

大豆 7S 球蛋白 β - 伴大豆球蛋白的研究现状

刘珊珊¹, 武小霞¹, 姜振峰¹, 李文滨¹

(1. 东北农业大学大豆科学研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 大豆 β - 伴大豆球蛋白约占大豆籽粒总蛋白含量的 25%, 是 7S 球蛋白的组分之一, 是影响大豆籽粒蛋白营养品质及加工品质的重要组分。本文对大豆 7S 球蛋白 β - 伴大豆球蛋白的基本属性, 亚基积累规律, 遗传变异体的种类及其分子遗传学水平的研究现状等进行了综述。

关键词 大豆; 7S 球蛋白; β - 伴大豆球蛋白; 亚基表现; 分子基础

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 9841 (2007) 03 - 0417 - 06

ADVANCE IN SOYBEAN 7S GLOBULIN β - CONGLYCININ

LIU Shan-shan¹, WU Xiao-xia¹, JIANG Zhen-feng¹, LI Wen-bin¹

(1. Key Laboratory of Soybean Biology of Ministry of Education, Soybean Research Institute, Northeast Agriculture University, Harbin, 150030)

Abstract β - conglycinin is major composition of 7S globulin. It represents approximately 25% of the protein in a soybean seed, and affects the nutritional quality and functional properties of soybean protein in soy protein foods. In this review, the general features of soybean β - conglycinin were reviewed; the accumulation regular of soybean β - conglycinin subunits were described; the genetic variants of soybean β - conglycinin and foundation information of genes encoding soybean β - conglycinin are summarized.

Key words Soybean; 7S globulin; β - conglycinin; Subunit composition; Molecular basis

大豆籽粒蛋白大约 70% 是贮藏蛋白。大豆籽粒贮藏蛋白的水溶性蛋白质 (中性 pH) 超速离心模式产物主要有四种, 根据沉降系数的不同分别命名为 2S, 7S, 11S 和 15S 球蛋白, 每一组份都是一种蛋白复合物。

1 大豆 β - 伴大豆球蛋白的基本属性

1.1 大豆 β - 伴大豆球蛋白的亚基组成

7S 球蛋白约占大豆可溶性蛋白抽提物总含量的三分之一, 大豆豌豆球蛋白 (vicilin) 命名为伴大

豆球蛋白 (conglycinin)。凝胶电泳分离及免疫化学分析^[1]结果表明, 7S 球蛋白包含理化性质各异的三种主要组分: β - 伴大豆球蛋白, γ - 伴大豆球蛋白和碱性 7S 球蛋白 (basic 7S globulin), 其中 β - 伴大豆球蛋白约占大豆 7S 球蛋白的 50% 以上。

大豆 β - 伴大豆球蛋白是由: α' - (76kDa), α - (72kDa) 和 β - (52 - 54kDa) 亚基组成的分子量为 150 kDa 的三聚体化合物^[2], 该三聚体的亚基组成呈现丰富的多态性。 β - 伴大豆球蛋白 7S 形式的通用结构式为 $\alpha_x\alpha'_y\beta_z$, 其中 x , y 和 z 代表相对应

收稿日期: 2006 - 11 - 02

基金项目: 大豆生物学教育部重点实验室资助 (SB06A50)

作者简介: 刘珊珊 (1972 -), 女, 副教授, 博士, 主要从事大豆遗传育种及分子遗传学基础研究。E - mail: sslu_yulan@hotmail.com

通讯作者: 李文滨教授, 博士生导师, E - mail: wenbinli@yahoo.com

亚基的数量,每个寡聚体内所含的亚基数应满足 $x + y + z = 3$,其具体值为 0,1,2,3 (x);0,1 (y) 和 0,1,2,3 (z)。利用离子交换层析法,已经分离到 7 种亚基组成各异的 β -伴大豆球蛋白,并命名为 $B_0 - B_6$ (表 1)^[3]。以上结论具有非常重要的实践指导意义,说明可以利用遗传学的手段调整大豆 β -伴大豆球蛋白的亚基组成,从而改善大豆蛋白的营养品质及加工适应性。

表 1 大豆 β -伴大豆球蛋白亚基组成的多样性^[5]
Table 1 Soybean β -conglycinin heterogeneity^[5]

β -伴大豆球蛋白 β -conglycinin	亚基组成 Subuint composition
B_0	β_3
B_1	$\alpha'_1\beta_2$
B_2	$\alpha_1\beta_2$
B_3	$\alpha_1\alpha'_1\beta_1$
B_4	$\alpha_2\beta_1$
B_5	$\alpha_2\alpha'_1$
B_6	α_3

1.2 大豆 β -伴大豆球蛋白的基本特性

所有的 β -伴大豆球蛋白的亚基都是包含氨基葡糖和甘露糖残基的糖基化蛋白^[4],可低温溶解,这是 7S 球蛋白和 11S 球蛋白间最典型的差别所在(11S 球白内不包含碳水化合物)。在适宜的纯化条下,pH4.8 时可获得 β -伴大豆球蛋白沉淀物^[5],在离子强度由 0.5 降至 0.1 时, β -伴大豆球蛋白具有二聚体化的特性,因此大豆 7S 球蛋白在高离子强度时的超速离心最高峰值 7S 会在低离子强度时移至 9S^[3,4]。

2 大豆 β -伴大豆球蛋白亚基的积累

2.1 各亚基蛋氨酸残基的含量不同

大豆 β -伴大豆球蛋白的三个主要的亚基 α' -、 α -和 β -亚基)都富含天冬氨酸/天冬酰胺,谷氨酸/谷氨酰胺,亮氨酸和精氨酸,但 β -伴大豆球蛋白内蛋氨酸的含量偏低,而且每个亚基内蛋氨酸残基的含量有明显差异。氨基酸分析及溴化氰裂解分析表明, α' -亚基内含有三到四个蛋氨酸残基, α -亚基内含有 2 个蛋氨酸残基而 β -亚基不含有蛋氨酸残基^[2]。因此,通过调节 β -伴大豆球蛋白的亚基组成从而提高大豆蛋白的营养品质是可能的。

2.2 各亚基在种子发育过程中开始积累的早晚不同

β -伴大豆球蛋白在大豆籽粒胚胎发育的中后期积累于大豆籽粒内,在成熟的大豆籽粒内可检测到每个亚基(α' -、 α -和 β -亚基)的多型异构体,但每个亚基在籽粒发育过程中开始积累的早晚各不相同,其中 α' -与 α -亚基在大豆子叶发育形成过程中细胞分裂终止后不久(大约授粉后 18~20 d)开始积累^[7],而 β -亚基却在此后的 1~2 周才能检测到^[6,8]。多数情况下,子叶细胞内 α -亚基的积累比 α' -亚基的积累早 1~2 d^[7],在 α' - α 与(β -亚基含量积累到稳定水平后, β -亚基仍继续积累^[6]。以上结果表明大豆 β -伴大豆球蛋白的三种亚基(α' -、 α -和 β -亚基)是以彼此独立的积累模式积存于大豆籽粒内的。

2.2 各亚基在胚轴与子叶内的含量分布不同

β -伴大豆球蛋白的各亚基在胚轴与子叶内的含量分布不同。 α' -亚基在胚轴与子叶内的含量大致相同,胚轴内 α -亚基的含量低于子叶内的 α -亚基的含量,胚轴内检测不到 β -亚基的存在,另外, α -亚基在全种子抽提物内的含量始终远高于 α' -亚基的含量^[6]。

2.3 β -亚基的积累规律

β -伴大豆球蛋白的 β -亚基具有独特的积累规律, β -亚基的积累受到许多发育及环境信号的调控。研究表明,蛋氨酸水平,营养压力及脱落酸(ABA)处理均可影响 β -亚基的积累。Holowach 等人 1984 年对未成熟大豆子叶进行体外培养,当子叶在含蛋氨酸的培养基上培养时, β -亚基的积累被完全抑制,而 α' -与 α -亚基的积累则基本上不受影响。蛋氨酸对 β -亚基积累的抑制是在 mRNA 水平上进行调控的^[10],除去培养基内的蛋氨酸后,编码 β -亚基的 mRNA 会重新开始积累。硫或钾不足也会影响大豆种子贮藏蛋白的组分,硫缺乏时, β -伴大豆球蛋白比豆球蛋白积累的多,同时, β -伴大豆球蛋白的亚基组分也受到影响, β -亚基的积累会相应增加三倍,而其它两个亚基(α' -、 α -亚基)的含量则基本不受影响^[11]。在液体大豆子叶培养基内添加 ABA 会导致 β -伴大豆球蛋白 β -亚基的含量增加,而且 β -亚基的含量可以反映出子叶内内源 ABA 的浓度^[12]。

3 大豆 β -伴大豆球蛋白的遗传变异体

1981 年 Kitamura 和 Kaizuma 在日本大豆种质中筛选到亚基表现为 α' -缺失型的‘Keburi’和亚基表现为 (α -少 + β -少)型的‘Moshidou Gong 503’。其中,Keburi’的 α' (-亚基缺失是由起始于 5(-端的大段 α' -亚基基因编码序列的缺失造成的^[13],而‘Moshidou Gong 503’的低 α 和低 β -亚基的表现型则是由它们各自独立的单一等位基因控制的。日本品种‘东北 124’的 β -伴大豆球蛋白亚基表现为[(α' + α)缺 + β -少]型,独立遗传的单隐性基因 *cgy₁*控制‘东北 124’的 α' -与 α -亚基的缺失^[14]。Hajika 等人 1996 年报道了由单显性基因 *Scg-1* 控制的 β -伴大豆球蛋白三个主要亚基(α' -、 α -和 β -亚基)全部缺失的大豆材料,*Scg-1* 基因被认为是 β -伴大豆球蛋白的抑制因子^[15,19]。以上突变材料均生长发育正常无生理异常表现。另外,日本学者经 γ -射线诱变处理还得到(α + β)缺型^[20]和(α' + α + β)缺型^[21]变异材料,这两组材料的亚基表现均由隐性基因控制且伴随有生理畸变。以上这些 β -伴大豆球蛋白遗传变异体的获得与研究对丰富大豆种质基础,研究种子蛋白亚基的表达调控具有重要的意义。

4 大豆 β -伴大豆球蛋白基因家族

4.1 β -伴大豆球蛋白由复杂的多基因家族编码

β -伴大豆球蛋白由一个复杂的基因家族编码。Harada 等 1989 年报道 β -伴大豆球蛋白基因家族包含至少 15 个成员, β -伴大豆球蛋白的三个主要的亚基(α' -、 α -和 β -亚基)是其基因家族内不同成员编码的蛋白产物。编码大豆 β -伴大豆球蛋白三个主要亚基(α' -、 α -和 β -亚基)基因的表达式具有严格的组织特异性和时序调控性,以上特性及 β -伴大豆球蛋白的高丰度性使其成为研究种子贮藏蛋白的组织特异性表达,发育时期特异性表达及环境调控表达的基因调控表达机理的理想材料。

根据各基因转录产物(mRNA)的大小可将 β -亚基基因与 α' -与 α -亚基的基因区分开来, β -亚基基因的转录物(mRNA)长约 1.7 kb,而 α' -与 α -亚基基因的转录物长约 2.5 kb^[2,23,24]。以上长度各异的 mRNA 的翻译及其新生成多肽链的翻译后修饰导致 β -伴大豆球蛋白亚基的异质性^[23,25,26]。

4.2 β -伴大豆球蛋白主要亚基的基因结构

目前为止,大豆 β -伴大豆球蛋白的 α' -、 α 及 β -亚基基因都已被分离鉴定,它们分别是 pGmg17.1,卡隆 4A (Charon 4A) 基因组克隆,包含完整的 α' -亚基基因序列和大约 9 kb 的 5'-端基因序列^[27];编码 β -伴大豆球蛋白 β -亚基的基因组克隆 pGmg91 Beta^[8]和编码大豆 β -伴大豆球蛋白 α -亚基的全长 cDNA 克隆 pGmc76^[28]。 α' 及 β -亚基基因 5'-端侧翼区的限制性内切酶图谱如图 1 所示。

图中数字表示各核苷酸位点相对于各基因转录起始位点的距离^[39]

Numbers indicate nucleotide positions relative to the site of transcription initiation^[39]

图 1 大豆 β -伴大豆球蛋白 α' -亚基基因 (A) 和 β -亚基基因 (B) 5'-端侧翼区的限制性内切酶图谱

Fig. 1 Restriction sites of 5' flanking region of the α' -subunit gene (A) and β -subunit gene (B) of soybean β -conglycinin

另外,Harada 等 1989 年报道: α' - , α - 和 β - 亚基基因由 6 个外显子,5 个内含子组成(图 2)。

图中黑色矩形框代表外显子结构,白色矩形框代表内含子结构。图中数字表示各核苷酸位点相对于各基因转录起始位点的距离^[22]
Black boxes represent exon sequences and white boxes represent introns. Numbers indicate nucleotide positions relative to site of transcription start site^[22]

图2 大豆 β - 伴大豆球蛋白 α' - 亚基基因 (A) 和 β - 亚基基因 (B) 的内含子与外显子结构图

Fig. 2 Intro - exon structure of α' - subunit gene (A) and β - subunit gene (B) of soybean β - conglycinin

α' / α - 亚基基因与 β - 亚基基因的外显子有平均 85% 的同源序列,而内含子则仅有 50% 的同源序列。以上数据是分子水平上研究调控 β - 伴大豆球蛋白各亚基表达规律的理论基础,被广大学者在对大豆 β - 伴大豆球蛋白各亚基基因表达调控的深入研究中广泛应用。

4.3 β - 伴大豆球蛋白主要亚基的基因表达特性

β - 伴大豆球蛋白三个主要亚基(α' - , α - β 和 β - 亚基)的基因都是在大豆籽粒发育的中、后期表达,各基因表达水平各不相同,每个单倍体基因组至少含有 3 个 α' - 亚基基因,8 - 13 个 β - 亚基基因,但是在大豆籽粒内 α' - 亚基与 β - 亚基的积累水平却基本相同,这表明单个 α' - 亚基基因比单个 β - 亚基基因的表达水平高^[29~31]。在大豆籽粒发育过程中, α' / α - 亚基的 mRNA 比 β - 亚基的 mRNA 早 3 ~ 5 d 开始积累^[31]。 α' - 和 α - 亚基由两个密切相关的多基因家族编码^[24],二者与菜豆蛋白和豌豆球蛋白的贮藏蛋白基因具有极高的同源性^[32,33],但与 β - 亚基基因编码的氨基酸序列间的

同源性较低^[2,34],看来, β - 亚基是由不同于 α' / α - 亚基基因的独立的基因家族编码的。

4.4 β - 伴大豆球蛋白主要亚基的基因调控序列

尽管 β - 伴大豆球蛋白三个主要亚基的基因序列具有较高的同源性,但 α' / α - 亚基基因与 β - 亚基基因的调控机制却明显不同。 β - 伴大豆球蛋白基因的调控多发生在转录水平^[22,35],各基因的表达调控特性在转基因烟草 (*Nicotiana*) 和矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 内均表现有保守性^[25,29,31,35,36]。在发育中的大豆种子的细胞核抽提物中已检测到 4 类不同的反式作用因子,命名为大豆胚胎因子 (Soybean Embryo Factors),简称 SEF 1 - 4。SEF 1 - 4 在 α' 与 β - 亚基基因上的结合位点的分布不同,所结合的蛋白数目受胚胎发育阶段的调控^[30]。在 α' - 亚基基因上游 - 140 ~ - 77 bp 处存在有种子特异性转录增强子^[37,38],该增强子内包含有长为 62 bp 的豌豆球蛋白共有序列框 (Vicilin box) 和大豆胚胎因子 4 (SEF 4) 的结合位点,该增强子的活性受其上游 - 246 bp 处一段与豆球蛋白中心序列框 RY - 重复序

列元件 (CATGCAT) 同源的短序列的影响^[39]。目前,仅知道(-亚基基因上游-553~-442 bp 和-308~-72 bp 两个区域内的序列缺失会导致 β -亚基基因表达量的大幅度降低,关于 β -亚基基因表达调控元件的具体位置,结构特征等知之甚少。在 α' -亚基基因上游序列内发现的增强子序列与 β -亚基基因编码区上游 1 kb 的基因序列间无同源性,这表明两基因的表达受不同调控机制的作用^[39]。

5 大豆 7S 球蛋白研究的发展趋势

随着分子遗传学的迅猛发展,蛋白质组学研究已成为生命科学的最新研究热点 从 21 世纪初开始,遗传学研究已进入了基因组-蛋白质组研究的新时期。在蛋白质组学问世近 10 年来,国内外的研究主要集中在医药卫生领域,其研究范围涉及蛋白质作图,基因产物识别,肿瘤发生与发展的分子机制,医药靶分子的寻找与分析等一系列热点问题的研究,在植物学领域有关蛋白质组学研究的报道还不是很多。

大豆是人类及其畜产业重要的植物蛋白的营养来源,蛋白营养的全面性和蛋白含量的高丰度性是大豆籽粒贮藏蛋白的主要特点。大豆籽粒贮藏蛋白的表达具有典型的组织特异性和发育时期的特异性,多年以来,大豆籽粒贮藏蛋白都是研究高等植物种子蛋白表达调控分子机制的理想材料。近年来有关大豆籽粒贮藏蛋白的两种主要的组分 7S 球蛋白和 11S 球蛋白各亚基表达调控的分子机制进行了大量的研究,蛋白质组学时代的到来,指明了 21 世纪大豆籽粒贮藏蛋白分子遗传学的最新研究方向。

参 考 文 献

- [1] Catsimpoalas N., Ekenstam C. Isolation of alpha, beta and gamma conglycinins [J]. Arch. Biochem. Biophysics, 1969; 129: 490.
- [2] Coates J. B., Medeiros J. S., Thanh V. H., et al. Characterization of the subunits of β -conglycinin [J]. Arch Biochem Biophysics, 1985, 243: 184-194.
- [3] Thanh V. H., Shibasaki K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization [J]. Agriculture Food Chem, 1976 b, 24: 1117-1121.
- [4] Koshiyama I. Chemical and physical properties in soybean globulins [J]. Cereal Chem, 1968, 45: 394-404.
- [5] Thanh V. H., Shibasaki K. Heterogeneity of beta-conglycinin [J]. Biochem. Biophysics Acta., 1976 a, 469: 326-338.
- [6] Meinke D. W., Chen J., Beachy R. N. Expression of storage protein genes during soybean seed development [J]. Planta, 1981, 153: 130-139.
- [7] Beachy R. N., Thompson J. F., Madison J. T. Isolation and characterization of messenger RNAs that code for the subunits of soybean seed protein [M]. In: The plant seed: development, preservation, and germination. Rubenstein I., Phillips R. L., Green C. E., Gengenbach B. G., eds. Academic Press, New York, 1979, 67-84.
- [8] Tierney M. L., Bray E. A., Allen R. D., et al. Isolation and characterization of a genomic clone encoding the β subunit of β -conglycinin [J]. Planta, 1987, 172: 356-363.
- [9] Holowach L. P., Thompson J. F., Madison J. T. Effects of exogenous methionine on storage protein composition of soybean cotyledons cultured in vitro [J]. Plant Physiology, 1984, 74: 576-583.
- [10] Creason G. L., Holowach L. P., Thompson J. F., et al. Exogenous methionine depress level of mRNA for a soybean storage protein [J]. Biochem Biophysics Research Commun, 1983, 117: 658-662.
- [11] Gayler K. R., Sykes G. E. Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans [J]. Plants Physiology, 1985, 78: 582-585.
- [12] Bray E. A., Beachy R. N. Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons [J]. Plant Physiology, 1985, 79: 746-750.
- [13] Ladin B. F., Doyle J. J., Beachy R. N. Molecular characterization of a deletion mutation affecting the α' subunit of β -conglycinin of soybean [J]. Molecule Applied Genetics, 1984, 2: 372-380.
- [14] Takahashi K., Banaba H., Kikuchi A., et al. An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean [J]. Breeding Science, 1994, 46: 251-255.
- [15] Teraishi M., Takahashi M., Hajika M., et al. Suppression of soybean β -conglycinin genes by a dominant gene, Scg-1 [J]. Theoretical Applied Genetics, 2001, 103: 1266-1272.
- [16] Thanh V. C., Trang D. T. X., Liu S. S., et al. Evaluation of 7S β -subunit deficiency and its inheritance among soybeans *Glycine max* L. in the Mekong Delta, Viet Nam [J]. Biosphere Conservation, 2004, 6 (1): 1-5.
- [17] Kitamura K., Kaizuma N. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean seeds [J]. Japan. Breed, 1981, 31: 353-359.
- [18] Hajika M., Takahashi M., Sakai S., et al. A new genotype of 7S globulin (β -conglycinin) detected in wild soybean [J]. Breed Science, 1996, 46: 385-386.
- [19] Hajika M., Takahashi M., Sakai S., et al. Dominant inheritance of a trait lacking β -conglycinin detected in a wild soybean line [J]. Breeding Science, 1998, 48: 383-386.
- [20] Kaizuma N., Kowata H., Odanaka H. Genetic variation on soybean seed proteins induced by irradiation [M]. Rep Tohoku Br Crop Science Japan, 1989, 32: 97-99.
- [21] Kitagawa S., Ishimoto M., Kikuchi F., et al. A characteristic lac-

king or remarkably decreasing 7S globulin subunits induced with gamma – ray irradiation in soybean seeds [J]. Japan. Breed, 1991,41 (Supp 2):460 – 461.

[22] Harada J. J. ,Barker S. J. ,Goldberg R. B. Soybean β – conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and post – transcriptional processes[J]. Plant Cell,1989 ,1 ;415 – 425.

[23] Beachy R. N. ,Jarvis N. P. ,Barton K. A. In vivo and in vitro biosynthesis of subunits of the soybean 7S storage protein [J]. Molecule Applied Genetics,1981 ,1 ;19 – 27.

[24] Schuler M. A. ,Ladin B. F. ,Pollaco J. C. , et al. Structural sequences are conserved in the genes coding for the α , α' and β – subunits of the soybean 7S seed storage protein [J]. Nucleic Acids Research,1982 b,10;8245 – 8261.

[25] Beachy R. N. ,Chen Z L,Horsch R. B. , et al. . Accumulation and assembly of soybean β – conglycinin in seeds of transformed petunia plants[J]. EMBO,1985 ,4;3047 – 3053.

[26] Sengupta C. ,Deluca V. ,Bailey D. S. ,Verma D. P. S. Post – translational processing of 7S and 11S components of soybean storage proteins[J]. Plant Molecule Biology,1981 ,1 ;19 – 34.

[27] Schuler M. A. ,Schmitt E. S. ,Beachy R. N. . Closely related families of genes code for the α and α' subunits of the soybean 7S storage protein complex[J]. Nucleic Acids Research,1982 a,10; 8225 – 8243.

[28] Sebastiani F. L. ,Farrell L. B. ,Schuler M. A. , et al. Complete sequence of a cDNA of α subunit of soybean β – conglycinin [J] . Plant Molecule Biology,1990,15;197 – 201.

[29] Bray E. A. ,Naito S. ,Pan N – S, et al. Expression of β – subunit of β – conglycinin in seeds of transgenic plants [J]. Planta, 1987,172;364 – 370.

[30] Lessard P. A. ,Allen R. D. ,Bernier F. , et al. Multiple nuclear factors interact with upstream sequence of differentially regulated β – conglycinin gene[J]. Plant Molecule Biology,1991 ,16;397 – 413.

[31] Naito S. ,Dube P. H. ,Beachy R. N. Differential expression of conglycinin α' and β subunit genes in transgenic plants [J]. Plant Molecule Biology,1988 ,11;109 – 123.

[32] Doyle J. J. ,Schuler M. A. ,Godette W. D. , et al. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*; structural homologies of genes and proteins [J]. Biology Chem,1986 , 261;9228 – 9238.

[33] Lycett G. W. ,Delauney A. J. ,Gatehouse J. A. , et al. The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L.) :a complete cDNA coding sequence for preprovicilin [J] . Nucleic Acids Research, 1983 , 11;2367 – 2380.

[34] Medeiros J. S. Characterization of the subunit of β – conglycinin and the application of ELISA to the determination of β – conglycinin and glycinin in soybean[M]. Ph. D. Thesis,Prudue University, West Lafayette, Indiana,1982.

[35] Barker S. J. ,Goldberg R. B. β – conglycinin gene sequences differentially program tobacco endosperm and embryo expression patterns[J]. Cell Biochem. Suppl,1991 ,15A ;87.

[36] Fujiwara T. ,Hirai M. Y. ,Chino M. , et al. Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia[J]. Plant Physiology,1992 ,99;263 – 268.

[37] Chen Z L. ,Pan N S. ,Beachy R. N. A DNA sequence element that confers seed – specific enhancement to a constitutive promoter[J]. Embo J,1988 ,7;297 – 302.

[38] Chen Z L. ,Schuler M. A. ,Beachy R. N. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo specific gene [J]. Proceedings National Academy Science. USA,1986 ,83;8560 – 8564.

[39] Lessard P. A. ,Allen R. D. ,Fujiwara T. et al. Upstream regulatory sequences from two β – conglycinin genes[J]. Plant Molecule Biology,1993 ,22;873 – 885.