

刘廷利, 郭冬妹, 姚 瑶, 等. 一步法快速构建长片段 RNAi 发夹的载体[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(5): 1131-1136.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.05.006

一步法快速构建长片段 RNAi 发夹的载体

刘廷利, 郭冬妹, 姚 瑶, 张保龙
(江苏省农业科学院卓越创新中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术可以进行基因功能研究以及作物遗传改良, 但常规构建 RNAi 载体方法费时费力。本研究报道了一种基于 *USER* 酶一步法快速构建 RNAi 发夹结构的载体 2301/RNAi/OS 及其应用方法, 操作简便, 省时省力。与已报道的利用酶切连接、Gateway 兼容的同源重组或 PCR 直接连接等构建 RNAi 载体相比, 该载体不需要酶切片段, 片段扩增完成后即可与制备好的线性化载体进行反应, 缩短操作流程和时间, 提高成功率; 该载体对插入片段的酶切位点和长度没有要求, 理论上任何位置和长度的片段均可进入 2301/RNAi/OS 载体中, 尤其是长片段 RNAi 的构建。本试验以本氏烟(*Nicotiana benthamiana*) *PDS* (*Phytoene desaturase*) 基因为例, 利用农杆菌介导的瞬时表达体系验证了该 RNAi 能够在植物体内有效地实现基因沉默。该载体以新霉素磷酸转移酶基因(*NPTII*) 作为筛选标记基因, 可以利用卡那霉素(Kanamycin) 和 G418(Geneticin) 等抗生素筛选转基因阳性植株, 适合单子叶和双子叶植物的遗传转化。

关键词: RNA 干扰(RNAi); *USER* 酶; 一步法; 载体构建; 基因沉默

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)05-1131-06

A one-step method for rapid construction of long-fragment RNA interference vector

LIU Ting-li, GUO Dong-shu, YAO Yao, ZHANG Bao-long
(*Excellence and Innovation Center, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: RNA interference (RNAi) technology can be used for gene function research and crop genetic improvement, but the conventional construction method of RNAi vector is time-consuming and laborious. In this research, we provide a one-step method for rapid construction of long-fragment RNAi vector using uracil-specific excision reagent (*USER*) enzyme. The method is simple, time-saving and labor-saving. Compared with the reported RNAi vectors constructed by restriction enzyme ligation method, Gateway compatible homologous recombination method and PCR direct ligation method, this vector dose not need enzyme digestion fragments. After the fragment amplification is completed, it can react with the prepared linearized vector. Therefore, the operation process and time are shortened, and the success rate is improved. This vector has no requirements for the restriction site and length of the inserted fragment. Using *neomycin phosphotransferase* (*NPTII*) as selective marker gene in this vector, kanamycin and geneticin (G418) can be used to screen transgenic positive plants. It is suitable for genetic transformation of dicot and monocot plants.

Key words: RNA interference (RNAi); *USER* enzyme; one-step method; vector construction; gene silencing

收稿日期: 2021-02-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20180308); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(18)3012]

作者简介: 刘廷利(1982-), 男, 四川隆昌人, 博士, 副研究员, 主要从事植物与微生物互作方面的研究。(E-mail) tlliu2100@163.com

Fire 等发现双链 RNA (dsRNA) 可引发线虫体内的基因沉默, 并将这一现象命名为 RNA 干扰

(RNAi)。真核生物体内形成的双链 RNA 或部分双链 RNA 发夹结构可被双链 RNA 专一的核酸内切酶 *Dicer* 或 *Dicer-like* (*DCL*) 剪切,产生的 siRNA (Small interference RNA) 形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 通过 RNA 碱基序列间的碱基互补配对识别靶基因并抑制靶基因的表达^[1-2]。

根据 RNAi 的原理,人为地在细胞内表达与靶基因互补配对的具有回文结构的序列,利用细胞内源的 RNAi 元件,可以阻断某个基因的表达或降低某个基因的表达量,引起细胞或组织内相应基因表达量下降,产生相应的表型。目前, RNAi 技术已广泛应用于基因的功能研究,具有较高特异性^[3-7]。利用 RNAi 技术,可以选取基因特异性区段作为靶标,用于沉默特异的基因或基因家族中的单个或部分成员;也可以选取基因间的保守区段作为靶标,用于沉默某一类基因。

将具有发夹结构的双链 RNA 的载体转化到植物中能够产生 siRNA,并实现基因的沉默。常规构建发夹结构的方法是将靶基因通过一段间隔序列连接,形成反向互补的核苷酸序列,由组成型启动子或时空特性启动子调控表达。现有的 RNAi 载体的构建方法,一类是通过两步法进行构建,包括酶切连接法、Gateway 兼容的同源重组法等^[3-7]。利用酶切连接法,首先将反向互补序列分别构建到中间载体,再利用限制性内切酶将反向互补序列从中间载体上切下来,连接到目的载体^[3,6-7]。传统的两步法具有明显的缺点,利用 Gateway 兼容的同源重组的方法,首先需要将反向互补序列分别构建到入门载体,再通过 LR 反应连入植物表达终载体^[4-5];酶切连接法不易设计合适的酶切位点,难以构建长片段 RNAi 载体。另一类是基于同源重组的一步法构建,即分别扩增 2 段反向互补片段、内含子片段,再与酶切后的植物表达载体进行四片段同源重组反应,然而实际操作中,多片段同源重组反应往往效率偏低,不能保证快速地成功构建 RNAi 载体。

USER 酶包含 DNA 糖基化酶-裂解酶 *Endo VIII* 和尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (*UDG*),可特异性切割尿嘧啶。该酶可不依赖限制性内切酶和 DNA 连接酶将 PCR 产物装载到目的载体^[8]。目前使用 *USER* 酶进行一步法构建长片段 RNAi 载体尚未见相关报道。本研究以 *PDS* 基因为例,基于 *USER* 酶体系,

将 *PDS* 基因片段构建到 2301/RNAi/OS 载体,利用烟草瞬时表达系统,实现 *PDS* 基因的沉默。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

用于载体构建的 *USER* 酶、限制性内切酶 *Pac I* 和 *Nt.BbvC I* 购自 New England Biolabs 公司;用于目标片段扩增的高保真 DNA 聚合酶、用于大肠杆菌和农杆菌阳性转化子筛选的 *Taq* DNA 聚合酶预混液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DNA 纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒和反转录试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 质粒和菌株

用于植物表达的双元载体质粒 pCambia2301 和 2301.GFP4 载体为本实验室保存,用于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *FAD2* 基因^[9] 内含子克隆的 pHurricane 质粒为本实验室保存, DH5 α 感受态细胞购自北京擎科新业生物技术有限公司,农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司,瞬时转化所用的本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由本实验室保存。

1.3 引物合成和测序

本试验所用引物(表 1)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。构建载体过程中的 Sanger 测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.4 试验方法

1.4.1 2301/RNAi/OS 载体的构建 以 pHurricane 质粒为模板,利用引物 Intron-CF 和 Intron-CR 扩增 1 154 bp 的拟南芥 *FAD2* 基因内含子序列,用 *Bam*H I 和 *Xba* I 分别对 *FAD2* 内含子的扩增产物和 2301.GFP4 载体进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,分别切胶回收扩增片段和线性化载体片段,用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株的感受态细胞,挑取单菌落,利用引物 *TEV-F* 和 *FAD-R* 进行菌落 PCR 筛选,选取含有阳性扩增条带的单菌落,提取质粒,测序验证。

1.4.2 本氏烟的 RNA 提取和 cDNA 合成 取产生表型的本氏烟叶片,在研钵中液氮速冻,研磨成粉末,利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,采用反转录试剂盒合成 cDNA。

1.4.3 2301/RNAi/OS-*PDS* 载体的构建 以幼嫩烟

草叶片的 cDNA 为模版,利用引物 *PDS*-F1 和 *PDS*-F2 扩增 576 bp 的 *PDS* 基因区段作为正向插入片段,利用引物 *PDS*-R1 和 *PDS*-R2 扩增与正向插入片段序列相同的区段作为反向插入片段。用限制性内切酶 *Pac* I 和 *Nt.Bbv*C I 将 2301/RNAi/OS 载体进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收线性化载体和 *FAD2* 内含子条带。配制连接反应体系:*PDS* 正向片段 150 ng, *PDS* 反向片段 150 ng, 2301/RNAi/OS 酶切产物 200 ng, *USER* 酶 1 μ l, 补 ddH₂O 至 10 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 20 min, 25 $^{\circ}$ C 20 min, 获得连接产物,转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中。挑取单菌落,分别利用引物 *TEV*-F 和 *FAD*-R, 以及 *FAD*-F 和 *NOST*-SR 进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆,提取质粒,进行测序验证。

1.4.4 农杆菌介导的烟草瞬时转化 分别取 100 ng 2301/RNAi/OS-*PDS* 质粒和 2301/RNAi/OS 质粒(作为空载体对照),利用电击转化法导入 GV3101 农杆菌菌株,涂布于固体 LB 培养基平板上(含有 50 mg/ml 利福平和 50 mg/ml 卡那霉素),28 $^{\circ}$ C 倒置培养 36 h,挑取单菌落,利用引物 *TEV*-F 和 *FAD*-R 进行菌落 PCR,挑取 3 个阳性单菌落,28 $^{\circ}$ C 振荡培养 36 h 用于烟草瞬时表达。配制农杆菌侵染液(20 ml):2 mol/L MgCl₂ 15 μ l, 1 mol/L pH 5.7 MES 200 μ l, 200 μ mol/L 乙酰丁香酮 100 μ l,用超纯水补足到 20 ml。农杆菌 OD₆₀₀ = 0.05,用 1 ml 无菌注射器将侵染液从烟草叶片背面注射到叶片内,每种质粒注射 3 个单株。

1.4.5 实时定量 PCR 反应 反应体系:2 \times 实时定量 PCR 预混液 10.0 μ l, 10 μ mol/L 引物 *PDS*-TF(或 *EF1*-AF) 0.5 μ l, 10 μ mol/L 引物 *PDS*-TR(或 *EF1*-AF) 0.5 μ l, 1:30 稀释的 cDNA 3.0 μ l; 无离子水 6.0 μ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环;熔解曲线,60~95 $^{\circ}$ C, 每 0.1 $^{\circ}$ C 读数 1 次。通过 2^{- $\Delta\Delta$} 法分析基因表达差异^[10]。

2 结果与分析

2.1 引物设计和植物表达载体构建

本试验采用 2301.GFP4 作为骨架构建 RNA 载体 2301/RNAi/OS。2301.GFP4 为本实验室改造,该载体以商业化的 pCambia2301 质粒作为骨架,在多克隆位点处顺序连有含有 2 \times 花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 增强子的 CaMV 35S 启动子、烟草蚀纹病毒(TEV)的翻译增强子 TEV leader 序列^[11]、增强

型绿色荧光蛋白(eGFP)的编码序列和 35S 终止子(图 1)。该载体以新霉素磷酸转移酶(*NPTII*)基因作为筛选标记基因。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

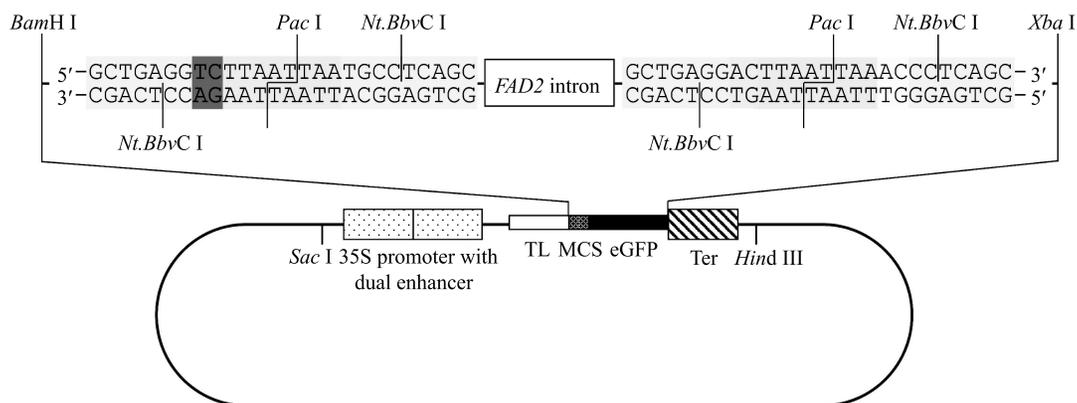
引物名称	引物序列(5'→3')
Intron-CF	CGC ^g gatccGCTGAGGTCTTAATTAATGCCTCAGCCTCCAGG-TCCGTCGCTTCTC
Intron-CR	CC ^c CtctagaGCTGAGGGTTAATTAAGTCCTCAGCACCTGCACCTATGTTTCTGC
TEV-F	CAAGCAATCAAGCATTCTAC
FAD-R	GAATCAATCAAAGAGCATC
PDS-F1	<u>GGTCITAA</u> U ^t TGTTATGTTTGGTAGTAGCC
PDS-F2	<u>GCCATTA</u> AUCGTAAGCATTTCGTTGTTTC
PDS-R1	<u>GGGTTAA</u> U ^t TGTTATGTTTGGTAGTAGCC
PDS-R2	<u>GGACTTAA</u> UCGTAAGCATTTCGTTGTTTC
FAD-F	TTCCATAGTCTTGAGTTTTC
NOST-SR	CTAGTAACATAGATGACACCC
PDS-TF	GAACAACGAAATGCTTACG
PDS-TR	CCTCATCTGTCACCCATATCA
EF1-AF	ACAAGATGGATGCTACCACC
EF1-AR	AACCAGAGATGGGGACAAAG

小写字母为在引物中添加的酶切位点;下划线为特异序列。

以 pHurricane 质粒为模板,扩增拟南芥 *FAD2* 基因的内含子序列,通过引物在 *FAD2* 内含子编码序列上游和下游分别引入限制性内切酶(*Bam*H I 和 *Xba* I)位点,以便将 *FAD2* 内含子编码序列定向连入同样用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切的 2301.GFP4 载体中。同时在 *FAD2* 内含子序列两侧,分别引入 *Nt.Bbv*C I-*Pac* I-*Nt.Bbv*C I 酶切位点,使得所得载体在 *Nt.Bbv*C I-*Pac* I 的作用下能够形成含有 9 nt 黏性末端的载体片段。测序验证正确的质粒命名为 2301/RNAi/OS(图 1),即为本试验构建的 RNAi 植物表达载体。后续只需扩增出目标基因的反向互补序列,即可通过 *USER* 酶介导的方法连入该载体。

2.2 烟草 *PDS* 基因的瞬时沉默载体构建

为了验证利用 2301/RNAi/OS 构建的 RNAi 载体能够在植物中有效地实现基因沉默,我们选取本氏烟 *PDS* 基因作为靶标基因,通过农杆菌介导的瞬时转化沉默 *PDS* 基因^[6]。*PDS* 突变体会表现出叶片白化失绿以及植株生长受抑制的表型,因而容易通过表型变化,直观地观察基因沉默情况。



35S promoter:花椰菜花叶病毒 35S 启动子;dual enhancer:2×花椰菜花叶病毒 35S 增强子;TL:烟草蚀纹病毒翻译增强子;MCS:限制性内切酶多克隆位点;eGFP:增强型绿色荧光蛋白;Ter:35S 终止子;FAD2 intron:拟南芥 FAD2 基因内含子。上部放大图中的黑色竖线和折线表示相应限制性内切酶的切割位置。

图 1 2301/RNAi/OS 载体示意图

Fig.1 Schematic diagram of 2301/RNAi/OS

根据 NCBI 数据库中本氏烟的 cDNA 选取从编码区 121 位到 696 位之间的 576 bp 的基因特异性区段作为靶标区段,分别设计 2 对引物(*PDS-F1* 和 *PDS-F2*,*PDS-R1* 和 *PDS-R2*),以本氏烟幼苗叶片的 cDNA 为模板,分别扩增靶标区段。设计引物时,在引物中基因特异区段的 5' 侧依次引入 *USER* 酶的识别碱基尿嘧啶(U)和特异的序列(表 1),以便目标区段的 PCR 产物在 *USER* 酶作用后,可产生与 2301/RNAi/OS 酶切产物一致的 9 nt 的黏性末端。用 *USER* 酶处理 2 段含有靶标基因序列的 PCR 产物,以及 *Pac I* 和 *Nt.BbvC I* 双酶切的 2301/RNAi/OS 载体,反应后转化大肠杆菌(图 2A)。挑取单克隆进行菌落 PCR,鉴定两段目标序列均连入 2301/RNAi/OS 载体的克隆。本试验随机挑取 16 个单菌落,2 组引物均能扩增出阳性条带的有 13 个菌落,正确率超过 80%(图 2B、图 2C、图 2D)。选取 2 号和 5 号克隆,提取质粒,测序验证,结果都正确,命名为 2301/RNAi/OS-*PDS-2* 和 2301/RNAi/OS-*PDS-5*,后续选取 2 号质粒进行烟草瞬时表达试验。

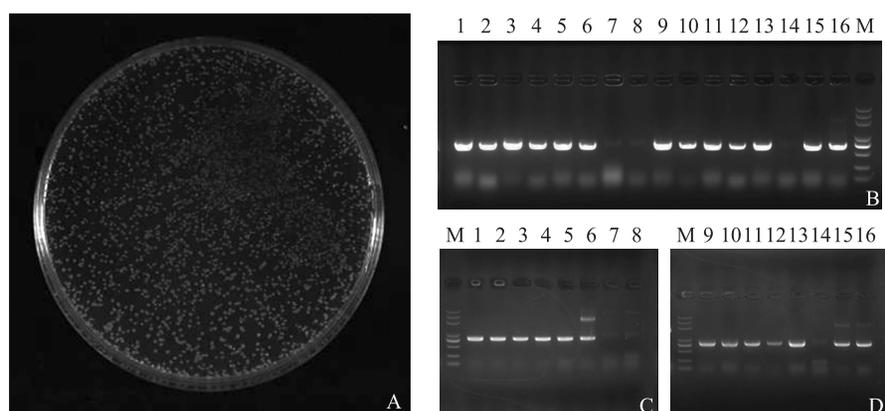
2.3 瞬时沉默本氏烟 *PDS* 基因

利用电击法将质粒 2301/RNAi/OS-*PDS-2* 转入农杆菌菌株 GV3101 的感受态细胞中,同样利用 *TEV-F* 和 *FAD-R* 进行菌落 PCR 筛选。随机挑取 3 个阳性克隆,接种于含有利福平、庆大霉素和卡那霉素的液体 LB 培养基中培养至饱和。离心收集菌体沉淀,利用烟草注射缓冲液重悬至终 $OD_{600} = 0.5$,静置活化后注射 4~5 片平展的本氏烟叶片。以注射含

有 2301/RNAi/OS 空载体的农杆菌的烟草作为对照。每隔 2 d 注射 1 次,共注射 3 次,于最后一次注射后 10 d 观察烟草叶片表型。结果表明,注射含有 2301/RNAi/OS 空载体的农杆菌的叶片(对照)仍然保持绿色,并且能够长出多片绿色新叶(图 3A);而注射了含有 2301/RNAi/OS-*PDS-2* 质粒的农杆菌的烟草植株叶片明显失绿,较老的叶片白化坏死,植株生长受到严重抑制(图 3B),呈现出典型的 *PDS* 基因功能缺失的表型。除了被注射的叶片失绿白化,没有被注射的新叶的叶脉也可以观察到明显的白化表型。除了表型观察,本试验进一步进行了实时定量 PCR,检测 *PDS* 基因表达水平的变化。本试验针对 RNAi 载体靶标序列以外的 3' 端区段设计引物,提取叶脉白化的新叶的总 RNA 反转录了后,检测 *PDS* 基因表达水平,以烟草延伸因子基因(*EF1a*)作为内参基因。结果表明,相比于对照,注射了含有 2301/RNAi/OS-*PDS-2* 质粒的农杆菌的烟草植株中 *PDS* 基因的表达水平下降 20%(图 3C),这与相应叶片叶脉白化的表型相一致。以上结果表明,本试验构建的 RNAi 载体可以有效地在植物体内实现基因沉默。

3 讨论

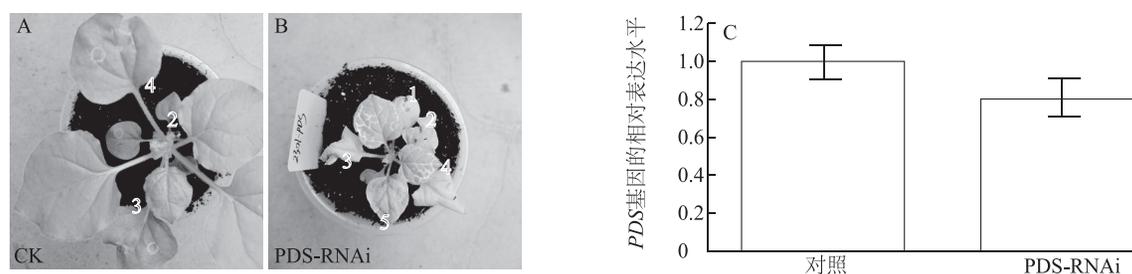
近年来,新近发展起来的基因编辑技术能够相对容易地在多种植物中实现基因功能缺失突变^[12-16]。但对于纯合突变致死的基因,基因功能的彻底丧失可能导致纯合体不能成活,影响后续表型



A: *Pac* I 和 *Nt.Bbv*C I 双酶切后的 2301/RNAi/OS 载体和 *USER* 酶切后的 *PDS* 基因扩增产物混合后转化大肠杆菌,涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上长出的单菌落;B:利用引物 *TEV-F* 和 *FAD-R* 进行菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳结果;C 和 D:利用引物 *FAD-F* 和 *NOST-SR* 进行菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳结果;M:DNA marker;数字 1~16 代表被测单克隆的编号。

图 2 2301/RNAi/OS-*PDS* 质粒检测结果

Fig.2 Detection results of 2301/RNAi/OS-*PDS* plasmid



A:注射含有空载体 2301/RNAi/OS 的农杆菌的烟草植株的表型(对照);B:注射含有 2301/RNAi/OS-*PDS* 质粒的农杆菌的烟草植株的表型。用白色的数字标注被注射的叶片,从基部计算第 1 片被注射的叶片计为 1;C:实时定量 PCR 检测对照和注射含有 2301/RNAi/OS-*PDS* 质粒的农杆菌的烟草植株中 *PDS* 基因的相对表达水平。对照中 *PDS* 基因的相对表达水平被设为 1,烟草延伸因子基因(*EF1a*)被用作内参基因,误差线表示 3 次重复的标准差。*PDS-RNAi* 代表 2301/RNAi/OS-*PDS*-2 质粒。

图 3 利用 2301/RNAi/OS-*PDS* 质粒瞬时沉默烟草 *PDS* 基因

Fig.3 Transient silencing of tobacco *PDS* gene using 2301/RNAi/OS-*PDS* plasmid

和基因功能的分析。利用 RNAi 技术,可不同程度地降低靶标基因的表达,而不会彻底敲除目标基因,进而能够在植株成活的情况下,研究基因功能。此外,对于序列相似性较高的基因家族, RNAi 技术可高效地同时降低多个基因的表达,尤其是串联重复的基因家族,通过杂交将多个单基因突变聚合在一起是几乎不能达到的,这时候 RNAi 技术便更能体现出其优势。

目前在植物中,利用小 RNA 干扰基因表达主要有 RNAi 和人工微 RNA (amiRNA) 2 种策略。与形成较长的具有发夹结构的双链 RNA 前体不同, amiRNA 的策略是选取较短(通常为 21 nt)的 1 段与靶标基因互补的序列,同时借用植物内源存在的

microRNA 前体基因作为骨架构建载体,在植物中表达。一般来讲, amiRNA 策略在体内只产生一种小 RNA,虽然可能有益于提高干扰的特异性,但干扰效率有时低于产生多段小 RNA 的 RNAi 策略。此外,不同的靶标序列对所使用的内源 RNA 骨架可能具有一定程度的选择性。因而, RNAi 相比于 amiRNA 仍具有自己的优势^[1]。

本研究采用基于 *USER* 酶的一步法构建 RNAi 发夹结构的载体。该方法简便高效,植物表达终载体一旦构建好,每次只需扩增 2 条反向互补的序列,再用 *USER* 酶处理,就可以与酶切后的终载体相连接。本研究以本氏烟 *PDS* 基因为例,构建 *PDS* 基因的 2 条反向重复序列,成功构建了 RNAi 载体,载体

构建成功率超过 80%。*USER* 酶可产生比普通酶切位点更长的黏性末端,且不需要 DNA 连接酶的作用即可完成连接,快速、稳定、高效。与 LIC 连接方法^[17]相比,本研究报道的方法成功率更高,操作更简便。

本研究利用农杆菌介导的本氏烟瞬时表达系统验证该载体的沉默效果,结果表明,利用该载体可以有效沉默烟草 *PDS* 基因,使注射含有 2301/RNAi/OS-*PDS*-2 质粒的农杆菌的烟草叶片明显失绿,植株生长明显受到抑制。有意思的是,除了直接注射的叶片失绿黄化,没有直接注射的新生叶片的叶脉也表现出明显的白化表型,并且 *PDS* 基因的表达水平降低到对照的 80%。这可能是小 RNA 可以在细胞间移动导致的^[2,18]。这一现象表明,农杆菌介导的瞬时 RNA 干扰能够在一定程度上实现系统性的基因沉默。

参考文献:

- [1] SCHWAB R, OSSOWSKI S, RIESTER M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18:1121-1133.
- [2] 徐 凌,徐明良. 植物免疫反应中的小 RNA [J]. *遗传*, 2012, 34(1):41-49.
- [3] 杨 杰,仲维功,王才林,等. 直接利用 PCR 产物构建 RNA 干扰表达载体 [J]. *华北农学报*, 2010, 25(5):52-55.
- [4] YU D S, LIAO L B, ZHANG Y, et al. Development of a Gateway-compatible pCAMBIA binary vector for RNAi-mediated gene knockdown in plants [J]. *Plasmid*, 2018, 98:52-55.
- [5] TAO Q, GUO D S, WEI B Y, et al. The TIE1 transcriptional repressor links TCP transcription factors with TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors and modulates leaf development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25:421-437.
- [6] WANG M, WANG G, JI J, et al. The effect of *pds* gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants [J]. *Plant Sci*, 2009, 177:222-226.
- [7] ZHU L J, GU M H, MENG X L, et al. High-amylose rice improves indices of animal health in normal and diabetic rats [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(3):353-362.
- [8] FRANDBEN R J N, ANDERSSON J A, KRISTENSEN M B, et al. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi [J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9:70.
- [9] OKULEY J, LIGHTNER J, FELDMANN K, et al. *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:147-158.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [11] MASON H S, LAM D M-K, ARNTZEN C J. Immunology expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:11745-11749.
- [12] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337:816-821.
- [13] 李 鹏. 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑拟南芥 *ILR3* 基因及功能验证 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(14):78-82.
- [14] 朱丽颖,郑月萍,徐雪珍,等. 一种准确、简便测定 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的方法 [J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(2):299-305.
- [15] 马斯霜,白海波,惠 建,等. CRISPR/Cas9 技术及其在水稻和小麦遗传改良中的应用综述 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(20):29-33.
- [16] 瞿礼嘉,郭冬姝,张金喆,等. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用 [J]. *生命科学*, 2015, 27(1):64-70.
- [17] XU G Y, SUI N, TANG Y, et al. One-step, zero-background ligation-independent cloning intron-containing hairpin RNA constructs for RNAi in plants [J]. *New Phytol*, 2010, 187(1):240-250.
- [18] CHITWOOD D H, TIMMERMANS M C P. Small RNAs are on the move [J]. *Nature*, 2010, 467(7314):415-419.

(责任编辑:陈海霞)