

小麦淀粉合酶基因 II 克隆及反义和 RNAi 载体构建

康国章¹, 岳彩凤¹, 官春云^{1,2}, 韩巧霞¹, 郭天财¹, 朱云集¹, 王永华¹

(1. 河南农业大学国家小麦工程技术研究中心, 河南 郑州 450002; 2. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 461012)

摘 要: 采用 RT-PCR 方法从小麦品种豫教 2 号的籽粒中克隆出淀粉合酶 II 基因(Starch synthase II, SS II)部分 cDNA 片段(600bp) (GenBank No. EF221761), 同源性比较结果显示, 它与 GenBank 上已报道的 SS II 基因有高度同源性。以 pCMBIA1301 质粒为基础, 构建了由 35S 启动子调控的 SS II 基因的反义表达载体 pCMBIA1301SSIIA; 另外, 还以 pFGC5941 质粒为基础, 构建了 SS II 基因的 RNAi 载体 pFGC5941SSIIsa, 这些载体的构建为研究此基因的功能奠定了基础。

关键词: 普通小麦; 淀粉合酶基因 II; 表达载体

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)01-0109-06

淀粉是大多数作物(如稻麦、薯类等)种子与块茎的主要组成部分。作物中淀粉由直链淀粉(Amylose)和支链淀粉(Amylopectin)两大类组成。其合成过程主要在 ADPG 焦磷酸化酶(Adenosine 5' diphosphate glucose pyrophosphorylase, AGPase)、淀粉合酶(Starch synthase, SS)、淀粉分支酶(Starch-branching enzyme, BE)及淀粉去分支酶(Starch de-branching enzyme, DBE)等的催化下进行^[1], 这些酶在淀粉合成中发挥着不同的作用。

AGPase 的作用是将来自光合作用的葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)和 ATP 转变成 ADP 葡萄糖(ADP-glucose, ADP-Glc)和 ADP, 其中 ADP-Glc 是合成淀粉的底物, 因此, AGPase 被认为是合成淀粉的限速酶。SS 是以寡聚糖为前体, ADP-Glc 作底物, 通过 α -1,4 键连接, 把 ADP-Glc 上的 Glc 连到寡聚糖上, 形成直链淀粉或分支淀粉的延伸分支链。根据在提取液中与淀粉粒的结合程度, SS 分为颗粒结合淀粉合酶(Granule bound starch synthase, GBSS)与可溶性淀粉合酶(Soluble starch synthase, SSs)。BE 具有双重功能: 一方面它能切开以 α -1,4 糖苷键连接的葡聚糖(包括直链淀粉或支链淀粉的直链区), 另一方面它又能把切下的短链通过 α -1,6 糖苷键连接于受体上。由于能够在葡聚糖链上引入 α -1,6 糖苷键, 故此酶被认为影响了植物淀粉的精细结构。DBE 的主要作用是特异水

解淀粉中的 α -1,6 糖苷键, 在淀粉合成中起最后修饰作用^[2]。

GBSS 主要参与了直链淀粉的合成, 它是研究最多的淀粉合酶, 禾谷类的 Waxy 蛋白属于这种酶^[3]。SSs 则主要参与了支链淀粉中分支链的合成, 它有许多同工酶。如玉米的 SSs 分为 zSSI, zSSIIa 和 zSSIIb, 马铃薯的 SSs 也至少有 SI、SSII 和 SSIII 3 种^[4]。每一种可溶性 SSs 在支链淀粉的合成中也发挥着不同作用。玉米的 SSI 与 DP (Polymerization, 葡糖聚体)6-15 的短链合成有关, SSIIa 参与了 DP >24 的长链合成; 马铃薯的 SSIII 催化了与 DP25-35 的长链合成, 而 SSII 在中等长度的支链淀粉合成中起着其它 SS 所不能替代的作用^[5]。

但有关小麦中 3 种类型 SSs 各自的功能研究尚未见报道。为此, 我们从小麦籽粒中克隆出了 SSII 基因的 cDNA 部分片段, 采用反义 RNA (Antisense RNA, asRNA) 和 RNAi 干扰技术, 将克隆现小麦 SSII 基因构建了反义表达载体和 RNAi 干扰载体, 希望为研究 SSII 在小麦淀粉合成中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RNA 的取样: 提取超高产大粒型品种豫教 2 号花后 20 d 的籽粒 RNA。

收稿日期: 2007-03-26
基金项目: 中国博士后科学基金(第三十九批); 河南省教育厅自然科学基金(2006210007)
作者简介: 康国章, 男, 博士, 从事作物分子生理研究。E-mail: zkangg@163.com。
通讯作者: 郭天财, 男, 博士生导师, 从事作物生理研究。E-mail: gtmzx-guo@371.net。

质粒及菌株:pMD20-T 购于大连宝生物公司,表达载体 pBI121、pCMBIA1301、RNAi 干扰载体 pFGC5941 与大肠杆菌 DH5 α 等菌株均由湖南农业大学作物基因工程省重点实验室保存。

酶及主要试剂:MMLV 逆转录酶、T₄ 连接酶和 *Asc* I、*EcoR* I、*Hind* III、*Nco* I、*Sac* I、*Sma* I、*Xba* I 等限制性内切酶均购于 MBI 公司。Taq DNA Polymerase 购于上海生工生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 的提取及 RT-PCR RNA 的提取:在豫教 2 号小麦品种灌浆中期(花后 20 d 左右),取 0.5 g 幼嫩的籽粒,置于研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用 Sigma 公司生产的 Trizol 提取总 RNA。

RT-PCR:cDNA 合成参照 MBI 公司生产的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 实验操作步骤进行。将离心管置于冰上,加入 1 μ g 总 RNA、2 μ L Oligod(T)₁₈和 9 μ L DEPC H₂O,70℃ 5 min,轻离心,加入 4 μ L 反应缓冲液(5 $\times$)、2 μ L dNTPs 和 1 μ L RNA 酶抑制剂,混匀,37℃ 5 min,最后加入 1 μ L 反转录酶 M-MLV (200 U/ μ L),混匀后置于 PCR 仪中,42℃ 恒温反应 1 h,70℃ 灭活 10 min,cDNA 置于-20℃ 下保存。

1.2.2 SS II 基因的克隆 参照 Hukman 等^[6]克隆 SS II 基因 cDNA 片段所设计的引物(引物由北京奥科生物技术有限公司合成):

Sense primers: 5'-GGTTGTGGTACC AAG-GTATG G-3'

Antisense primers: 5'-CCGTATGATGTCGT-GAAGCC-3'

PCR 扩增体系:在每个 0.2 mL 离心管中加入 3 μ L PCR 缓冲液(10 $\times$)、0.6 μ L dNTPs (10 mmol/L)、1 μ L Sense primers (10 μ mol/L)、1 μ L Antisense primers (10 μ mol/L)、2 μ L cDNA 模板、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(2 U/ μ L)及 21.9 μ L 无菌双蒸水。

PCR 扩增程序:95℃ 变性 5 min,30 循环:95℃ 50 s,55℃ 1 min,72℃ 2.30 min,最后在 72℃ 下延伸 10 min。

1.2.3 SS II cDNA 部分基因片段序列的测定 将获得的 SS II 与 pMD20-T 连接后,转化大肠杆菌 DH5 α ,经菌落 PCR 扩增,及对质粒进行 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,最终鉴定为阳性的单克隆,送至上海英骏公司测序,cDNA 阳性克隆命名为 pMD20-T

-SS II。

1.2.4 SS II 反义表达载体(pCMBIA1301GSS II)的构建 在所克隆的 SS II 片段中,在约 400 bp 处有 *EcoR* I 酶切位点,据此位点,对上述 pMD20-T-SS II 重组质粒进行酶切鉴定分析,以判断 SS II 在 pMD20-T 上是正向插入或是反向插入。

在构建反义载体过程中,首先对本实验室所拥有的 pCMBIA1301 载体进行改造,从 pBI121 载体上用 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切,切下 35S 启动子和 NOS 终止子及中间的 GUS 基因,把此片段连到经同样双酶切的 pCMBIA1301 载体上(pCMBIA1301),即在 pCMBIA1301 载体的多克隆位点上加了启动子和终止子,便于外源基因的插入。此改造的载体不仅利用了 pCMBIA1301 的多克隆位点,还保留了 GUS 报告基因,这可以利用 GUS 染色法对以后的转基因植株进行方便和快速的初步检测。

在本实验中,通过酶切鉴定出 SS II 反向插入到 pMD20-T 后,用 *Xba* I 和 *Sac* I 对 pMD20-T-SS II 质粒进行双酶切,对切下的 SS II 基因和经同样双酶切的 pCMBIA1301 改造载体,用 T₄ 连接酶进行连接,构建了 SS II 反义表达载体 pCMBIA1301SS II A(图 1),并酶切鉴定。

1.2.5 SS II 基因干扰载体(pFGC5941SS II sa)的构建 为了便于构建 RNA 干扰载体,我们根据 RNA 干扰载体 pFGC5941 内切酶位点的序列在上述引物两端分别加入相应的内切酶位点。当 SS II 片段正向连到 pFGC5941 载体上时,在上述 sense primers 和 antisense primers 的 5' 端分别加上 *Nco* I (GGCGC GCC)和 *Asc* I (CCATGG)内切酶位点序列,以上述 pMD20-T-SS II 重组质粒进行扩增,并将扩增的片段回收后,再次连到 pMD20-T 上,并用 *Nco* I 和 *Asc* I 从质粒上双酶切切下 SS II 目的片段,连到经同样双酶切的 pFGC5941 质粒上,构建成重组质粒 pFGC5941SSs,并用 *Nco* I 和 *Asc* I 双酶切鉴定 SS II 是否连到 pFGC5941 质粒上。

当 SS II 拟反向连到上述的 pFGC5941SS II s 重组质粒上时,对测序时的 pMD20-T 重组质粒(反向连接),用 *Xba* I 和 *Sma* I 进行双酶切,切下 SS II 目的片段,连到经同样双酶切的 pFGC5941SSa 质粒上,构建成重组质粒 pFGC5941SS II sa(图 2),并用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切鉴定 SS II 是否连到 pFGC5941SS II s 上。

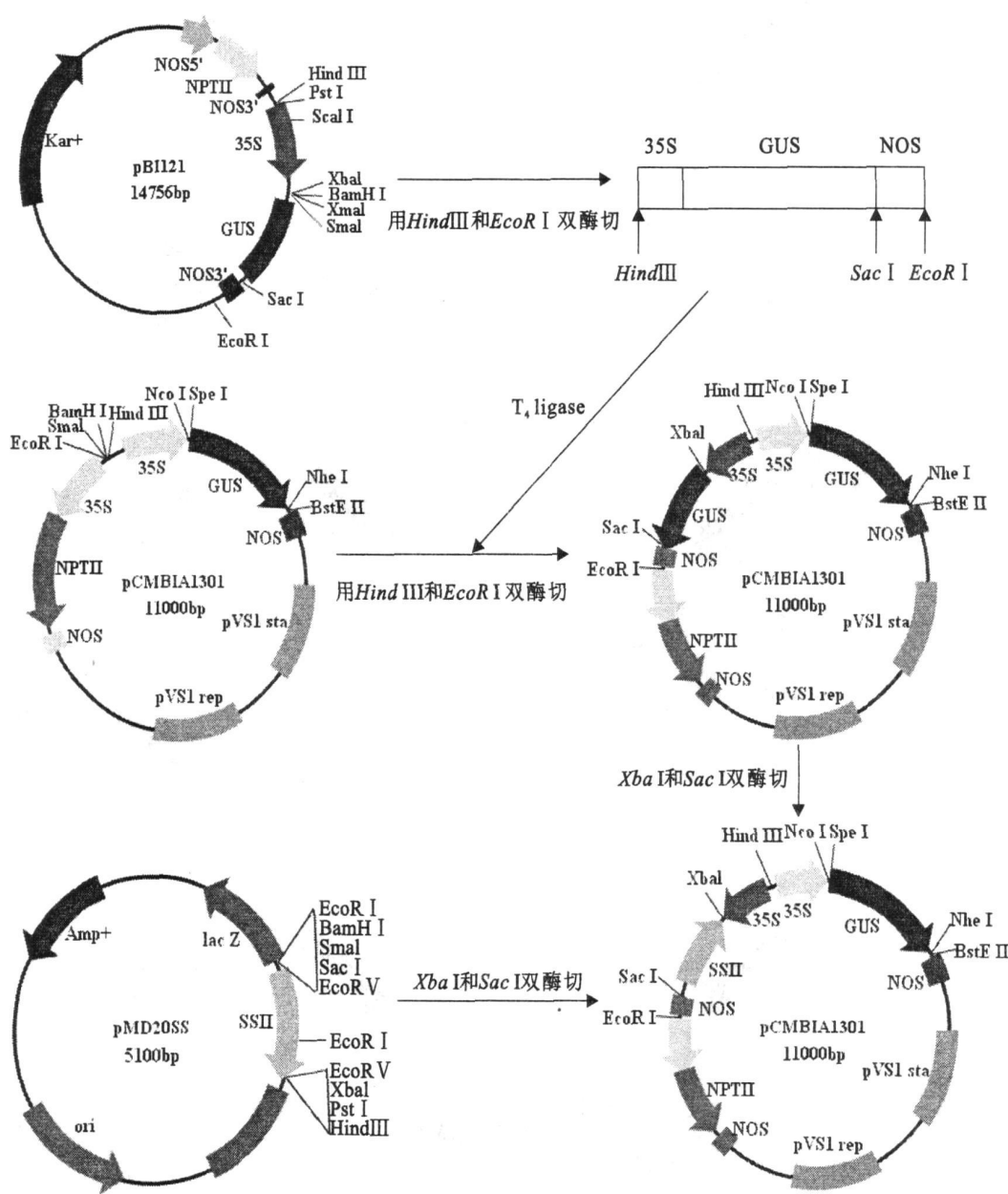


图 1 SS II 基因反义表达载体构建

Fig.1 Construction of SS II antisense expression vector

2 结果与分析

2.1 SS II 基因 cDNA 的扩增、克隆及鉴定

以提取的小麦籽粒 RNA 为模板,用方法中提供的特异引物进行 RT-PCR 扩增,得到 600 bp 左右的 DNA 片段(图 3)。扩增的 PCR 产物经纯化回收后,用 T₄ 连接酶连接到 pMD20-T,构建成重组质粒 pMD20-T-SS II,挑白斑进行菌落 PCR 扩增检测,对其中 1 个经检测无误的白斑菌进行摇菌提质粒后,对其进行 Xba I 和 Sac I 双酶切鉴定,切

出了约 650 bp 大小的片段(含有载体上内酶切位点一段序列)(图 4),证明 PCR 扩增的片段已克隆到 pMD20-T 载体上。

2.2 SS II 基因的序列及正、反向插入的酶切鉴定

测序结果表明,所克隆的小麦 SS II cDNA 片段长度约为 600 bp(在 GenBank 上登录的序列号为:EF221761)(表 1),与已克隆出的小麦 SS II 基因 AJ269502、AJ269504、AF155217、TAU66377 有 97%~99% 的同源性,与大麦的 SS II 基因 AY133249 也有 97% 的同源性(同源性比较略),表

明已克隆出了 SS II 基因的部分 cDNA 序列。

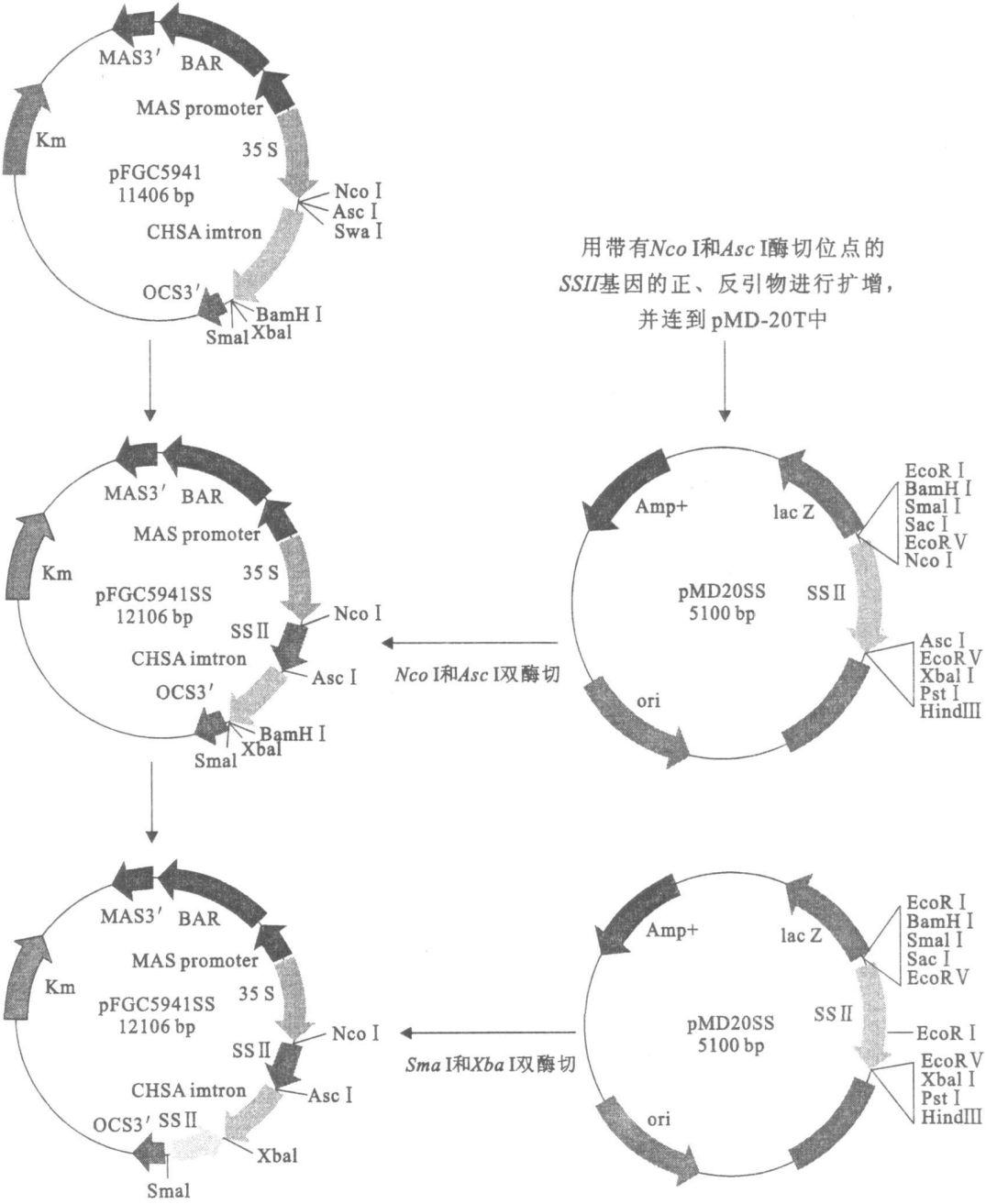


图 2 SS II 基因 RNAi 干扰载体构建

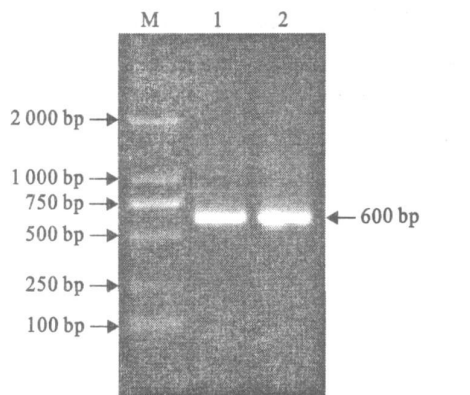
Fig.2 Construction of SS II RNAi vector

对测序结果进行分析，发现在 400 bp 有一 *EcoR* I 酶切位点(图 1 中的 pMD20SS 重组质粒)，根据 pMD20-T 上也有此位点的特点，用 *EcoR* I 对 pMD20-T-SS II 质粒进行单酶切鉴定。SS II 基因若正向插入到 pMD20-T 中，则单酶切应切出 250 bp 左右的条带；若反向插入，则应切出 470 bp 左右的条带。图 4 表明，用 *EcoR* I 对 pMD20-T-SS II 质粒单酶切，切出了 470 bp 左右的条带，表明 SS II 反向插入到 pMD20-T 载体中。

3 SS II 基因反义表达载体和 RNAi 载体的构建及酶切鉴定

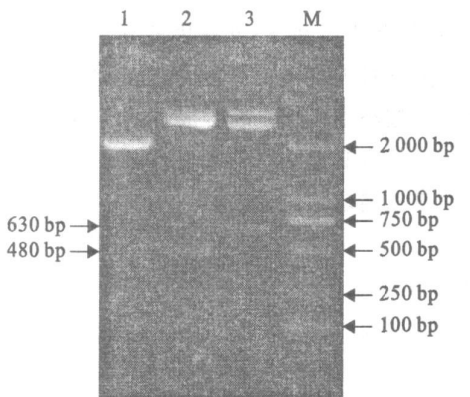
3.1 SS II 基因反义表达载体的酶切鉴定

将构建 SSII 的反义表达载体(pCMBIA1301SSIIA) (图 1)用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切，切出了 650 bp 的条带(含有一段载体上内酶切位点序列)(图 5)，表明 SS II 已反向插入到 pCMBIA1301 载体中，反义表达载体 pCMBIA1301SS II A 构建成功。



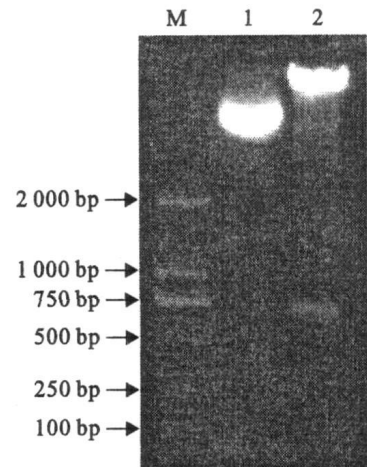
注:1 和 2 为 SSⅡ 基因; M 为 DL2000 Marker
Note: 1 and 2, SSⅡ gene; M, DL2000 Marker

图 3 小麦 SSⅡ 基因部分 cDNA 片段扩增的结果
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of SSⅡ gene



注:1. pMD20-TSSⅡ 重组质粒; 2. pMD20-TSSⅡ 重组质粒经 *EcoR*Ⅰ 单酶切的结果; 3. pMD20-TSSⅡ 重组质粒经 *Sac*Ⅰ 和 *Xba*Ⅰ 双酶切的结果; M, DL2000 Marker。
Note: 1. pMD20-TSSⅡ restructured granule; 2. pMD20-TSSⅡ restructured granule cut by enzyme *EcoR*Ⅰ ; 3. pMD20-TSSⅡ restructured granule cut by enzyme *Sac*Ⅰ and *Xba*Ⅰ ; M, DL2000 Marker.

图 4 图 4 pMD20-TSSⅡ 重组质粒经 *EcoR*Ⅰ 单酶切和经 *Sac*Ⅰ 和 *Xba*Ⅰ 双酶切的结果
Fig.4 Identification of pMD20-TSSⅡ digested with single *EcoR*Ⅰ , and both *Sac*Ⅰ and *Xba*Ⅰ



注:1 为 pCMBIA1301SSⅡ 重组质粒, 2 pCMBIA1301SSⅡ 重组质粒经 *Xba*Ⅰ 和 *Sac*Ⅰ 双酶切的结果, M 为 DL2000 Marker。
Note: 1 pCMBIA1301SSⅡ restructured granule; 2. pCMBIA1301SSⅡ restructured granule cut by enzyme *Xba*Ⅰ and *Sac*Ⅰ ; M, DL2000 Marker.

图 5 重组质粒 pCMBIA1301SSⅡ 用 *Xba*Ⅰ 和 *Sac*Ⅰ 双酶切的结果

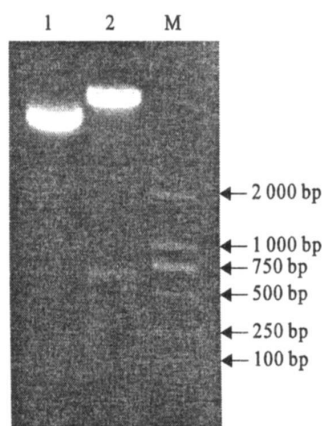
Fig. 5 Identification of pCMBIA1301SSⅡ digested with *Sac*Ⅰ and *Xba*Ⅰ

3.2 SSⅡ 基因 RNAi 干扰载体(pFGC5941SSⅡ_{sa}) 的酶切鉴定

用分别带有 *Nco*Ⅰ 和 *Asc*Ⅰ 酶切位点的 SSⅡ 基因的 Sense primers 和 Antisense primers 引物,以 pMD20-TSSⅡ 重组质粒为模板,进行扩增,也扩增出了两端带有 *Asc*Ⅰ 和 *Nco*Ⅰ 位点的目的片段(电泳图略)。把此片段扩增又亚克隆到 pMD20-T 上,用 *Nco*Ⅰ 和 *Asc*Ⅰ 进行双酶切,切下的片段连到经同样双酶切的 pFGC5941 干扰载体上,构建成重组质粒 pFGC5941SSⅡ_s。对此重组质粒进行 *Nco*Ⅰ 和 *Asc*Ⅰ 双酶切,切出了 640 bp(含有内切酶序列)的条带(图 6),表明 SSⅡ 基因正向连到 pFGC5941 载体上。

表 1 已克隆出的小麦 SSⅡ 基因的 cDNA 序列
Table 1 Cloned sequences of SSⅡ gene in wheat plants

AGGAAGCCTA	CGATGTCGGA	GTCCGAAAAT	ACTACAAGGC	TGCTGGACAG	GATATGGAAG
TGAATTATTT	CCATGCTTAT	ATCGATGCAG	TTGATTTTGT	GTTCATTGAC	GCTCCTATCT
TCCGACACCG	TCAGGAAGAC	ATTTATGGGG	GCAGCAGACA	GGAAATTATG	AAGCGCATGA
TTTTGTTCTG	CAAGGCCGCT	GTCGAGTTTC	CTTGGCACGT	TCCATGCGGC	GGTGTCCCTT
ATGGGGATGG	AAATCTGGTG	TTTATTGCAA	ATGATTGGCA	CACGGCACTC	CTGCCTGTCT
ATCTGAAAGC	ATATTACAGG	GACCATGGTT	TGATGCAGTA	CACTCGGTCC	ATTATGGTGA
TACATAACAT	CGCGCACACG	GGCCGTGGCC	CAGTAGATGA	ATTCCCGTTC	ACCGAGTTGC
CTGAGCACTA	CCTGGAACAC	TTCAGACTGT	ACGACCCCGT	GGGTGGTGAG	CACGCCAACT
ACTTCGCCGC	CGGCCTGAAG	ATGGCGGACC	AGGTTGTCGT	GGTGAGCCCC	GGGTACCTGT
GGGAGCTCAA	GACGGTGGAG	GGCGGCTGGG	GGCTTCACGA	CATCATACGG	AATCGTCGAC

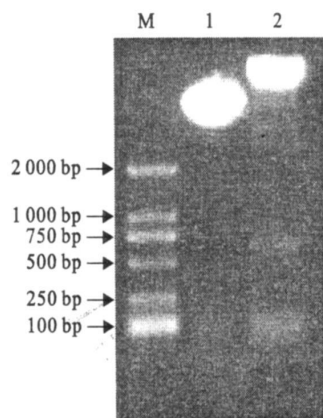


注:1. pFGC5941SSII s 重组质粒;2. pFGC5941SSII s 重组质粒经 *Nco* I 和 *Asc* I 双酶切的结果;M 为 DL2000 marker

Note: 1, pFGC5941SSII s restructured granule; 2, pFGC5941SSII s restructured granule cut by enzyme *Nco* I and *Asc* I; M, DL2000 marker.

图 6 重组质粒 pFGC5941SSII s 经 *Nco* I 和 *Asc* I 双酶切的结果

Fig. 6 Identification of pFGC5941SSII s digested with *Nco* I and *Asc* I



注:1. pFGC5941SSII sa 重组质粒;2. pFGC5941SSII sa 重组质粒经 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切的结果;M 为 DL2000 Marker

Note: 1, pFGC5941SSII sa restructured granule; 2, pFGC5941SSII sa restructured granule cut by enzyme *Sma* I and *Xba* I; M, DL2000 marker.

图 7 重组质粒 pFGC5941SSII sa 经

Sma I 和 *Xba* I 双酶切的结果

Fig. 7 Identification of pFGC5941SSII sa digested with *Sma* I and *Xba* I

对 SS II 基因反向插入的 pMD20-TSS II 重组质粒,用 *Sma* I 和 *Xba* I 进行双酶切,切下的片段用 *T*₄ 连接酶连接到上述经同样双酶切的 pFGC5941SSs 重组质粒上,构建成 SS II 基因的

RNAi 干扰载体 pFGC5941SSsa。同样,用 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切此重组质粒,切下了 630 bp 的条带(含有内切酶序列)(图 7),表明 SS II 基因已反向插入到 pFGC5941SSs 重组质粒中,SS II 基因 RNAi 干扰载体 pFGC5941SSsa 构建成功。

3 讨 论

在不同作物中,SS II 的功能可能不同^[5,7],如玉米的 SS II 参与了支链淀粉长链的合成,马铃薯的 SS II 在中等长度的支链淀粉合成中发挥着重要功能。但有关小麦的 SS II 基因在支链淀粉中的功能尚未见报道。本实验克隆了 SS II 基因的部分序列,并构建了此基因的反义表达载体和 RNAi 干扰载体,下一步的实验内容是把这两种载体导入到小麦中,可降低或抑制 SS II 基因的表达,通过分析转基因小麦籽粒内支链淀粉组分的变化来研究 SS II 基因在调控小麦支链淀粉合成中的作用。

(注:本实验部分工作在湖南农业大学作物基因工程省重点实验室完成。)

参 考 文 献:

- [1] Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants; rice endosperm as a model tissue[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 718—725.
- [2] Tetlow I J, Morell M K, Emes M J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants[J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(406): 2131—2145.
- [3] Edwards A, Vincken J P, Suurs J P, et al. Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in pea[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 1767—1785.
- [4] Kossmann J, Abel G J W, Wpringer F, et al. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue[J]. *Planta*, 1999, 208: 503—511.
- [5] Edwards A, Fullon D C, Hylton C M, et al. A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers[J]. *Plant J*, 1999, 17: 251—261.
- [6] Hurkman W J, McCue K F, Altenbach S B, et al. Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm[J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 873—881.
- [7] Myers A M, Morell M K, James M G, et al. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 989—997.

(英文摘要下转第 123 页)

[11] 蔡妙珍, 罗安程, 林咸永, 等. Ca^{2+} 对过量 Fe^{2+} 胁迫下水稻保护酶活性及膜脂过氧化的影响[J]. 作物学报, 2003, 29(3): 447—451.

[12] 赵可夫. 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性的对策[J]. 植物学通报, 1997, 14(增刊): 235—240.

[13] 曹 让, 梁宗锁, 武永军. 分根交替渗透胁迫下玉米幼苗叶片中游离氨基酸的变化[J]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(1): 49—54.

[14] Shen L M, David M, Joyce G F. Influence of drought on the concentration and distribution of 2, 4-diamino-butyric acid and other free amino acids in tissues of flatpea (*Lathyrus sylvestris* L.)[J]. *Enviro Expt Bot*, 1990, 30: 497—504.

[15] Gossett D R, Millhollon E P, Lucas M C. Antioxidant response to NaCl in salt-tolerant and Salt-sensitive cultivars of cotton[J]. *Crop Science*, 1994, 34: 706—714.

[16] Liang Y C, Chen Q, Liu Q, et al. Exogenous silicon (si) increase antioxidant enzyme activity and reduce lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160: 1157—1164.

[17] 陈华新, 李卫军, 安沙舟, 等. 钙对 NaCl 胁迫下杂交酸模幼苗叶片光抑制的减轻作用[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 449—454.

Effect of calcium on protective enzymes activeness and physiological characteristics of maize seedlings under salt stress

WANG Yu-feng, WANG Qing-xiang, SHANG Li-wei

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: A solution culture was conducted to study the effect of Ca^{2+} on the growth of maize seedlings, chlorophyll content, free amino acids content, the activeness of several protective enzymes and other physiological characteristics. The results show that the Ca^{2+} concentration at 4 mmol/L could obviously increase plant growth and restrain the decrease of chlorophyll content reduced permeability of cell membrane, and enhance SOD and POD activity in leaves and roots. With the increase of Ca^{2+} concentration, the CAT activeness in roots was increased but that in leaves was decreased. The free amino acids and soluble protein content in roots increased in terms of 2~4 mmol/L of Ca^{2+} concentration but decreased in that of 6 mmol/L. Soluble protein in leaves was decreased with the increase of Ca^{2+} concentration. The above results suggested that the appropriate Ca^{2+} supply can enhance the salt tolerance in maize growing in salt stress.

Keywords: calcium; salt stress; maize; protective enzymes activeness; membrane permeability

(上接第 114 页)

Molecular cloning of starch synthase II partial sequences and construction of its antisense and RNAi expression vectors

KANG Guo-zhang¹, YUE Cai-feng¹, GUAN Chun-yun^{1,2}, HAN Qiao-xia¹,
GUO Tian-cai¹, ZHU Yun-ji¹, WANG Yong-hua¹

(1. National Engineering Research Centre for Wheat, Henan Agricultural university, Zhengzhou 450002;

2. Agronomy of Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410012, China)

Abstract: Starch synthase II (SS II) partial cDNA sequences (600bp) (GenBank No. EF221761) from grains of common wheat (*Triticum aestivum*, Yujiao 2 cultivar) was amplified by RT-PCR. The result demonstrated that the cloned SS II gene sequences were 99% identified with the reported SS II genes in GenBank previously. In addition, its antisense expression vector was constructed with pCMBIA1301, and RNAi vector was also constructed with pFGC5941. These constructed vectors will provide a good background to study the function of SS II on biosynthesis of starch in wheat plants.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*); starch synthase II gene; expression vectors