

RNAi 载体构建新方法及其在植物次生代谢调控中的应用

曲子越¹, 李 影¹, 李林夕¹, 王朝焕¹, 王 敏¹, 尹 静^{1,2*}

1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学林学院 林木遗传育种与生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术具有专一性强、抑制效率高、可大规模操作、重复性好及在植物中可以孟德尔方式遗传等优点, 被广泛应用于基因功能验证、代谢调控等方面。在植物代谢工程中, 可通过 RNAi 方法抑制分支途径产物合成及改变代谢流的分配, 调控目标物质的合成。对 RNAi 技术发生机制、高效 RNAi 载体构建方法及其在代谢调控中的应用进展进行系统概述, 以期利用 RNAi 技术进行代谢工程调控研究奠定理论基础和提供技术参考。

关键词: RNAi; 代谢调控; 载体构建; 次生代谢; 植物代谢工程

中图分类号: R281 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)07-1458-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.032

A new method of RNAi vector construction and its application of secondary metabolism regulation of plants

QU Zi-yue¹, LI Ying¹, LI Lin-xi¹, WANG Zhao-huan¹, WANG Min¹, YIN Jing^{1,2}

1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. State Key Laboratory of Tree Genetics Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: RNA interference (RNAi) technology has strong specificity, high inhibitory efficiency, large-scale operation application, and good repeatability, and it can perform Mendelian mode of inheritance in plants, which is widely used in the validation of gene function and metabolic regulation. In plant metabolic engineering, the RNAi method can inhibit the synthesis of product, change the distribution of metabolic flux, and regulate the synthesis of the target product. This review summarized the current progress and study strategy of RNAi in plant metabolic regulation. RNAi mechanism and characteristics, optimal strategy of vector structure, efficient RNAi vector construction method, and application progress in the regulation of metabolism were reviewed, in order to lay the theoretical foundation and technical reference of RNAi technology of metabolic engineering control.

Key words: RNAi; metabolic regulation; vector construction; secondary metabolism; plant metabolic engineering

近年来, 天然药物需求不断增大, 而天然药物生产和自然资源可持续发展之间的矛盾也随之加剧。植物代谢工程的主要目标之一就是提高或者降低目标代谢物的量, 基因抑制技术通过抑制或调控关键结构基因, 使有害代谢物的量降低甚至消失, 或者削减支路代谢流对主路代谢流的影响, 理论上可以提高预期方向的代谢流量及改变代谢流的分配, 从而使主路目的代谢物的量提高^[1-2]。目前已有数种次生代谢产物在转基因植物和体外培养的细胞中得到了表达^[3-9]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指外

源或内源双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 引发生物体内的同源 mRNA 的特异性降解, 从而表现出的基因转录后的沉默现象。RNAi 自 20 世纪 90 年代中期被发现以来, 就被广泛应用于基因功能的分析验证, 成为后基因组学研究的热点。RNAi 技术具有专一性强、抑制效率高、可大规模操作、重复性好及在植物中可以孟德尔方式遗传等优点。已证实 1~100 mmol/L 浓度的 dsRNA 对目的基因的沉默效率是一致的, 充分体现出 RNAi 沉默效率是相当高的^[10]。因此, 近年来这一技术在植物的光合作用、信号转导、发育生物学、代谢调控及作物

收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 东北林业大学本科创新课题 (201510225155); 国家自然科学基金资助项目 (31570589); 中央高校基本科研业务费资助 (257-2015DY01)

作者简介: 曲子越 (1995—), 女, 本科, 主要研究方向为植物生物技术。

*通信作者 尹 静, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为植物次生代谢调控与细胞工程利用。E-mail: yinjing20135@163.com

质改良等各个领域中都得到应用,成为当前探索植物基因功能的一个有力工具^[11-21]。本文系统概述了 RNAi 技术发生机制、RNAi 载体构建方法、原理及其在代谢调控中的应用进展,以期利用 RNAi 技术进行代谢工程调控研究奠定理论基础和提供技术参考。

1 RNAi 原理

RNAi 是由 dsRNA 引发的序列特异性基因沉默。RNAi 目前在不同的物种均有应用,以抑制基因的功能,并且在功能性基因组分析中也作为常用的工具。有 2 种类型的 RNA 即 dsRNA 和短小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),在介导基因沉默中起主要作用。dsRNA 作为降解 RNA 引发条件,而 siRNA 参与了 RNAi 最后降解靶 RNA 的步骤。RNAi 可分别发生在转录、转录后以及翻译水平上^[22-24]。

转录后的基因沉默(post RNA-transcriptional gene silencing, PTGS)是在植物中被第一次发现的,通过人为地引入与内源靶基因具有相同序列的 dsRNA,使内源 RNA 序列降解,从而抑制基因表达。外源或内源的 DNA、RNA 激发细胞产生相应的 dsRNA,然后 dsRNA 被一种称为含有 Rnase III 结构域的 Dicer 酶切割成 21~26 nt 的 siRNA 和微小 RNA (microRNA, miRNA),siRNA 又与 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合。RISC 是一种蛋白-RNA 效应核酸酶复合物,由核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等组成,对靶 mRNA 具有识别和切割作用,结合了 siRNA 的 RISC 被 ATP 活化,活化形式的 RISC 解开 siRNA 双链,通过碱基互补配对识别同源性的 mRNA 并将其降解(图 1)。siRNA 还可能引发 RNA 指导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)而导致转录水平上的沉默^[25]。

2 RNAi 载体的构建方法

RNAi 技术过程大体包括以下几个环节:(1)确定目的基因;(2)设计 RNAi 序列;(3)获得 RNAi 产物;(4)RNAi 转染;(5)检测 RNAi 的作用效果。其中又以 siRNA 分子设计和 siRNA 表达载体构建最为关键。构建常规植物 RNAi 表达载体时,启动子和内含子序列及结构特征是首先考虑的;靶基因反向重复片段的长度和位置的选择、启动密码子和终止密码子上下游序列及翻译起始位点序列都

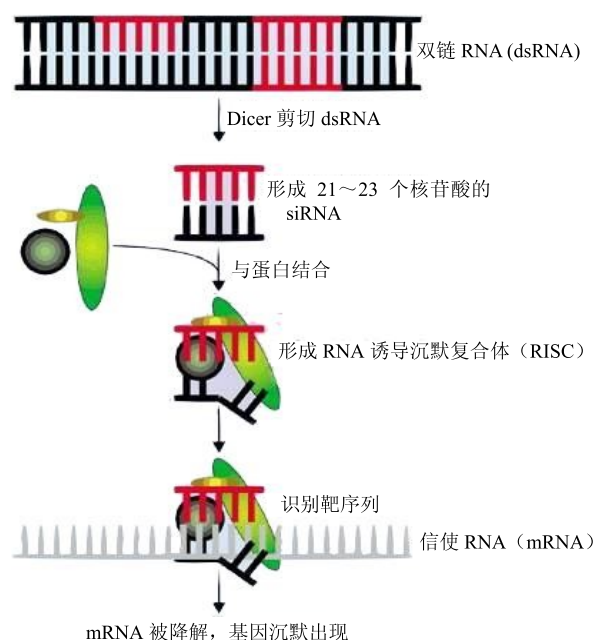


图 1 RNAi 的基本过程

Fig. 1 Basic process of RNAi

将影响基因沉默的效率和效果。有研究显示,在植物各种 RNA 结构中,具有内含子的发夹结构 RNA (intron-containing hairpin RNA, ihpRNA) 的沉默效率是几种发夹 RNA 结构中最高,有 80%~100% 的转化体的目标基因被沉默,这种形式的发夹 RNA 是通过选择 1 个可进行拼接的内含子片段作为发夹结构中的环形空间序列。因此, RNAi 载体的构建是通过基因同源序列的正义片段、内含子和反义片段相连从而形成发夹结构引发 RNAi 反应。目前植物研究中,主要的 RNAi 载体构建方法包括传统的酶切-连接方法、Gateway 技术法、DA-ihpRNA 法、OZ-LIC 法、pGRNAi 载体法、pRNAi-GG 载体法等。

2.1 酶切-连接方法

传统方法通过酶切-连接的方式构建 RNAi 载体,即分别将正义和反义片段与中间的发夹环结构的序列通过酶切与连接反应相连,插入表达载体或干扰载体,如 pHANNIBAL 和 pKANNIBAL 等。但是,当构建只含有 1 个目的基因的 RNAi 载体时就会需要 4 个载体上的酶切位点,且在目的片段中均不含有这 4 个酶切位点,这种对载体的选择会受到限制。如果目的基因增加,酶切位点也随之增加,构建干扰载体就更难。另外,构建载体时,每一步酶切后均需要回收,回收效率也是构建载体的限制条件之一。所以,传统的酶切-连接方法受到诸多因素的限制,不适合多基因 RNAi 载体构建^[26]。

2.2 Gateway 技术

Invitrogen 公司开发的 Gateway 技术是基于 λ 噬菌体位点特异重组系统进行的改造 ($\text{attB} \times \text{attP} \rightarrow \text{attL} \times \text{attR}$)，由 BP 和 LR 2 个反应构成。BP 反应利用 1 个 attB DNA 片段和 1 个 attP 供体载体之间的重组反应，创建 1 个入门克隆。LR 反应是 1 个 attL 入门克隆和 1 个 attR 目的载体之间的重组反应。LR 反应用来在平行的反应中转移目的序列到 1 个或更多个目的载体。而基于 Gateway 克隆系统的 RNAi 载体，如 pHELLSGATE 系列被广泛应用于构建 ihpRNA (图 2)。在该体系中，由含有相应 attB1 和 attB2 位点的引物合成的 1 个 PCR 产物能够同时整合到载体中，从而形成发夹的双臂^[27]。

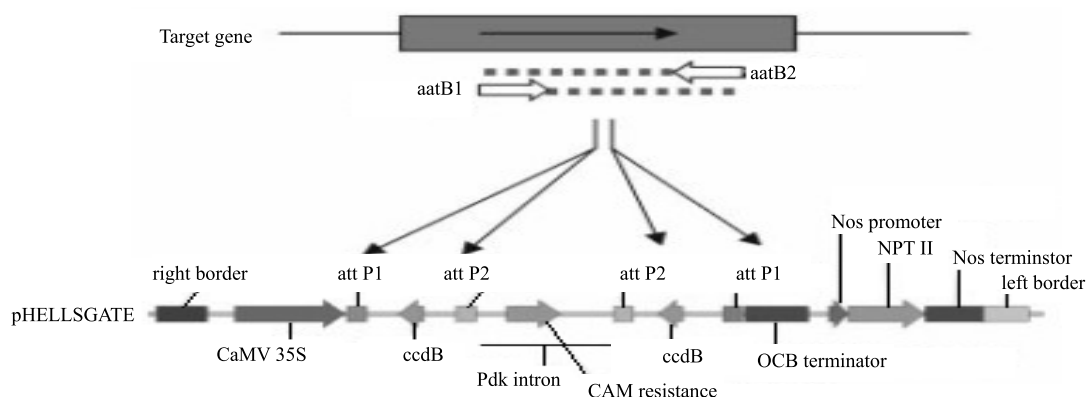


图 2 Gateway 技术构建 RNAi 载体的过程

Fig. 2 Process of constructing RNAi vector by Gateway technology

2.3 DA-ihpRNA 法

Xiao 等^[29]以基因组 DNA 为模板利用 DA-ihpRNA (direct amplification of intron-containing hairpin RNA) 方法构建 ihpRNA 结构，以 1 个外显子反向重复序列互补形成发夹结构的茎部，并且以该外显子旁侧上游的内含子作为发夹结构的环形部分。构建过程^[29]见图 3，利用基因组 DNA 中内含子 2 侧不同的外显子序列 exon1 和 exon2，分别设计 exon2 序列的含有旁侧序列引物 (FP) 和低浓度的根据 exon1 设计的桥式引物 (BP)。应用不对称 PCR 反应，在早期循环中，使含内含子和 exon2 的片段指数扩增。在最后的循环中，桥式引物耗尽。由于桥式引物 (BP) 的 5' 末端有 1 段加尾序列，该序列与 exon2 的 5' 端序列为反向互补，因此其产物 3' 端在该链内部进行互补或与其他链互补序列复性后，能够起始合成 exon2 的反向互补链。但是该方法的局限性在于目标片段的选择，对于不含内含子

用 Gateway 的 LR 反应构建表达载体时不需要对 DNA 分子进行酶切和连接，也不需要 DNA 片段进行回收，只需要把 2 种 DNA 分子混合并加入 DNA 整合或切离所需要的蛋白质就能完成表达载体的构建，所以利用 Gateway 的 LR 反应可以快速构建目的基因的各种表达载体，省去酶切与连接等费时又繁琐的过程。Helliwell 等^[28]研究构建了含有 FLC (控制开花的基因座 C) 和八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 基因的植物表达载体，用植物表达载体转化拟南芥可以高效沉默 FLC 和 PDS 基因，比传统的酶切-连接方法更简单快捷。然而该方法经常要求 2 步克隆，包括 BP 和 LP 反应才能形成最终的 ihpRNA。此外，Gateway 体系所用的试剂较贵，研究成本较高。

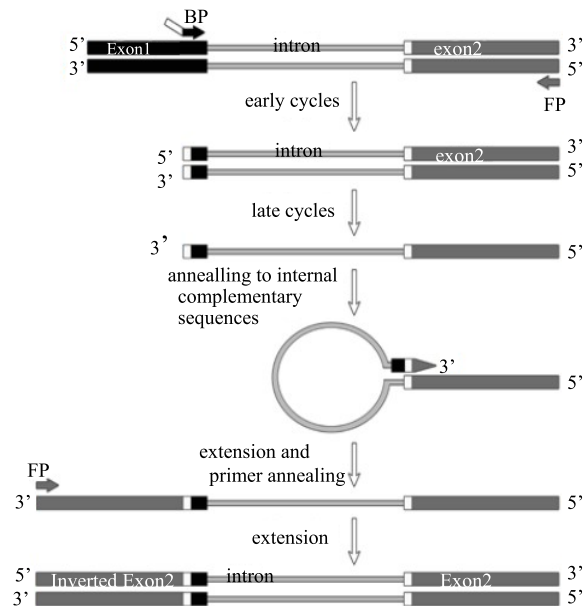


图 3 DA-ihpRNA 载体构建过程

Fig. 3 Construction process of DA-ihpRNA vector

的基因或某些只有 EST 序列的基因则无法使用。

2.4 OZ-LIC 法

Xu 等^[30]应用一步、零背景、不依赖连接酶克隆法 (one step, zero background ligation-independent cloning, OZ-LIC), 只需将不同的 LIC 旁侧序列的 2 个目的基因 PCR 产物以及 SmaI 线性化的 pRNAi-LIC 载体通过 T₄ DNA 聚合酶分别处理, 然后将含有 DNA 的混合物

直接转化到大肠杆菌中, 该载体以 pCambia2300 表达载体为基础, 且其载体含有 ccdB 自杀基因以及在 pdk 内含子中含有 1 个氯霉素的筛选标记, 并通过 4 个旁侧序列 (LIC1~4) 和 3 个 SmaI 位点实现零背景, 既高效又快速。然而该方法仍需要 2 轮 PCR 反应, 扩增 2 个含有不同接头的重复片断 (图 4), 及在使用 LIC 前需要一步限制酶消化使载体线性化。

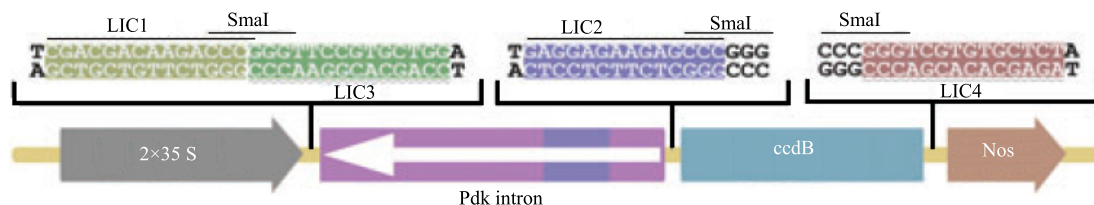


图 4 OZ-LIC 方法构建的 ihpRNA 载体

Fig. 4 Construction of ihpRNA vector by OZ-LIC method

2.5 pGRNAi 载体法

Manamohan 等^[31]构建 1 种 RNAi 载体, 命名为 pGRNAi。该载体提供多个酶切位点, 为获得干扰片段提供更多选择, 由于内含子 2 侧的酶切位点为相反顺序, 所以只需 1 步 PCR 反应获得含有酶切位点的目的片段, 通过 1 步酶切-连接即可获得含有目的基因的 RNAi 载体。该载体的构建具有单步、经济、简单、快速的特点, 简化了目的基因片段形成 ihpRNA 的过程, 促进了高通量的基因沉默在植物中的运用。

2.6 pRNAi-GG 载体法

Yan 等^[32]采用 golden gate (GG) 克隆方法发明了 1 个更为简单的体系来构建 RNAi 结构。该植物 RNAi 载体是由 pB121 植物双元表达载体改造而成。在该载体的 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子间添加了 1 个 ccdB 基因-pdk 内含子-ccdB 基因的序列 (图 5)。2 个 ccdB 基因的 2 侧均具有 BsaI 酶切识别位点, 第 1 个 ccdB 基因左侧的 BsaI 识别位点与第 2 个 ccdB 基因右侧相同, 但方向相反; 另一侧亦是。这便允许带有 BsaI 识别位点的目的基因干扰片段的酶切产物将两端的 ccdB 片段替换下来, 并形成发夹的双臂结构。其中 ccdB 自杀基因能够使转化后干扰基因没有连入载体大肠杆菌死亡, 可呈现零背景, 并且在 pdk 内含子中具有 1 个氯霉素抗性基因, 能够进一步筛选工程菌, 实现高效率合成。

pRNAi-GG 载体构建方法中的载体能够简便、高效地构建 ihpRNA。该方法利用 II 型限制性内切

酶 BsaI 和该植物 RNAi 载体 pRNAi-GG, 只需要目的基因的 PCR 产物加 1 个 BsaI 可识别的旁侧序列, 通过一步酶切-连接反应同时将正向和反向片断定向克隆到 pRNAi-GG 载体中而形成 ihpRNA。该方法简单、高效, 通过 1 步反应, 具有 ccdB 自杀基因筛选的零背景特点, 已经成功地应用于合成 ihpRNA 结构, 能够同时有效地沉默多种独立的内源及外源标记基因。梁甜等^[33]采用 pRNAi-GG 方法成功构建了白桦 BPX、BPD 及其双基因 RNAi 载体, 并成功转化白桦无性系, 实现了白桦三萜固醇分支途径的阻断, 调控前体物质角鲨烯向目标产物白桦酯酸、齐墩果酸方向高效合成。

2.7 以 miRNA 为基础构建 RNAi 载体

miRNA 是一类内源单链非编码小分子 RNA, 约为 22 nt, 广泛存在真核生物中。miRNA 和靶 mRNA 通过特异的碱基配对结合, 形成 RISC 沉默复合体, 阻碍基因的正常表达^[34-35]。人工 miRNA 技术指利用 miRNA 的表达特性, 使用生物体内源的 miRNA 前体作为人工 miRNA 的表达框架, 产生小分子 RNA 介导的靶基因沉默^[36-39]。Weigel 等^[40]建立了 1 个人工 miRNA 设计平台, 在 WMD3 (Web MicroRNA Designer, <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) 系统中, 可以对 100 多种植物设计人工 miRNA。Weigel 等^[40]提供了基于拟南芥 miR319a、水稻 miR528、莱氏衣藻的 pChlamiRNA2/3 载体作为构建人工 miRNA 的模板, 用 PCR 方法替换载体上 miRNA 片段, 构建成人工 miRNA 表达载体。人工 miRNA 技术是一项新兴的生物技术, 具

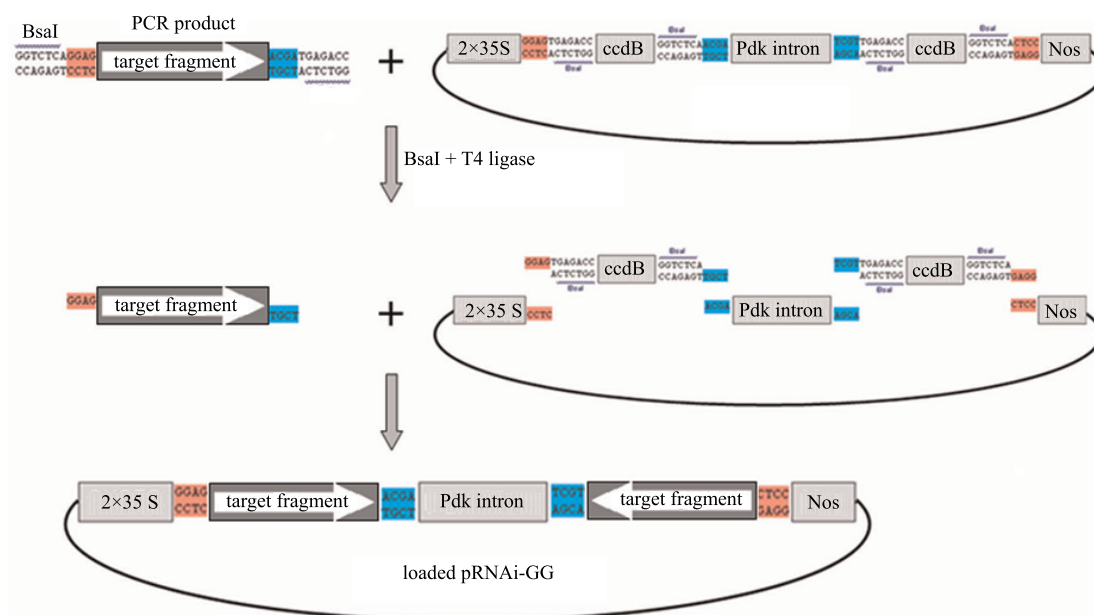


图 5 pRNAi-GG 载体构建过程

Fig. 5 Construction process of pRNAi-GG vector

有高效、精确、可控等优点，是替代 RNAi 的有效工具。几乎所有可以利用 RNAi 的地方都可以用人工 miRNA 替代。与 RNAi 技术相比，人工 miRNA 具有独特的优势，可以同时干涉多个序列具有同源性的基因，因此可以用来研究多拷贝的基因或功能存在互补效应的基因；利用人工 miRNA 可以建立基因沉默的突变体库，进行基因组功能研究^[40]。

3 RNAi 介导基因沉默调控植物次生代谢产物合成

RNAi 是细胞内的基因调控机制，其作用过程具有高稳定性、高效性、高特异性、高传递性、共抑制性、长度限制性等特点。通常的代谢途径中会出现几个分支，分支处的前体化合物会进入不同的代谢途径，这样催化不同途径的首步参与反应的酶会互相竞争底物。用基因工程的方法提高目标途径的酶活力或抑制其他途径的酶活力，理论上可以提高预期方向的代谢流量。在植物代谢工程中，该方法也常用来改变代谢流的分配。近年来 RNAi 技术在减少靶基因的表达，从而抑制竞争性代谢途径，调控目标物质产量方面的研究陆续被报道^[41-45]。

3.1 RNAi 对黄酮类化合物的调控

Mahmoud 等^[43]通过修饰代谢基因，阻断了薄荷植株体内合成薄荷呋喃的代谢支路，成功地获得了薄荷呋喃明显减少的工程植株，使得薄荷油中薄荷酮和薄荷的量提高。Zuker 等^[44]在转基因康乃馨植株的代谢调控研究中，通过反义策略抑制黄烷酮-3-

羟化酶 (F3H) 基因的表达，改变了植株体内原有的花色苷代谢物流方向，促使该途径新合成甲基苯前体物质苯酸，转基因植株除了花色发生改变外，还增加了其香味成分。Rao 等^[3]在转基因西红柿中利用 RNAi 能够非常有效地降解 DET-1 转录体，从而显著提高类胡萝卜素和黄酮醇的量，而果实的其他营养品质却没有大改变。孙家旗等^[7]构建猕猴桃的查耳酮合成酶 (CHS) 基因 RNAi 的载体，并注入果实底部的花后，猕猴桃果实的颜色与注入空载体后的果实相比果肉颜色变浅，通过检测表明，CHS 基因的表达量明显降低，且花青素的量也降低。Xiao 等^[15]通过 RNAi 调控草莓的 DFR 基因表达，天竺葵色素苷、花青素苷和山柰苷分别减少了 93.3%、97.2% 和 55.6%。Jiang^[18]通过 RNAi 技术同时沉默大豆的 F3H 和 GmFNS II 基因，结果表明，与单独沉默 2 个基因相比，双基因干扰更有利于总异黄酮的积累。

3.2 RNAi 对萜类化合物的调控

Han 等^[16]对人参的达玛烯二醇合酶 (DDS) 基因进行 RNAi，由于 DDS 基因被沉默，导致人参的根中人参皂苷的量下降了 84.5%。由此证明，DDS 在人参皂苷的生物合成途径中起到至关重要的作用。刘天巍等^[17]将构建含有人参鲨烯环氧酶基因片段的 RNAi 载体转入人参愈伤组织中，通过高效液相色谱检测 6 种单体皂苷的量，其中人参皂苷 Rg₁、

Re、Rc 的量均有不同程度的降低。赵寿经^[19]通过干扰人参发根中 CS 基因的表达从而达到提高人参皂苷积累的目的,结果表明,随着 CS 基因的表达抑制,人参总皂苷的量可提高 82.17%。李科志^[42]首次利用 RNAi 技术沉默绞股蓝鲨烯合酶(SS)基因,从而对绞股蓝三萜皂苷生物合成途径与其调控的分子机制有了深入的研究,通过人工调控该代谢途径,进而达到提高绞股蓝三萜皂苷的量的目的。龚文芳等^[9]通过构建含有番茄红素 β -环化酶(LycB)基因 RNAi 载体沉默 LycB 基因,发现转基因的雨生红球藻番茄红素的积累量虽然增加,但也合成了其他产物,因此想要大幅度提高雨生红球藻番茄红素的积累,需要同时抑制其他代谢通路才得以实现。

3.3 RNAi 对生物碱类的调控

Allen 等^[46]首先在罂粟 *Papaver somniferum* L. 中克隆到了可待因还原酶(codeinone reductase, COR)基因。在利用 RNAi 技术进行 COR 基因沉默后,在转基因的罂粟中,前体番荔枝碱以及其甲基衍生物都比未转化的植株有很大的积累,而可待因、吗啡以及蒂巴因的量大大地降低,并提高了抗癌、抗疟疾药物番荔枝碱的积累。经过改造,可以将罂粟这种经济作物用于新的医药制造业,而将可待因和吗啡的量降低,将有助于控制罂粟的非法用途。王鹏^[47]通过 RNAi 介导的 PM7 基因抑制,不仅使目标代谢物尼古丁的量降低(不到对照的 10%),而且通过扩大样本数量,获得了一系列的尼古丁量较低的烟草,并在研究尼古丁合成主路与支路关系的过程中,发现了新的代谢调控模式。可见, RNAi 技术可有效应用于植物代谢产物生物合成的调控。

4 存在的问题与展望

天然产物被广泛用于人类生活的各个领域,包括药品、香料、调味品、农化产品、生物杀虫剂、染色剂以及食品添加剂等,而植物次生代谢物是天然产物的主要来源。虽然化学合成技术获得了长久的进步,但多数传统的植物来源天然产物还是通过提取方式来获取。通过代谢工程的方法提高目标天然产物的量,对于经济、资源和环境保护等问题的解决是一种有效途径。RNA 介导的基因沉默(RMGS)技术在植物代谢工程中的应用,不仅在改良植物的营养及其他性状中起重大的作用,而且在植物代谢调控模式的研究中扮演重要的角色。

由于应用 RNAi 技术所获得的转基因植物中既

不存在有功能的基因或蛋白,也不存在转基因 mRNA 的积累,因而没有发生互补、异源包壳、协生和重组的风险,符合人们对生物安全性的高要求。但是,要实现常规化、可预见性、高效性以及商业应用,还有大量问题需要研究和解决,如用于植物 RNAi 的有效载体(沉默效率高、副作用少、有组织或器官特异性)种类还有限;植物特异组织和器官的靶基因沉默不能控制在特定的时空,要使对正常的植物生命周期的干扰达到最小或无,在发育不同时期或不同器官中有选择地进行还很困难。另外,还没有切实可行的选择靶标基因片段的规则或理论依据,上述问题仍需深入研究和探讨。

同时,作为靶向基因敲除、基因修饰的分子生物学工具,转录激活因子效应物核酸酶(transcription activatorlike effector nuclease, TALEN)因其合成和设计容易、特异性高、毒性低等优点,在动植物基因编辑方面发挥重要作用^[48-49]。CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术也是使用一段序列特异性向导 RNA 分子(sequence-specific guide RNA)引导核酸内切酶到靶点处,从而完成基因组的编辑。科学家们利用这一系统在活体动物基因组中生成靶向突变,删除原有的基因或插入新基因^[50]。TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术自成功应用以来,已迅速应用于多种生物的研究中,相较于传统的转基因技术而言是高效、精准的,其操作更加简便,敲除效率更高,大大降低了脱靶机率。CRISPR/Cas9 植物基因敲除能够适用于几乎所有植物细胞的基因修饰研究,可应用于基因组的特异性定点改造、合成生物学、基因定向干扰或者多重基因干扰(即基因网络干扰)和基因治疗等领域^[51-53]。可以预见,未来随着 RNAi 技术的进一步完善和 TALEN、CRISPR/Cas9 技术的应用,将会极大促进植物次生代谢调控分子机制的解析及有用代谢产物的利用。

参考文献

- [1] Takagi K, Nishizawa K, Hirose A, *et al.* Manipulation of saponin biosynthesis by RNA interference-mediated silencing of β -amyrin synthase gene expression in soybean [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(10): 1835-1846.
- [2] Shintanid D D. Elevating the Vitamin E content of plants through metabolic engineering [J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2098-2100.
- [3] Rao G, Ageeth D, Tuinen A, *et al.* Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances

- carotenoid and flavonoid content in tomatoes [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 890-895.
- [4] Coleman H, Park J, Nair R, *et al*. RNAi-mediated suppression of *p*-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4501-4506.
- [5] Allen R S, Millgate1 A G, Chitty J A, *et al*. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1559-1566.
- [6] Mositer N, Wyman B, Elander R, *et al*. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Biore Technol*, 2005, 96(6): 673-686.
- [7] 孙家旗, 唐 维, 刘永胜. 猕猴桃 CHS 基因 RNA 干扰载体在果实中的瞬时表达可以有效影响花青素积累 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 929-933.
- [8] 李兴涵, 费小雯, 邓晓东. 莱茵衣藻磷酸果糖激酶 RNAi 载体构建及其对莱茵衣藻油脂积累的影响 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(10): 155-159.
- [9] 龚文芳, 路立京, 刘 鑫, 等. 沉默 *lycB* 基因对雨生红球藻类胡萝卜素合成代谢的影响 [J]. 遗传, 2013, 35(2): 233-240.
- [10] Holen T, Amarzguoui M, Wiiger M T, *et al*. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(8): 1757-1766.
- [11] Wang M, Helliwell C, Wu L, *et al*. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants [J]. *RNA*, 2008, 14(5): 903-913.
- [12] Day A, Neutelings G, Nolin F, *et al*. Caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase down-regulation is modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(1): 9-19.
- [13] Zhong R, Lee C, Ye Z. Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 1044-1055.
- [14] 王 雷, 种 康, 许智宏. 植物功能基因组学研究的有效工具-RNAi 技术 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(6): 705-710.
- [15] Xiao L, Min X, Yun L, *et al*. The effect of RNAi-induced silencing of FADFP on anthocyanin metabolism in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruit [J]. *Sci Hort*, 2013, 160(2): 123-128.
- [16] Han J, Kwon Y S, Yang D C, *et al*. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarediol aynthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Phys*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [17] 刘天巍, 任 丽, 杨广顺, 等. 人参 SE 基因 RNAi 载体的构建及转化 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(4): 83-87.
- [18] Jiang Y N, Hu Y L, Wang B, *et al*. Bivalent RNA interference to increase isoflavone biosynthesis in soybean (*Glycine max*) [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2014, 57(2): 163-170.
- [19] 赵寿经, 安 岩, 孟 洋, 等. 干扰环阿齐醇合酶基因的表达对人参皂苷含量的影响 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2014, 44(6): 1867-1870.
- [20] 毛颖波, 薛学义, 陈晓亚. 植物小 RNA 与 RNA 干扰: 生物学功能与应用前景 [J]. 中国科学: C 辑, 2009, 39(1): 31-43.
- [21] Miki D, Shimamoto K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice [J]. *Plant Cell Phys*, 2004, 45(4): 490-495.
- [22] Ali I, Husnain T, Riazuddin S. RNA Interference: the story of gene silencing in plants and humans [J]. *Biot Adv*, 2008, 26(3): 202-209.
- [23] Hannon G J. RNA Interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [24] Baulcombe D. RNA Silencing in plants [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363.
- [25] Hamilton A J, Baulcombe D C. A Species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.
- [26] 栗 挺, 刘爱玲, 陈信波. RNA 干扰载体构建方法的研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2011, 10(19): 1-4.
- [27] Earley K W, Haag J R, Pontes O, *et al*. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics [J]. *Plant J*, 2006, 45(4): 616-629.
- [28] Helliwell C, Waterhouse P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30(4): 289-295. .
- [29] Xiao Y H, Yin M H, Hou L, *et al*. Direct amplification of intron-containing hairpin RNA construct from genomic DNA [J]. *Biotechniques*, 2006, 41(5): 548-552.
- [30] Xu G, 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.
- [31] Manamohan M, Sharath C G, Asokan R, *et al*. One-step DNA fragment assembly for expressing intron-containing hairpin RNA in plants for gene silencing [J]. *Anal Biochem*, 2013, 433(2): 189-191.
- [32] Yan P, Shen W, Gao X Z, *et al*. High-throughput

- construction of intron-containing hairpin RNA vectors for RNAi in plant [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): 381-386.
- [33] 梁 甜, 尹 静, 张梦岩, 等. 白桦环阿齐醇合成酶 (CAS) 基因及其与达玛烯二醇合成酶 (DS) 双基因 RNA 干扰载体构建 [J]. 植物研究, 2015, 35(3): 355-362.
- [34] 王 磊, 范云六. 植物中微小 RNA (microRNAs) 研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2007, 3(9): 18-23.
- [35] 彭建斐, 戴良英, 何玉科, 等. 水稻微小 RNA 研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2010(15): 4-6.
- [36] Schwab R, Ossowski S, Riester M, *et al.* Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121-1133.
- [37] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, *et al.* Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1134-1151.
- [38] Niu Q W, Lin S, Reyes J L, *et al.* Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1420-1428.
- [39] Parizotto E A, Dunoyer P, Rahm N, *et al.* *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA [J]. *Gen Dev*, 2004, 18: 2237-2242.
- [40] Weigel D, Warthmann N, Chen H, *et al.* Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice [J]. *PLoS One*, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0001829.
- [41] Boutla A, Kalantidis K, Tavernarakis N. Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing [J]. *Nucl Acids Res*, 2002, 30(7): 1688-1694.
- [42] 李科志. RNA 干扰技术在绞股蓝鲨烯合酶基因功能研究中的应用 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2011.
- [43] Mahmoud S S, Croteau R B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(24): 14481-14486.
- [44] Zuker A, Tzfira T, Benmeir H, *et al.* Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene [J]. *Mol Breeding*, 2002, 9(1): 33-41.
- [45] 柳忠玉, 赵树进. 虎杖查耳酮合酶基因 RNAi 载体的构建及其遗传转化 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 412-417.
- [46] Allen R S, Millgate A G, Chitty J A, *et al.* RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1559-1566.
- [47] 王 鹏. 通过 RNA 介导的基因抑制对烟碱代谢调控的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [48] Reyon D, Tsai S Q, Khayter C, *et al.* FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-465.
- [49] Cermak T, Doyle E L, Christian M, *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, doi: 10.1093/nar/gkr218.
- [50] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [51] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [52] 解莉楠, 宋凤艳, 张 旸. CRISPR/Cas9 系统在植物基因组定点编辑中的研究进展 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1669-1677.
- [53] 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): 1101-1108.