,其原因还需进一步研究。



注:1、5A、9、4D 和 12 为转基因植株

图 4 转基因植株 *opaque2* 基因表达的 qRT-PCR 检测结果

Fig. 4 Result of *opaque2* gene expression in the transgenic plants by qRT-PCR assay

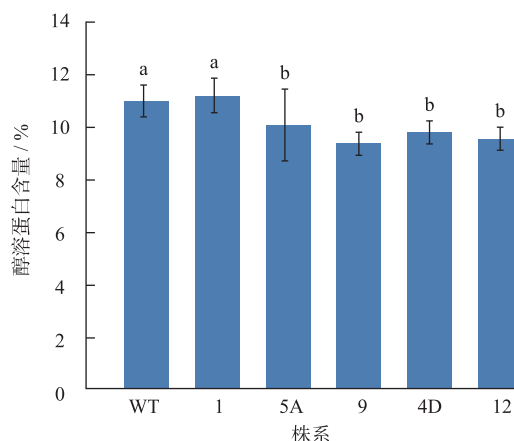


图 5 高粱籽粒中醇溶蛋白含量

Fig. 5 Kafir content in grains

2.4.2 醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳 醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳如图 6,供试野生型和各转基因植株的醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳带型相同,约在 15、20 kDa 和 22 kDa 处出现 3 条带,可推测通过 RNAi 技术抑制 *opaque2* 基因后,仅影响了醇溶蛋白含量,而未影响醇溶蛋白种类及存在方式。参照文献[15]对高赖氨酸高粱突变体 P721 Q 进行 SDS-PAGE 电泳

结果可知,20 kDa 处条带为 β -醇溶蛋白,22 kDa 处条带为 α -醇溶蛋白,但缺少分子量较大的 γ -醇溶蛋白条带。参照玉米醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳结果^[15-16]推测 15 kDa 处的可能为高粱的 δ -醇溶蛋白。

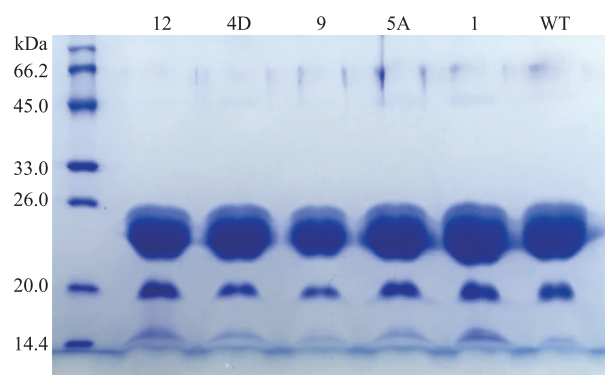
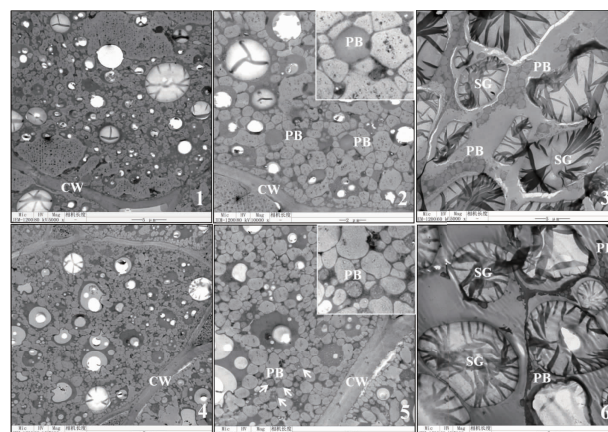


图 6 高粱籽粒中醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of kafirin in grains

2.5 高粱籽粒胚乳细胞透射电镜观察结果

选取转基因植株 9 号和野生型高粱籽粒进行透射电镜观察,结果见图 7。野生型胚乳细胞中淀粉粒排列紧密,部分大淀粉粒融合成大块状;而转基因植株淀粉粒排列疏松,细胞中存在多处孔隙(图 7 中 1、2、4、5)。野生型胚乳细胞中蛋白质体数量较多且有一些体积较大,而转基因植株蛋白质体数量较少,体积较小(图 7 中 2、3、5、6)。有研究报道,玉米 *o2* 基因突变体在灌浆过程中蛋白质体体积明显变小^[16],这与本试验结果一致。有研究表明,玉米籽粒胚乳中由于 α -醇溶蛋白含量的降低,蛋白质体的数量变少且体积变小,在种核脱水过程中不能形成坚硬、致密的组织,容易导致玉米种核松软、易碎^[17]。本

试验中转基因植株籽粒胚乳细胞内含物排列不紧密,空隙多,也可能由于高粱籽粒在灌浆脱水过程中蛋白质体数量减少和体积变小所导致,进而使籽粒中醇溶蛋白含量降低。



注:1、2、3:野生型;4、5、6:转基因植株 9 号;CW:细胞壁(cell wall);SG:淀粉粒(starch granule);PB:蛋白质体(protein body)
图 7 高粱籽粒胚乳细胞中淀粉粒和蛋白质体的透射电镜观察

Fig. 7 Transmission electron microscopy of starch granule and protein bodies in endosperm of sorghum grain

3 结语

本研究获得了通过 RNAi 技术抑制 *opaque2* 基因的高粱转基因植株,其中 80% 的植株籽粒中醇溶蛋白含量降低,但由 *opaque2* 基因调控的降低机制还需深入研究。同时,所得种子后代品质特性也需进一步确定。

参考文献:

- [1] TAN Bin. Properties of grain sorghum and its prospects of utilization in food industry [J]. *Cereal & Feed Industry*, 2007(7): 16-19. (in Chinese)
- [2] LOOKHART G L, BEAN S R. Cereal protein: composition of their major fractions and methods for identification [C]// New York: Dekker, 2000: 363-384.
- [3] ZHANG Weimin, XIAO Zuneng, ZHONG Geng. Study on digestibility of sorghum protein [J]. *Journal of Cereals and Oils*, 2004(9): 14-17. (in Chinese)
- [4] MACLEAN W C JR, LOPEZ de R G, PLACKO R P, et al. Protein quality and digestibility of sorghum in preschool children: balance studies and plasma free amino acids [J]. *J Nutr*, 1981, 111(11): 1928-1936.
- [5] BELTON P S, DELGADILLO I, HALFORD N G, et al. Kafirin structure and functionality [J]. *J Cereal Sci*, 2006, 44(3): 272-286.
- [6] SHULL J M, WATTERSON J J, KIRLEIS A W. Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) based on molecular weight, solubility, and structure [J]. *J Agr Food Chem*, 1991, 39(1): 83-87.

- [7] ESEN A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins(zeins) of maize(*Zea Mays* L.)[J]. **J Cereal Sci**, 1987, 5(2): 117-128.
- [8] WATTERSON J J, SHULL J M, KIRLEIS A W. Quantitation of alpha-, beta-, and gamma-kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor*[J]. **Cereal Chem**, 1993, 70(4): 452-457.
- [9] SCHMIDT R J, KETUDAT M, AUKERMAN M J, et al. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD-zein genes[J]. **Plant Cell**, 1992, 4(6): 689-700.
- [10] CORD N G, YUNES J A, DA S M, et al. The involvement of Opaque 2 on β -prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator[J]. **Plant Mol Biol**, 1995, 27(5): 1015-1029.
- [11] WU Y, MESSING J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value[J]. **Front Plant Sci**, 2014, 5(240): 240.
- [12] MERTZ E T, BATES L S, NELSON O E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm[J]. **Science**, 1964, 145(3629): 279-280.
- [13] DO P, LEE H, MOOKKAN M, et al. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and bar gene as a selectable marker[J]. **Plant Cell Rep**, 2016, 35(10): 2065-2076.
- [14] WANG Wei, YIN Liping, CHEN Qin. Different conditions of sorghum seed's kafirin extraction [J]. **Journal of Shanghai University(Natural Science)**, 2007, 13(6): 746-750.(in Chinese)
- [15] ZHANG Z Y, YANG J, WU Y R. Transcriptional regulation of zein gene expression in maize through the additive and synergistic action of opaque2, prolamine-box binding factor, and O2 heterodimerizing proteins[J]. **Plant Cell**, 2015, 27(4): 1162-1172.
- [16] HAMAKER B R, MOHAMED A A, HABBEN J E, et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method[J]. **Cereal Chem**, 1995, 72(6): 583-588.
- [17] TSAI C Y, HUBER D M, WARREN H L. Relationship of kernel sink for N to maize productivity [J]. **Crop Sci**, 1978, 18(3): 399-404.

会 议 消 息

会议名称: 第六届生物信息学研究与应用国际会议(ICBRA 2019)

会议时间: 2019-12-19 至 2019-12-21

会议地点: 韩国首尔国立大学

主办单位: ICBRA 2019

官方网址: <http://www.icbra.org/>

会议简介: (ICBRA 2019) 2019 年第六届生物信息学研究与应用国际会议将于 2019 年 12 月 19-21 日在韩国首尔国立大学举行。特邀演讲人: 韩国首尔国立大学 Taesung Park 教授、香港城市大学 Yuan-Ting Zhang 教授、韩国首尔国立大学 Sun Kim 教授。会议文章出版: ICBRA 2019 录用并注册的文章将发表在 ACM 国际会议论文集 (ISBN: 978-1-4503-7218-3), 被 Ei Compendex 和 SCOPUS 等核心数据库检索, 或发表在 IJBBB 期刊。ICBRA 2019 的优选文章 (新增至少 50% 以后) 将被推荐到 Information (ISSN 2078-2489)。作为特刊出版的文章能被 Scopus (Elsevier), Ei Compendex, Emerging Sources Citation Index (ESCI-Web of Science) 等检索。

投稿方式: <http://confsys.iconf.org/submission/icbra2019>

会议邮箱: icbra-info@cbees.net

会议专员: 江女士

联系电话: +852-3500-0137 (香港)/+86-28-86528465 (中国)