

植物基因打靶技术及其应用

陈莹, 彭晓珏, 官杰, 李绍波, 余潮, 朱友林*

(江西省分子生物学与基因工程重点实验室, 南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031)

摘要: 对植物基因打靶技术的原理、操作程序、打靶效率的影响因素及其在植物中的应用现状进行了综述, 并就如何有效地提高打靶效率提出了建议, 同时对该技术在植物学研究领域中的应用前景进行了展望。

关键词: 植物; 基因打靶; 技术应用; 综述

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.06.019

Gene Targeting and Its Applications in Plants

CHEN Ying, PENG Xiao-jue, GUAN Jie, LI Shao-bo, YU Chao, ZHU You-lin*

(Key Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering of Jiangxi Province, School of Life Science and Food Engineering of Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The principles, operating procedures and update of progress of gene targeting in plants, as well as factors that affect efficiency of gene targeting were reviewed. In addition, some advices on improving targeting efficiency were introduced and the application prospects of gene targeting in botany research were respected.

Key words: Plant; Gene targeting; Application; Review

基因打靶(gene targeting)是指将外源 DNA 分子与受体生物基因组中的同源序列之间发生同源重组, 并整合到预定位点, 进而改变生物体遗传特性的技术手段^[1]。该技术具有定位性强、精确度高, 且不需要考虑基因的大小及转录活性等特点, 为生命科学的研究提供了强有力的工具。美国科学家 Mario Capecchi^[1]、Oliver Smithies^[2]和英国科学家 Martin John Evans^[3]等用基因打靶技术研究了如何利用基因控制小鼠(*Mus musculus*)胚胎细胞, 为人类攻克某些疾病提供了药物试验的动物。他们因此共同分享了 2007 年度的诺贝尔生理学 and 医学奖^[4]。

自 1978 年 Hinnen 等^[5]首次运用基因打靶技术成功将 *Leu2* 基因插入到 *leu2⁻* 型株系酵母菌中获得了 *LEU2⁺* 型转基因酵母菌以来, 基因打靶技

术先后在哺乳动物和高等植物中得到了成功的应用和发展。1987 年 Evans 等首先利用基因打靶技术修饰改造了小鼠次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因(*Hprt*)^[3], 以后随着小鼠胚胎干细胞技术的成熟, 基因打靶技术开始广泛应用于高等哺乳动物基因功能的研究^[6]。同时随着植物遗传转化技术特别是农杆菌介导转化方法的成熟与发展^[7], 也促进了基因打靶技术在植物中的应用。1988 年 Paszkowski 等^[8]对 *APHII* 基因缺失的烟草原生质体进行基因修复, 标志着基因打靶技术正式迈入植物功能基因研究领域^[9]。

1 植物基因打靶的原理

与微生物、动物基因打靶一样, 植物基因打靶

收稿日期: 2012-04-18 接受日期: 2012-06-30

基金项目: 江西省科技厅农业公关项目(20061B0203105); 江西省教育厅重大项目(赣教技字 2005-47 号); 江西省青年科学基金项目(20114BAB214009) 资助

作者简介: 陈莹, 男(1985~), 硕士, 研究方向为植物发育遗传学。E-mail: chenying26@ncu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ylzhu1999@yahoo.com.cn

技术的分子生物学基础同样源自 DNA 同源重组。同源重组是指发生在 DNA 同源序列之间、有相同或近似碱基序列的 DNA 分子之间的遗传交换。在基因打靶过程中,外源 DNA 分子主要通过两种方式整合到基因组中:同源重组和随机重组。原核生物及低等真核生物(如酵母菌)中,基因重组几乎都是以序列依赖性同源重组进行,因此,对其进行基因打靶,外源 DNA 片段可以精确插入同源区域;而包括植物在内的高等真核生物, DNA 重组主要以非同源重组进行。因此,对于高等真核生物而言,外源 DNA 分子通常是以随机重组方式整合到基因组中。哺乳动物基因打靶中,外源 DNA 分子发生随机整合的频率大约是同源重组频率的 30~40000 倍^[10]。由此可见,较低的同源重组频率是高等真核生物进行基因打靶所面临的最大困难。

2 植物基因打靶的操作步骤

植物基因打靶类似于植物转基因技术,大致可分为 4 个步骤。

2.1 打靶载体的构建

植物基因打靶载体中的重组交换区域常由靶基因的同源序列以及正负选择标记基因两部分构成^[11]。

作为基因打靶研究的起始步骤,外源打靶 DNA 片段的设计和构建对打靶效率有较大影响。根据研究目的的不同,运用基因插入、替换、删除、修饰等方法对靶基因重要的功能区域进行改造,使设计的外源 DNA 片段既能够突变靶基因又能与靶基因有较高同源性。同时在载体的设计与构建过程中还要考虑合理的重组细胞筛选方法。目前,植物基因打靶研究中使用的筛选策略是由 Mansour 等^[12]提出的正负选择标记基因。

传统基因打靶载体的构建主要是通过 PCR、酶切和酶联等分子克隆技术实现^[13],操作较为繁琐。而 Red/ET 重组技术的出现为简单、快速、高效地构建打靶载体提供了强有力的支撑^[14]。该技术是一类以 γ 噬菌体 Red 操纵子或者 Rac 噬菌体 RecE/RecT 重组系统为基础的基因工程技术,在大肠杆菌染色体等基因的遗传修饰研究中应用广泛^[15]。

2.2 打靶载体的转化

外源 DNA 分子转化方法也会影响打靶效率,这是打靶研究的关键步骤之一^[16]。外源 DNA 分子导入植物受体细胞的方法有多种。按照导入方式可以分为 3 大类:第一类是以载体为媒介的转化法,常见的是农杆菌介导和病毒载体介导的转化;第二类是外源 DNA 分子的直接转化法,主要包括基因枪轰击、显微注射、电激等物理方式导入和 PEG 法、脂质体介导等化学方式诱导;第三类是种质系统介导法,主要是花粉管通道法。由于农杆菌转化的高效性,在植物基因打靶研究中,外源基因转化多采用农杆菌介导的转化方式。

2.3 同源重组细胞的筛选

好的筛选策略可以减轻植物基因打靶研究的工作量并且对打靶效率产生积极影响^[16],因此建立有效的筛选体系具有重要的意义。目前,最广泛应用的重组细胞筛选方法仍是正负选择标记基因法,它是 Terada 等对水稻(*Oryza sativa*) *Waxy* 基因打靶时采用的^[17]。它是将一个正向选择标记基因插入载体同源序列中一个外显子区域,并且在设计载体时,一般将正向选择标记基因设计在决定靶基因功能最关键的外显子部位^[18],或者通过同源重组将靶基因最重要的功能位点直接删除^[19],达到彻底失活靶基因的目的。转化使正向选择标记基因表达并利用相应的筛选培养基进行筛选,判断载体是否成功整合至受体生物基因组上。该整合包括了同源重组和随机整合 2 种形式。为了最大限度提高同源重组细胞的富集,又在载体中加入了一个或若干个表达致死效果的负向选择标记基因^[17,20]。若发生非同源重组,则负向选择标记基因将随载体共同整合至受体生物基因组,结果使负向选择标记基因表达而导致受体细胞死亡。反之,通过筛选培养就可以富集大量的打靶细胞。植物基因打靶中,最早使用的正向选择标记基因主要有新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因(*hprt*)、单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因(*Hsv-tk*)等^[21]。以后陆续开发了抗潮霉素基因(*hpt*)、抗卡那霉素基因(*nptII*)等抗性基因和非抗性基因,如绿色荧光蛋白基因(*GFP*)、 β -葡萄糖苷酸酶基因(*GMS*)等。而常见的负向选择标记基因主要有大肠杆菌的 *codA* 基因以及白喉毒素 A 基因(*DT-A*)。

2.4 中靶植株的鉴定

提取分化的转基因植株 DNA, 分别在受体细胞基因组序列和载体同源序列上设计 1 条特异性 PCR 引物, 若能扩增出预期大小的片段, 就可初步鉴定为中靶植株, 再通过基因测序及 Southern 杂交等方法可以确认中靶植株^[22]。

3 影响植物基因打靶效率的因素

高等植物细胞中同源重组效率低, 是因为绝大多数情况下外源 DNA 分子都是以随机整合的方式插入基因组中, 同时外源 DNA 分子转化效率也有影响, 因此要提高基因打靶的成功率就只有依赖大量受体细胞的使用。转化和筛选阶段的巨大工作量, 给基因打靶技术在植物中的应用带来不便。因此, 了解影响植物基因打靶效率的因素就显得尤为重要。目前认为靶基因在基因组中的位置和拷贝数、打靶载体的类型和同源序列长度、转化受体的类型和状态等, 均对植物基因打靶效率有较大影响。

3.1 靶基因的位置和拷贝数

起初, 植物基因打靶的靶基因是经人工修饰过的含有缺失功能片段的基因, 一般为抗性基因, 如新霉素抗性基因(*nptII*)和潮霉素抗性基因(*hpt*)。Risseeuw 等^[23]构建了 *nptII* 缺失片段的打靶载体, 以农杆菌介导法对部分 *nptII* 缺失的转基因烟草叶原生质体进行打靶, 获得了 1 株精确打靶的有新霉素抗性的重组烟草(*Nicotiana tabacum*)植株; 而 Halfter 等^[22]构建了 *hpt* 缺失片段的打靶载体, 以同样的转化方法对部分 *hpt* 缺失的转基因拟南芥植株进行打靶, 得到了 4 株精确打靶的有潮霉素抗性的重组植株。值得注意的是, 这些靶基因都是经人工修饰后通过转基因技术随机整合至基因组中的, 故各靶基因在基因组中的位置并不相同。Halfter 等的研究表明, 靶基因在基因组中位置的不同可能对打靶结果有影响。当靶基因处于活跃的转录区时, 对打靶效率的提高或许有积极的影响。这提示我们尽可能多地了解靶基因在基因组中所处的位置信息, 将有助于打靶研究的成功。

除了靶基因在基因组中的位置外, 靶基因的拷贝数也会对打靶效率产生影响。Halfter 等^[22]对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的打靶研究表明, 单拷贝

靶基因位点的打靶效率要高于多拷贝靶基因位点的打靶效率。同样的结论也出现在 Risseeuw 等^[23]对烟草的打靶研究中。针对这一现象, 其中较合理的一种解释是当对多拷贝基因位点进行基因打靶时, 由于其他拷贝基因的补偿效应, 导致中靶表型突变不明显而产生中靶基因沉默现象, 从而造成基因打靶失败。由此我们可以从中得出结论, 当对未知的植物功能基因进行打靶研究时, 优先考虑单拷贝基因可以有效的避免基因打靶的不确定性因素。

3.2 打靶载体的类型和载体中同源序列的长度

在植物基因打靶中较为常用的载体主要有插入型和置换型两大类。Hasty 等^[24]以 *Hprt* 基因比较这两种类型打靶载体的重组效率, 认为当同源序列长度相等时, 插入型载体的同源重组效率约是置换型载体的 9 倍。同时, Hasty 等还报道采用置换型载体所得到的同源重组产物中依然存在基因插入的产物。

在植物基因打靶中, 载体中游离末端的存在对提高打靶效率具有十分重大的意义^[25]。插入型载体一般在同源序列区域内部发生线性化, 形成两个相邻的游离末端; 而置换型载体的线性化则一般发生在同源序列两侧, 产生两个不相邻的游离末端。相邻的游离末端比不相邻的游离末端更有利于染色体进行交换, 这在酵母^[26]的基因打靶中已得到证实。此外, 与插入型载体相比, 置换型载体中的同源序列部分因为插入了正向选择标记基因而失去功能。由于外源 DNA 序列的存在会降低同源重组的效率, 所以这可能是插入型载体发生同源重组效率高于置换型载体的原因。

打靶载体中同源序列的长度及比例对打靶效率也有明显影响。动物基因打靶中, 能够发生同源重组的最小同源序列长度为 30~40 bp。当同源序列长度为 295~1800 bp 时, 同源重组的效率与同源序列的长度呈正比; 而当同源序列的长度小于 200 bp 时, 同源重组的效率显著下降^[27]。但植物基因打靶研究中还鲜见相关报道。植物基因打靶使用的同源序列长度约为 300~2000 bp, 平均打靶效率也比动物的低, 约为 10^{-5} 。

Miao 等^[28]用长度约为 7 kb 的同源序列作为打靶载体, 对拟南芥的 *TGA3* 基因进行打靶, 结果同

源重组效率约为 3.9×10^{-4} , 同源重组效率并没有得到显著提高^[29-30]。而 Thykjaer 等^[31]使用的打靶载体的同源序列长度为 22.9 kb, 结果同源重组效率却只有 5.3×10^{-5} 。由此看来, 在植物基因打靶中, 仅增加同源序列长度不一定能够提高同源重组效率。这与动物基因打靶研究的结论相吻合^[12]。

当打靶载体的左右同源序列长度足够长时, 两同源序列的长度比例对打靶效率也会有一定的影响。动物打靶研究中, 如果打靶载体的左右同源序列长度相差过大会显著影响打靶效率^[32]。植物基因打靶研究也有类似结论。Risseuw 等^[23]对烟草的打靶研究中, 打靶载体的左右同源序列的长度分别为 3.5 kb 和 610 bp, 结果同源重组效率明显降低。而 Terada 等^[17]对水稻 *Waxy* 基因的打靶研究中, 打靶载体的左右两同源序列长度分别为 6.3 kb 和 6.8 kb, 结果打靶效率提升至 1%。打靶载体的同源序列长度相近且足够长也许是打靶效率提高的重要原因, 同时这可能成为今后植物基因打靶载体设计的一个发展方向。

3.3 转化受体的类型和状态

Ohl 等^[33]利用植物原生质体进行基因打靶研究, 打靶效率为 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 。由于培养原生质体的条件苛刻, 限制了基因打靶技术的发展。植物转基因技术的成熟与发展, 极大地丰富了植物基因打靶转化受体的种类与来源。Terada 等^[17,20]以水稻成熟胚诱导出的胚性愈伤组织作为打靶受体, *Waxy* 基因和 *Adh2* 基因的打靶效率分别为 1%、2%。这些研究都是以农杆菌介导外源 DNA 分子的转化, 如果提高农杆菌转化的效率, 那么也可以在一定程度上提高基因打靶的效率。

Terada 认为愈伤组织诱导过程中散落在块状愈伤组织周围的较为松散的单体愈伤组织有利于后续的转化实验。Hiei 等^[34]也认为选择生长力旺盛的愈伤组织是农杆菌介导转化的关键起始步骤。可见, 状态优良的植物愈伤组织作为打靶受体是提高植物基因打靶效率的途径之一。

4 植物基因打靶技术的应用

4.1 植物基因功能的研究

随着基因打靶技术的日趋成熟, 其在植物内

源基因功能研究中扮演重要的角色。生物基因组中, 每个基因的特异性序列都负责编码一种或一类特异性蛋白质。这些蛋白质在植物的生命活动中究竟是作为参与生化反应所必须的酶, 还是构成机体结构的成分, 抑或是信息传递所必须的信号分子等, 要探明这些问题, 仅局限于了解编码蛋白质的特异性 DNA 序列是远远不够的。而基因打靶技术为解决上述问题提供了帮助。例如, 叶绿体基因组的序列分析虽然早已完成^[35-36], 但对叶绿体基因组中各基因的功能研究却迟迟未展开。位于叶绿体基因组单拷贝区域中的假定性叶绿体开放阅读框 (*ycf3*) 的功能在很长时间内都不清楚^[37]。直到 7 年后, Ruf 等^[38]对 *ycf3* 进行测序分析以及同源性比对后, 推测 *ycf3* 编码的是一段有功能的多肽。Ruf 等运用基因打靶技术, 以壮观霉素抗性基因 (*aadA*) 作为正向选择标记替换 *ycf3* 中的部分编码区序列, 同时用整合有 *aadA* 基因的经过修饰的 *ycf3* 为同源序列构建打靶载体, 采用基因枪法对烟草的叶肉细胞进行转化并成功获得打靶植株。通过对打靶植株进行分析, 最终证明 *ycf3* 所编码的产物是植物光系统 I (PSI) 亚单位中的聚合因子。这是世界上首例运用基因打靶技术对植物未知功能基因展开的研究。

早期植物基因打靶研究主要是针对双子叶植物, 打靶效率普遍较低, 一般为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 。2002 年日本学者 Terada 等将编码水稻直链淀粉合成酶基因 (*Waxy*) 作为靶基因进行研究, 极大地提高了打靶效率, 成为植物基因打靶中具有里程碑意义的研究^[17]。Terada 以携带有一个转录终止子的潮霉素抗性基因 (*hpt*) 作为正向选择标记, 并以两个具有强致死性的白喉毒素基因 (*DT-A*) 作为负向选择标记设计构建载体。当载体中的同源区域与靶基因之间发生同源重组时, 携带有转录终止子的正向选择标记将插入到靶基因中, 使靶基因在转录终止子的作用下发生不完全转录, 进而达到敲除靶基因的目的; 而发生非同源重组时, 载体同源序列两端的白喉毒素基因 (*DT-A*) 获得表达, 编码的白喉毒素对细胞有强烈的致死毒性, 从而将发生非同源重组的细胞杀死, 对打靶细胞起到富集作用。利用该类型载体, Terada 等成功地从 6 组独立转化株系的 638 个潮霉素抗性水稻愈伤组织中获得了 6 株打靶植

株,打靶效率为1%。2007年, Terada 等^[20]又采用相似的方法对水稻的乙醇脱氢酶基因(*Adh2*)进行打靶研究,结果成功地从468个潮霉素抗性愈伤组织中获得了9株打靶植株,将打靶效率提升到了2%。因此,基因打靶技术的打靶效率可以提高,证实了该项技术在植物基因功能研究中的可行性。

4.2 植物性状的改良

基因打靶技术也可以用于植物性状的改良。传统转基因技术培育获得的新品种由于外源DNA的随机性插入,会随着时间推移或者环境变化发生外源DNA丢失(即转基因沉默现象),无法稳定表达和遗传,最终导致转基因新品种的退化而失去栽培价值^[39]。造成转基因沉默现象的原因较多,外源DNA插入到甲基化程度高、转录活性低的位点,其表达通常会受到抑制^[40]等等。借助植物基因打靶技术,可以依据已知植物基因组信息,通过设计打靶载体的同源序列,有针对性地将优良性状相关基因引入植物基因组中的特定位点^[41-42],主动规避对外源DNA表达不利的位点,这样就有可能提高外源DNA的遗传稳定性及其表达效率,进而从分子水平上彻底改变植物的遗传特性,获得稳定遗传且具有优良性状的新品种。水稻 *Waxy* 基因编码的产物是合成小颗粒直链淀粉必须的关键酶之一,当该基因的表达量较低时,米饭糯性会提高;而表达量较高时,米饭的糯性稍差^[43]。Terada 等^[17]采用基因打靶技术将水稻品种‘日本晴’中的 *Waxy* 基因敲除,培育出了符合日本人口感的糯性水稻新品种。

在作物育种领域,植物基因打靶技术也较传统育种方式有一定的优势。虽然传统的回交方法也能够达到相同的育种目的,但由于回交培育一个近等位基因系不仅周期长、工作量大,而且还会产生连锁累赘效应,在实际生产中受到一定的限制。而运用植物基因打靶技术对靶基因进行定向改造,从而直接获得相应的突变新品种,不仅缩短培育周期,减小工作量而且还能有效的避免连锁累赘效应。例如朱剑^[44]、叶菲^[45]、黎晶晶^[46]等对粳稻保持系品种‘世锦B’(SJB) *Bel* 基因进行基因打靶,培育出苯达松敏感致死型水稻新品种。

5 展望

作为一种基因沉默技术,基因打靶发展至今约20年,尚未有该技术自身缺陷的负面研究报道,而与其相似的RNAi技术却开始暴露出自身的某些弊端。已有研究报道miRNA分子对小鼠肝脏有损害作用,进而对受体生物的健康产生负面影响^[47]。Szittyta 等^[48]的研究表明,较低的温度能够抑制烟草中siRNA的生成进而抑制RNAi介导的植物防御反应;在一些需要对家族基因中的某一成员进行沉默的研究中,miRNA分子有可能会致全体家族基因的沉默,但基因打靶技术却可以有效的针对家族基因中的某一基因进行精确改造或者修饰,因而应用范围也较RNAi技术更为广泛。

尽管基因打靶技术在植物中的应用仍然面临诸多难题,如打靶效率较低、打靶位点存在位置效应、易受非同源重组的干扰、工作量大以及人们对转基因作物的接受程度等。但是该技术在植物基因功能以及基因改良育种研究领域的优势是无可比拟的。随着科技水平的日益提高,基因打靶技术将成为植物学研究领域的强有力手段。

参考文献

- [1] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination [J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1288-1292.
- [2] Smithies O, Gregg R G, Boggs S S, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination [J]. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-234.
- [3] Kuehn M R, Bradley A, Robertson E J, et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of *HPRT* mutations into mice [J]. *Nature*, 1987, 326(6110): 295-298.
- [4] Guo X Q, Oliver Smithies [J]. *Hereditas*, 2007, 29(6): 649-650. 郭晓强, 奥利弗·史密斯 [J]. *遗传*, 2007, 29(6): 649-650.
- [5] Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(4): 1926-1933.
- [6] Kim I, Saunders T L, Morrison S J. *Sox17* dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells [J]. *Cell*, 2007, 130(3): 470-483.
- [7] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process [J]. *Part Sci Technol*, 1987, 5(1): 27-37.
- [8] Paszkowski J, Baur M, Bogucki A, et al. Gene targeting in plants [J]. *EMBO J*, 1988, 7(13): 4021-4026.

- [9] Hensel G, Himmelbach A, Chen W X, et al. Transgene expression systems in the *Triticeae* cereals [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(1): 30–44.
- [10] Bradley C K, Takano E A, Gothert J R, et al. Temporal regulation of Cre-recombinase activity in Scf-positive neurons of the central nervous system [J]. *Genesis*, 2007, 45(3): 145–151.
- [11] Shen W F, Weng H B, Niu B L, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the pathogen of *Botrytis cinerea* [J]. *Hereditas*, 2008, 30(4): 515–520.
沈卫锋, 翁宏飏, 牛宝龙, 等. 根癌农杆菌介导的灰葡萄孢菌遗传转化研究 [J]. *遗传*, 2008, 30(4): 515–520.
- [12] Mansour S L, Thomas K R, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes [J]. *Nature*, 1988, 336(6197): 348–352.
- [13] Wang J P, Zhang Y M. The application of Red/ET recombination to high efficient gene-targeting vector construction [J]. *Hereditas*, 2005, 27(6): 953–958.
王军平, 张友明. Red/ET重组在基因打靶载体快速构建中的应用 [J]. *遗传*, 2005, 27(6): 953–958.
- [14] Jamsai D, Orford M, Nefedov M, et al. Targeted modification of a human β -globin locus BAC clone using GET recombination and an *I-SceI* counterselection cassette [J]. *Genomics*, 2003, 82(1): 68–77.
- [15] Zhang Y, Muylers J P P, Rientjes J, et al. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells [OL/J]. *BMC Mol Biol*, 2003, 4(1): 1. doi:10.1186/1471-2199-4-1.
- [16] Ji Y, Li M, Jiang X L. Application of gene targeting and RNAi in fungus functional genomics [J]. *Biotechn Bull*, 2011(5): 64–70.
冀颖, 李梅, 蒋细良. 基因打靶与RNA干扰技术在丝状真菌基因功能组学中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2011(5): 64–70.
- [17] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(10): 1030–1034.
- [18] Yang X, Li C L, Xu X L, et al. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3667–3672.
- [19] Yang X, Letterio J J, Lechleider R J, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T-cell responsiveness to TGF- β [J]. *EMBO J*, 1999, 18(5): 1280–1291.
- [20] Terada R, Johzuka-Hisatomi Y, Saitoh M, et al. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(2): 846–856.
- [21] Mansour S L, Goddard J M, Capecchi M R. Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene *int-2* have developmental defects in the tail and inner ear? [J] *Development*, 1993, 117(1): 13–28.
- [22] Halfter U, Morris P C, Willmitzer L. Gene targeting in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Genet Genom*, 1992, 231(2): 186–193.
- [23] Risseuw E, Offringa R, Franke-van D M E I, et al. Targeted recombination in plants using *Agrobacterium* coincides with additional rearrangements at the target locus [J]. *Plant J*, 1995, 7(1): 109–119.
- [24] Hastay P, Rinera-Pérez J, Chang C, et al. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(9): 4509–4517.
- [25] Hastay P, Rinera-Pérez J, Bradley A. The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(6): 2464–2474.
- [26] Seidman M M. Intermolecular homologous recombination between transfected sequences in mammalian cells is primarily non-conservative [J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(10): 3561–3565.
- [27] Zhang X H, Sun Y R. The present research of gene targeting in plants [J]. *Prog Biotechnol*, 1999, 19(4): 57–61.
张秀海, 孙勇如. 植物基因打靶研究现状 [J]. *生物工程进展*, 1999, 19(4): 57–61.
- [28] Miao Z H, Lam E. Targeted disruption of the *TGA3* locus in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1995, 7(2): 359–365.
- [29] Lee K Y, Lund P, Lowe K, et al. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Cell*, 1990, 2(5): 415–425.
- [30] Offringa R, de Groot M J A, Haagsman H J, et al. Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation [J]. *EMBO J*, 1990, 9(10): 3077–3084.
- [31] Thykjaer T, Finnemann J, Schauser L, et al. Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(4): 523–530.
- [32] Thomas K R, Deng C, Capecchi M R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(7): 2919–2923.
- [33] Ohl S, Hedrick S A, Chory J, et al. Functional properties of a phenylalanine ammonialyase promoter from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1990, 2(9): 837–848.
- [34] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J*, 1994, 6(2): 271–282.
- [35] Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA [J]. *Nature*, 1986, 322(6079): 572–574.

- [36] Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its organization and expression [J]. *EMBO J*, 1986, 5(9): 2043–2049.
- [37] Shimada H M, Sugiura M. Fine structural features of the chloroplast genome: Comparison of the sequenced chloroplast genomes [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19(5): 983–995.
- [38] Ruf S, Kössel H, Bock R. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(1): 95–102.
- [39] Stam M, Mol J N M, Kooter J M. The silence of genes in transgenic plants [J]. *Ann Botany*, 1997, 79(1): 3–12.
- [40] Finnegan J, Mcelroy D. Transgene inactivation: Plant fight back [J]. *BioTechnology*, 1994, 12(9): 883–888.
- [41] Risseuw E, Franke-van D M E I, Hooykaas P J J. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome [J]. *Plant J*, 1997, 11(4): 717–728.
- [42] Britt A B, May G D. Re-engineering plant gene targeting [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(2): 90–95.
- [43] Hohn B, Puchta H. Some like it sticky: Targeting of the rice gene *Waxy* [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(2): 51–53.
- [44] Zhu J. Rice *Bel* gene: Cloning, expression pattern analysis and its transformation to tobacco [D]. Nanchang: Nanchang University, 2006: 35–50.
朱剑. 水稻*Bel*基因的克隆、表达特性分析及对烟草的转化 [D]. 南昌: 南昌大学, 2006: 35–50.
- [45] Ye F. The analysis of rice gene *Bel* heterogeneous expression characteristic and the construction of gene targeting vector [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007: 38–49.
叶菲. 水稻*Bel*基因异源特性表达分析及基因打靶载体构建 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007: 38–49.
- [46] Li J J. Research of rice gene targeting and genetic transformation system of suspension cells [D]. Nanchang: Nanchang University, 2008: 16–37.
黎晶晶. 水稻基因打靶与悬浮细胞团转基因体系研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 16–37.
- [47] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 537–541.
- [48] Szittyta G, Silhavy D, Molnár A, et al. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation [J]. *EMBO J*, 2003, 22(3): 633–640.