

植物遗传转化表达载体研究进展

刘 亚, 李敬娜, 任 雯, 李 翔

北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100097

摘 要:植物遗传转化表达载体是植物转基因研究中非常重要的一个环节,外源基因在转基因植物中的高效表达是转基因研究成功的关键。综述了植物遗传转化表达载体近年来的研究进展情况,着重介绍了在转基因植物中实现外源基因高效表达的多种途径和策略,旨在提高转基因植物中外源基因的表达水平和生物安全性,并展望了今后植物转基因研究及商业化发展方向。

关键词:植物;遗传转化;表达载体;进展

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.01.02

Progress on Expression Vector for Plant Genetic Transformation

LIU Ya, LI Jing-na, REN Wen, LI Xiang

Maize Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract:The plant expression vector construction for genetic transformation is a very important step in the plant transgenic research, the high efficient expression of exogenous gene in the transgenic plants will be regarded as a very key factor. This paper reviewed research progress on the genetic transformation of plant expression vector in recent years, highlighted in transgenic plants highly expressed exogenous genes to achieve many kinds of ways and the strategy, aimed at enhancing the exogenous gene the expression level and the biological security in the transgenic plants. This paper finally prospects the further plant transgenic research and the commercialization development.

Key words:plant; genetic transformation; expression vector; progress

自从 1983 年首例转基因植物诞生以来,植物转基因研究已有 20 多年的历史,全球转基因作物种植面积累计已经超过 10 亿 hm^2 ^[1]。利用转基因技术培育植物新品种已成为重要的育种手段之一。但是在转基因知识体系和技术操作日益成熟的同时,也仍存在如转基因植物中外源基因表达效率低、表达产物不稳定等问题。如何通过植物表达载体为媒介,将目的外源基因转入受体植物特定部位和并保证基因在特定时间内高水平稳定表达,产生人们预期的表型性状,是转基因研究人员不断探索和努力的目标。在转基因技术研究环节中,植物表达载体构建的好坏直接影响着外源基因在受体植物体内的表达效率,本文就植物表达载体已经取得的研究进展进行综述,以期相关的研究工作提供参考。

1 植物表达载体的种类及功能

植物表达载体是携带目的外源基因进入植物细胞进行扩增和表达的媒介,故亦称作工程载体。根据载体的遗传特性和功能,主要包括农杆菌 Ti 质粒载体和植物病毒表达载体两大类。农杆菌 Ti 质粒载体可将外源基因整合进植物染色体基因组,使外源基因在植物中稳定表达;植物病毒载体系统为瞬时表达系统,通过转基因植株稳定表达外源重组蛋白,在生产疫苗或药用蛋白方面有着广泛的用途^[2]。

根据结构特点又可将植物表达载体分为一元载体系统和二元载体系统两类。目前研究中常应用二元表达载体,是由两个相容性突变 Ti 质粒组

收稿日期:2011-03-06; 接受日期:2011-04-11

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08003-003)资助。

作者简介:刘 亚,博士,主要从事玉米分子育种研究。E-mail:srlyyd@gmail.com

合而成的双质粒系统,一般主要包括卸甲 Ti 质粒和微型 Ti 质粒两部分。卸甲 Ti 质粒就是敲除 T-DNA 区域的突变型 Ti 质粒载体,完全丧失了致瘤功能,主要是提供 *Vir* 基因功能,因此也称之为辅助质粒;而微型 Ti 质粒则是含有 T-DNA 边界、缺失 *Vir* 基因的 Ti 质粒,主要作用是在 T-DNA 左右边界序列之间提供植株选择标记^[3]。二元表达载体进行转化的原理是通过 Ti 质粒上的 *Vir* 基因反式激活 T-DNA 区域的转移,其构建效率较高,操作简便,且在外源基因的植物转化中效率远高于共整合载体。

农杆菌的 T-DNA 结构与真核基因基本相同:在基因起始密码上游 30 bp 处有 TATA 盒,在 75 bp 处有 CAAT 盒。每个 T-DNA 基因的 3' 末端还含有一个或多个多聚腺苷酸化的信号顺序 AATAAA。这些元件构成了 T-DNA 转入的外源基因在植物细胞中稳定表达的先决条件^[4]。

目前载体构建中常见策略是以二元载体为基础,以克隆载体基本骨架,增加了表达元件(如启动子、增强子、终止子等),通常还带有基因表达的调控序列,并在适当位置有可插入外源基因的限制性内切酶位点。目前在植物基因工程转化中常用的质粒载体有 pBI121、pCambia1300 等,主要通过基因枪法、农杆菌介导法或其他转化方法将外源基因导入到受体植物当中。

2 启动子的选择

植物基因启动子是起始基因转录的一段关键 DNA 序列,是植物基因转录调控的中心。选择合适的启动子对增强外源基因在受体植物体内的高效表达具有至关重要的意义。按作用特征可分为组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子这三类。此外,在植物转基因表达研究中,为了提高启动子的启动效率和基因表达效率,通常会将不同种类的启动子根据表达和调控目的进行多启动子复合及修饰,形成新型的复合型串联启动子,从而应对复杂的调控需要,更大程度地提高转入外源基因的表达效率和稳定性。

2.1 组成型启动子

组成型启动子在所有组织中都能持续性启动基因的表达。从结构上看,大多数组成型启动子在转录起始位点上游几百个核苷酸处均存在六聚

体花纹序列 TGACTG^[5],并且往往间隔 6~8 个核苷酸不断重复出现。目前使用最广泛的组成型启动子是花椰菜花叶病毒的 CaMV35S 启动子、玉米的 Ubiquitin 启动子和水稻的 Actin 启动子。现在已经商业化的转基因大豆采用的就是 CaMV35S 启动子^[6]。从植物本身克隆的组成型 Ubiquitin 启动子和 Actin 启动子也有着较高的启动效率,可以非常有效地在单子叶植物中驱动外源基因的转录,采用上述启动子的商业化转基因事件 TC1507、NK603 均表现出了较高的外源基因表达效率。

2.2 组织特异型启动子

组织特异型启动子也称为器官特异性启动子,这些启动子往往调控外源基因在特定器官或组织中的表达,表现出发育调节的特性^[7],通常还与增强子及沉默子等组成调控结构,表现出多因子相互作用的调控效果^[8]。目前可供选择的器官特异表达启动子还比较有限。Thilmony 等^[9]分离并鉴定了 LP2(*Leaf Panicle2*)基因的启动子,该基因主要在叶片和光合组织表达,编码一个富含亮氨酸的受体激酶。LP2 启动子作为一个特异表达的强启动子是一个十分有利的工具,可以驱动基因特异地在植物的绿色组织中表达,在根、成熟种子和生殖器官中不表达。通过其以对禾谷类作物进行遗传改造,能够大大减少公众所担忧的转基因食品安全问题。

2.3 诱导型启动子

诱导型启动子是植物在特定的发育阶段、组织器官或生长环境下,接受诱导信号后,启动基因表达或者大幅度提高基因的转录水平,因此又称之为诱导型调控序列或诱导型增强子^[8]。这种特定因素诱导激活的表达模式,在一定程度上避免了植物体内资源的浪费。诱导型启动子通常以诱导信号命名和分类,目前已发现的有光诱导表达启动子、热诱导表达启动子、创伤诱导表达启动子和化学诱导表达启动子等多种。

杨东歌等^[10]以逆境诱导表达基因 *Rd29A* 的启动子驱动拟南芥脱水应答转录因子 *CBF4* 基因在玉米中表达,人工干旱处理下,转基因株系的脯氨酸含量和叶绿素含量比野生型对照提高 1 倍,间接表明转基因株系的抗旱能力在某种程度上有所提高。陈铮等^[11]构建了由 IND(6xABRE-

mini35S)和 Pabp9 启动子分别驱动 *ABP9* 基因的两种诱导型表达的植物表达载体,得到拟南芥转基因株系。研究表明,在转基因拟南芥中,利用上述两种诱导型启动子驱动 *ABP9* 基因表达能够部分解除由组成型表达 *ABP9* 基因导致的生长延迟。

2.4 复合串联启动子

在植物转基因研究中,使用天然的启动子表达水平往往不够理想,通过基因工程手段对现有启动子进行改造和修饰,以及选择不同类型的启动子组合串联,可提高其表达效率。这种经修饰的复合型启动子表达效率高,可以通过多种因素激活,并根据不同转化目的和表达目标进行选择和优化组合,从而更好更高效地调控外源基因的表达效率和表达稳定性。这种手段已逐渐受到重视并得到广泛的研究和应用。

陈宛新等^[12]用农杆菌介导法分别将植物表达载体 pBinMoBc(携带有高效复合 OM 启动子)和 pBinoBc(携带有 35S 启动子)导入陆地棉栽培品种中,转 pBinMoBc T₂ 代与转 pBinoBc T₂ 代相比,复合 OM 启动子更能有效地驱动 *CryIac3* 抗虫基因的高效表达,对棉铃虫具有更快的致死速度。

在转基因商业化方面,孟山都公司研发的抗虫转基因玉米事件 MON810 使用增强型的 35S 启动子,利用其启动抗虫基因进行表达,大大提高了抗虫基因的表达效率,增强了转基因植株的抗虫效果。

3 内含子的应用

自 1977 年内含子被发现以来,内含子在植物体内的功能机理还不完全清楚,但多项研究表明内含子与基因表达有关,内含子介导的增强效应是提高外源基因在转基因作物中表达水平的重要策略之一。

内含子增强基因表达的作用最初是由 Callis 等^[13]在转基因玉米中发现的,玉米乙醇脱氢酶基因(*Adh1*)的第一个内含子(intron1)对外源基因表达有明显增强作用,该基因的其他内含子(例如 intron8、intron9)也有一定的增强作用^[13]。玉米泛素基因的第一个内含子能够启动 *GusA* 基因的表达,具有类似于启动子的功能,分析该内含子

的结构特征发现,该内含子具有 TATA 盒样结构(TATAA)和 CA 盒样结构(CAAT)^[14]。王悦冰等^[15]研究比较了植物中 4 种不同基因中的内含子增强外源基因表达的效果,分别是来自玉米泛素蛋白基因的第一内含子(*Ubi1*)、水稻肌动蛋白基因的第一内含子(*Act1*)、玉米乙醇脱氢酶基因的第一内含子(*Adh1*)和马铃薯高赖氨酸基因 *SBgLR* 的第二内含子(*SBgLR2*)。结果表明,*Ubi1* 增强基因表达活性的能力最强,它的存在可使 *GUS* 的表达活性提高到原来的 5 倍,*Act1* 可使 *GUS* 的表达活性提高到原来的 3 倍,*Adh1* 和 *SBgLR2* 没有增强 *GUS* 基因的表达活性。

近几年来,在哺乳动物、线虫、昆虫、真菌和植物中,均发现有内含子增强基因表达的现象。同时随着对内含子的功能研究的逐步深入,在揭示内含子调控基因表达的机制方面也取得了一定进展^[16]。内含子将会成为精确地调控目的基因表达的有力工具,在基因工程领域发挥更大的作用^[17]。

4 目的基因的修饰与改造

4.1 非编码区修饰

核基质结合区(matrix attachment regions, MARs)是细胞中一段与核基质特异结合的 DNA 序列,大多 MAR 序列位于转录活跃的 DNA 环状结构边界处的非编码区,富含 AT 和保守的结构域。目前已从很多植物中分离到了 MARs,长度一般为 300~1 000 bp。MARs 可以作为边界因子和染色质调控因子对外源基因的表达发挥作用^[18],当 MARs 连接到基因两侧之后,MARs 则与核基质结合形成一个相对独立的疏松染色质 loop 结构,使每个转录单元保持相对的独立性,减少“位置效应”,使外源基因保持较高的转录活性从而提高表达效率。

目前已有一些 MARs 技术应用的研究报道。Mankin 等^[19]将烟草 *Rb7* 基因的 MAR 顺式构建到不同的启动子调控的 *GUS* 基因两端再转入烟草,结果发现 MARs 序列显著提高了组成型启动子 CaMV35s、NOS 和 Ocs 调控的 *GUS* 表达水平,诱导性启动子大豆热激蛋白启动子(*GmHspL*)调控的 *GUS* 基因在热激诱导后表达水平也得到了提高。Francois 等^[20]将玉米中的 MAR 与 Bar 基

因相连,利用基因枪法转入玉米,发现在愈伤组织阶段 MARs 没有提高 *Bar* 基因的表达水平,在幼苗期和成苗期 MARs 将 *Bar* 基因表达水平提高了 50% 以上。

翻译起始过程中如何准确地识别翻译起始位点对于生物来说是至关重要的,翻译起始位点上游的 AUG 和 ORF 对翻译起始也有着非常重要的调节作用^[21]。Kozak^[22] 系统的研究过起始密码子 ATG 周边碱基定点突变后对转录和翻译所造成的影响,并认为在真核生物中,当起始密码子周边序列为 ACCATGG 时转录和翻译效率最高,特别是 -3 位的 A 对翻译效率非常重要。该序列被后人称为 Kozak 序列,并被应用于表达载体的构建中。

真核基因的 5' 和 3' 非翻译序列对基因的正常表达非常重要,该区段的缺失常会导致 mRNA 的稳定性和翻译水平显著下降。在提高转基因外源基因表达效率环节中,通过添加 5' 和 3' 非翻译序列也是一条非常重要的途径。来自烟草花叶病毒(TMV) RNA 5' 非翻译区的引导序列(Ω 序列)在真核和原核系统对翻译有明显的增强作用,能使 *GUS* 基因的翻译活性提高数十倍^[23]。真核生物 mRNA 的 poly(A) 尾巴则对 mRNA 由胞核向胞质的运输、mRNA 的稳定性和翻译效率都有促进作用。毛立群等^[24] 研究发现,当 Ω 序列与 poly(A) 共存于一个开放性阅读框架中时,其表达水平与仅有 Ω 序列时相比有进一步的提高。随着 5'-UTR Ω 序列的添加及 3'-UTR poly(A) 序列中 dA 残基数的逐渐增加,报告基因的表达效率较 pBI121 也相应逐渐增加,poly(A) 序列在双子叶植物烟草中对表达的增强作用与其长度呈正相关性,且至少长达 100 dA 残基对表达的增强作用仍呈上升趋势。

4.2 编码区的改造

不同来源的基因在不同物种中的表达效率差异较大。部分来源于原核生物的外源基因由于表达机制的差异,在植物体内往往表达水平不高。因此,通常在不改变氨基酸序列的情况下,通过修改外源基因碱基构成,使用受体植物偏爱的密码子,可使异源基因适合植物体表达模式,从而提高外源蛋白的表达水平。

此外,DNA 的甲基化修饰是动植物细胞中广泛存在的一种现象,一般来说 DNA 的甲基化具有

抑制基因表达的作用,活化的基因往往出于去甲基化状态。研究指出未甲基化的基因进入植物细胞后也可能因甲基化而影响表达^[25]。因此,除在载体构建初期应考虑目的基因的去甲基化修饰问题,亦可进行后期修饰,在载体中添加增强去甲基化修饰活性调节序列^[26]或在易发生修饰的位点附近添加保护序列^[27]。

去除富含 AT 的不稳定元件等一系列措施,也可以使目的基因表达产物的积累得到极大程度的提高。Perlak 等^[28]和 Iannacone 等^[29]在不改变毒蛋白氨基酸序列的前提下,分别对 *CryIA(b)* 基因和 *Cry3* 基因进行了改造,结果在转基因植株中毒蛋白的表达量大幅增加,获得了显著的抗虫效果。

5 信号肽的应用

植物细胞的蛋白质合成大部分在核糖体内完成,在核糖体内合成的蛋白质前体要转运到内质网等细胞器,并受蛋白质前体中引导序列的调控^[30]。研究发现,外源基因连接上适当的信号肽序列之后,可定向运输到细胞内叶绿体、内质网等特定部位,可显著提高外源蛋白的稳定性和累积量,但同一种信号肽是否适用于所有的蛋白质还有待于进一步研究确定。

Wong 等^[31]将拟南芥 *rbcs* 亚基的转运肽序列连接于杀虫蛋白基因之前,发现杀虫蛋白能够特异性地积累在转基因烟草的叶绿体内,外源蛋白总的积累量比对照提高了 10 ~ 20 倍。孟山都公司将来源于拟南芥叶绿体转运肽 DNA 序列植入抗除草剂草甘膦基因 *CP4-EPSPS* 之前,引导该基因进入芳香族氨基酸合成的场叶绿体内,得到了高表达效率的转基因事件 NK603^[32]。

邓朝阳等^[33]采用外源蛋白靶向定位的策略,大幅度提高了外源蛋白在转基因植物细胞内的积累量。通过体外操作对豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*Cpti*)进行修饰获得了一个融合蛋白基因(*Sck*),该基因是在 *Cpti* 基因的基础上在其 5' 端添加了信号肽编码序列,在 3' 端添加了内质网滞留信号编码序列,旨在引导基因转译产物进入细胞内质网,并最终滞留在内质网及其衍生的蛋白体内。用 *Sck* 基因转化烟草,结果表明含有修饰基因的转基因烟草 *Cpti* 蛋白含量有明显提高,比转未修

饰 *Cpti* 基因烟草平均高出 2 倍以上,同时转基因植株的抗虫性也有了显著的提高。

6 新型基因工程策略的应用

随着分子生物学研究的不断发展和深入,新的基因工程策略应运而生,包括反义 RNA、核酶基因操作、无毒信号基因介导的广谱抗病策略的应用等等。这些先进原理和技术的应用,为转基因育种带来的新的思路和切入点,这些新兴技术虽然尚显稚嫩,但却为未来的转基因工程操作提供了新的方向^[3]。

6.1 反义 RNA 的基因操作

反义 RNA 是调节基因表达的一种天然机制,主要在翻译水平起到抑制和阻碍基因表达的调节作用,也包括少数在转录或者 RNA 复制前加工水平。人工构建反义基因可以有效阻抑基因表达,通过引入和靶 mRNA 互补的小干扰 RNA (siRNA) 可阻断由 DNA 经过 RNA 到蛋白质的信息传递。由于该方法可在不需分离鉴定基因产物的情况下特异性地揭示基因功能,且合成及操作简单,效果特异性强,因此在转基因检测中存在巨大的应用前景。此外,还可以看到除分析克隆基因功能和表达情况的反向验证以外,反义 RNA 的应用可以更安全有效地沉默一些抑制目的外源基因表达的序列,从而达到提高基因表达的效果^[34],还可在不修改植物体基因的情况下诱导调控元件表达沉默,减少基因操作造成突变体的隐形致死隐患。

6.2 核酶基因操作

核酶是具有酶活性的 RNA 序列,是真核生物转录物的内含子本身含有的前导序列,能在离体条件下专一性地催化内含子的剪切和聚合。核酶作为一种新的抗病因子已应用于植物体内。Han 等^[35]已通过 Ti 质粒将特异性切割水稻粗缩病病毒的锤头型核酶基因导入转基因水稻植株使其在植物体内有效的切割类病毒分子,达到了防治水稻矮缩病病毒的效果。

6.3 无毒信号基因介导广谱抗性策略的应用

抗病虫害基因工程存在抗性范围窄和抗性降低两个主要问题,使转基因植物不能适应复杂多变的病虫害环境。在 *Bt* 基因转化的抗虫植株上也已证实,病原菌和病虫产生抗性后,抗性植株抗

病虫能力将有所降低。近年来根据现代免疫分子理论,提出通过植物防卫反应提高植物自身抗性能力,将去毒害基因导入植物体内,使植物产生超敏反应获得自身免疫抗性或者“系统获得性抗性”^[36],从而表现出对多种病原物有效的广谱的持续型抗性效果。

7 载体安全性

在植物载体构建过程中,将外源目的基因导入植物体,采用高效、安全的转化子选择方法显得极为重要。目前被广泛用于选择的标记基因除了抗除草剂类,包括草丁膦抗性基因 *Bar*、草甘膦抗性基因 *Epsps* 等之外,糖类代谢酶基因的正筛选系统 (positive selection system) 也得到了大量运用。这类标记基因的编码产物是某种糖类的分解代谢酶,转化子能利用筛选剂糖类作为主要碳源,可在筛选培养基上生长扩繁;而非转化细胞则处于饥饿状态,生长被抑制,依此可以区分转化与非转化细胞。现已试用于植物转化的此类标记基因有木糖异构酶 *XylA* 基因和磷酸甘露糖异构酶 *Pmi* 基因。目前以磷酸甘露糖异构酶基作为选择标记的 *Pmi*/甘露糖筛选体系已在甜菜^[37]、玉米^[38]、小麦^[39] 和水稻^[40] 等多种植物中得到运用。已有多个转基因玉米品种上市的先正达公司新近研发的转基因玉米事件 *Mr604* 转化所用的筛选标记也是 *Pmi* 基因^[41]。

在筛选获得转基因植株后,抗性基因已不再需要而且它在转基因植物中长期存在可能引起生物安全性问题,很大程度上影响普通民众对转基因植物的接受。目前最好的解决方法是在得到转基因植物后将抗性基因从转基因植物中剔除。中国科学院遗传与发育研究所朱祯实验室把分别携带选择标记基因和目的基因的两个 T-DNA 构建在同一个载体上,初步研究结果表明本方法能够较大地提高目的基因和选择标记基因的共整合频率,从而增加在转化植株后代群体中获得无选择标记基因转化体的概率^[42]。谭登峰等^[43]通过体外重组构建双 T-DNA 二元载体 pCDMARpWDT-Hyg,使选择标记基因 *Hpt* 和抗逆转录因子基因 *DREB* 分别位于两个独立的 T-DNA,用农杆菌介导法转化玉米胚性愈伤组织,同时整合 *Hpt* 基因和 *DREB* 基因的共转化率植株达到 26.3%。孟

山都新研发的玉米转基因事件 MON89034 也采用这一方法将选择标记新霉素磷酸转移酶 (*Npt II* 基因) 去除。

此外,也可利用 Cre/loxP 系统通过位点特异性重组剔除转基因植物中的选择标记基因。利用可调控表达的 Cre/loxP 系统介导的策略,可以将 Cre 重组酶基因和目的基因、loxP 位点、选择标记基因等都构建到同一个植物表达载体上,将要删除的基因和 Cre 重组酶基因置于 2 个同向的 loxP 位点间,采用特异性启动子,如化学诱导或热诱导等诱导型启动子、种子或花等组织特异性启动子等,来启动 Cre 重组酶基因的表达,实现目的基因的删除^[44]。

Luo 等^[45]利用同向融合 loxP 与 *frt* 2 个特异识别位点构成一个新的杂合识别位点 loxpfrt,增强重组酶蛋白 Cre 或 FLP 对识别位点序列的识别、结合以及切割作用,提高位点特异性重组酶系统在转基因植物中对外源基因的删除效率,建立了一个高效的基因删除系统,为解决转基因植物的标记基因安全性问题提供了一种目前较为有效的途径。2007 年由该系统研发得到的转基因作物高赖氨酸转基因玉米 LY038 被允许进行商业化生产^[46]。

8 结论与展望

迄今为止,已有转基因大豆、玉米、棉花、油菜和西红柿等多种转基因植物成功进行了商业化开发。植物基因工程已步入改良作物的实践阶段,势必将培育出更多高产、稳产、优质、抗逆能力强和适合于生产加工实际需要的基因工程新品种。而随着转基因植物种植面积逐年提升,转基因产品正由被动提高产量(主要通过保护作物免受其他因素如害虫、杂草、病害等影响来获得)的第一代产品向主动提高产量(主要依靠自身特性实现增产)的第二代转基因产品过度转化,生产更加适合人类需要的基因食品已经越来越明朗化和可操作化。

随着基因工程技术的不断发展,植物表达载体研究也正在不断进行优化和完善,使得植物转化效率不断得到提升。外源基因在植物体内的表达受多种因素影响,包括在植物基因组中的整合位置、转录、翻译、加工以及分泌等过程都会影响

目的蛋白在植物体内的积累程度,因此需要综合运用多种技术策略才会获得最佳的效果。只有更好地增强外源基因的表达水平,提高生物工程体的安全性,才能符合未来转基因商品化产品的要求。

参 考 文 献

- [1] Clive James. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志,2010,30(2):1-22.
- [2] 卢薇薇,沈文涛,唐清杰,等. 植物病毒载体系统研究进展[J]. 遗传,2007,29(1):29-36.
- [3] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[J](第二版). 科学出版社,2002.
- [4] Mysore K S, Nam J, Gelvin S B. Plant genetic methods in enzymology[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,2000,97:948-953.
- [5] Weising K, Kaemmer D, Epplen J T, et al. DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides[J]. Curr. Genet.,1991,6:483-489.
- [6] 覃文,朱水芳. 转基因油料作物[J]. 中国油脂,2003,28(5):48-52.
- [7] John D, Roderick S, John H. Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes* [A]. In: Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual [M]. Blackwell Scientific Publications,1988,355.
- [8] Thomson J G, Yau Y Y, Blanvillain R, et al. ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from the *Arabidopsis* genome[J]. Transgen. Res.,2009,2:237-248.
- [9] Thilmony R, Guttman M, Thomson J G, et al. The LP2 leucine-rich repeat receptor kinase gene promoter directs organ-specific, light-responsive expression in transgenic rice [J]. Plant Biotech. J.,2009,7(9):867-882.
- [10] 杨东歌,杨凤萍,陈绪清,等. 外源脱水应答转录因子 CBF4 基因转化玉米的获得[J]. 作物学报,2009,35(10):1759-1763.
- [11] 陈铮,邹维华,张霞,等. 转录因子 ABP9 基因在不同启动子驱动下对转基因拟南芥生长发育的影响[J]. 中国农业科技导报,2008,10(3):58-63.
- [12] 陈宛新,肖桂芳,朱赓. 陆地棉栽培品种转复合启动子控制下的 *cryIac3* 基因获得高效抗虫植株[J]. 植物学报,2002,44(8):963-970.
- [13] Callis J, Fromm M, Walbot V. Introns increase gene expression in cultured maize cells [J]. Genes Dev.,1987,1(10):1183-1200.
- [14] Salgueiro S, Pignocchi C, Parry M A J. Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment [J]. Plant Mol. Biol.,2000,42(4):615-622.
- [15] 王悦冰,郎志宏,张杰,等. 利用 ubi1 内含子增强 Bt *cryIAh* 基因在转基因玉米中的表达[J]. 科学通报,2008,53(17):2041-2046.
- [16] Rose A B. Intron-mediated regulation of gene expression [J]. Curr. Top. Microbiol. Immunol.,2008,326:277-290.

- [17] 陈兵, 文建凡. 内含子在生物信息学研究和基因工程中的应用[J]. 生命的化学. 2010, 30(1): 59–63.
- [18] Geyer P K. The role of insulator elements in defining domains of gene expression[J]. Curr. Opin. Genet. Dev., 1997, 7(2): 242–248.
- [19] Mankin S L, Allen G C, Phelan T, *et al.*. Elevation of transgene expression level by flanking matrix attachment regions (MAR) is promoter dependent; a study of the interactions of six promoters with the RB7 MAR[J]. Transgen. Res., 2003(12): 3–12.
- [20] Torney F, Partier A, Barret P, *et al.*. Enhancement of maize transformation efficiency by the use of maize matrix attachment regions[J]. Plant Cell, 2005, 80(3): 295–303.
- [21] Churbanov A, Rogizin I B, Babenko V N, *et al.*. Evolutionary conservation suggests a regulatory function of AUG triplets in 5'-UTRs of eukaryotic genes[J]. Nucl. Acids Res., 2005, 33(17): 5512–5520.
- [22] Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes[J]. Gene, 1999, 234(2): 187–208.
- [23] Gallie D R, Sleat D E, Watts J W, *et al.*. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*[J]. Nucl. Acids Res., 1987, 15(8): 3257–3273.
- [24] 毛立群, 郭三堆. Ω 序列和 3' poly(dA) 长度与基因表达效率的关系[J]. 植物学报. 1998, 40(12): 1166–1168.
- [25] Meng L, Bregitzer P, Zhang S, *et al.*. Methylation of the exon/intron region in the Ubi1 promoter complex correlates with transgene silencing in barley[J]. Plant Mol. Biol., 2003, 10(3): 327–340.
- [26] Meng L, Ziv M, Lemaux P G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley[J]. Plant Mol. Biol., 2006, 8(1): 15–18.
- [27] Kang T J, Kwon T H, Kim T G, *et al.*. Comparing constitutive promoters using CAT activity in transgenic tobacco plants[J]. Mol. Cells, 2003, 16: 117–122.
- [28] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, *et al.*. Modification of the coding sequence enhances plant expressing of insect control protein genes[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1991, 88(8): 3324–3328.
- [29] Iannacoe R, Grieco P D, Cellini F. Specific sequence modification of a *Cry3B* endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance[J]. Plant Mol. Biol., 1997, 34(3): 485–496.
- [30] Manuel G C, Brunak S, Heijne G. Prediction of N-terminal protein sorting signals[J]. Curr. Opin. Struct. Biol., 1997, 7(3): 394–398.
- [31] Wong E Y, Hironaka C M, Fischhoff D A. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants[J]. Plant Mol. Biol., 1992, 20(1): 81–89.
- [32] Heck G R, Armstrong C L, Astwood J D, *et al.*. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based glyphosate-tolerant corn event[J]. Crop Sci., 2005, 45: 329–339.
- [33] 邓朝阳, 宋贵生, 徐军望, 等. 通过细胞内的靶向定位大幅度提高外源蛋白在转基因植株的积累水平[J]. 植物学报, 2003, 45(9): 1084–1089.
- [34] Li J, Brunner A M, Shevchenko O, *et al.*. Efficient and stable transgene suppression *via* RNAi in field-grown poplars[J]. Transgen. Res., 2007, 10(4): 679–694.
- [35] Han S, Wu Z, Yang H, *et al.*. Ribozyme-mediated resistance to rice dwarf virus and the transgene silencing in the progeny of transgenic rice plants[J]. Transgen. Res., 2000, 6(3): 195–203.
- [36] Reiser L, Sánchez-Baracaldo P, Hake S. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes[J]. Plant Mol. Biol., 2000, 42: 151–166.
- [37] Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, *et al.*. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. Mol. Breed., 1998, 4(2): 111–117.
- [38] Negrotto D, Jolley M, Beer S, *et al.*. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) *via* *Agrobacterium* transformation[J]. Plant Cell Rep., 2000, 19(8): 798–803.
- [39] Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl A, *et al.*. Phosphomannose isomerase, PMI, as a selectable marker gene for durum wheat transformation[J]. J. Cereal Sci., 2006, 43(1): 31–37.
- [40] Penna S, Ramaswamy M B, Anant B V. Mannose-based selection with phosphomannose-isomerase (PMI) gene as a positive selectable marker for rice genetic transformation[J]. J. Crop Sci. Biotechnol., 2008, 11(4): 233–236.
- [41] Lee S H, Yi B Y, Kim S J. Event-specific analytical methods for biotech maize MIR 604 and DAS-59122-7[J]. J. Sci. Food Agric., 2009, 89(15): 2616–2624.
- [42] Chen S B, Li X G, Liu X, *et al.*. Green fluorescent protein as a vital elimination marker to easily screen marker free transgenic progeny derived from plants cotransformed with a double T-DNA binary vector system[J]. Plant Cell Rep., 2005, 23: 625–631.
- [43] 谭登峰, 韩兆雪, 曹墨菊, 等. 可去除选择标记的 *DREB* 基因双 T-DNA 载体共转化玉米[J]. 四川农业大学学报, 2008, 26(1): 15–19.
- [44] 孙家利, 闫晓红, 王力军, 等. Cre/loxP 位点特异性重组系统在植物中的应用的研究进展[J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1099–1107.
- [45] Luo K, Duan H, Zhao D, *et al.*. “GM-gene-deletor”: fused loxP-FRT recognition sequence dramatically improves efficiency of FLP or Cre recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants[J]. Plant Biotechnol. J., 2007, 5(2): 263–274.
- [46] Ow D W. GM maize from site-specific recombination technology, what next[J]? Curr. Opin. Biotechnol., 2007, 18(2): 115–120.