

香稻 *PRO* 基因的克隆及表达载体的构建

田 华¹, 徐春霞², 段美洋¹, 黎国喜¹, 唐湘如¹

(1. 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642; 2. 云南省农业科学院 粮食作物研究所, 云南 昆明 650205)

摘要: 利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)得到在水稻中特异性表达的脯氨酸氧化酶(*PRO*) 基因。DNA 序列分析表明, 所获得水稻的 *PRO* cDNA 的最大开放阅读框序列全长为 1 428 bp, 可编码 476 个氨基酸。该序列与 NCBI 网站上已发表的 *PRO* 基因 100 % 相似。为了能进一步验证所克隆的序列是我们所需的的目的基因, 成功构建了 *PRO* 基因超表达载体和 *PRO* 基因干涉载体, 便于导入水稻中进行基因的功能鉴定。

关键词: 香稻; 脯氨酸氧化酶; 基因; 克隆; 表达载体

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2009)03 - 0032 - 05

Cloning of *PRO* Gene from Aromatic Rice and Constructing of Its Expression Vector

TIAN Hua¹, XU Chun-xia², DUAN Mei-yang¹, LI Guo-xi¹, TANG Xiang-ru¹

(1. College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Food Crops, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: By RT-PCR method the cDNA of *PRO* gene was obtained. Analysis of DNA sequence showed that the largest open reading frame sequence of *PRO* cDNA was 1 428 bp, which could encode 476 amino acids. The sequence with the NCBI web site has been published by the *PRO* gene 100 % similarity. In order to further verify the sequence by which we cloned the gene required for the successful construction of a over expression *PRO* gene vector and interference expression *PRO* gene vector, to facilitate the import of rice carried out to identify the function of genes.

Key words: Aromatic rice; Proline oxidase; Gene; Cloning; Expression vector

香稻是水稻中的珍品, 如何在保证香稻产量和品质的基础上, 提高我国香稻米的香气含量, 是近年来我国重点关注的问题之一。大多数学者一致认为 2-乙酰-1-吡咯啉(简称 2-AP) 是香稻香气的主要成分^[1-7]。也有报道说某些水稻品种的香气成分可能是 α -吡咯烷酮^[8-10]。然而, 2-AP 在香稻体内是怎样形成的研究甚少。Tadashi^[11]对 KDML105 的研究发现, 当提取液中存在较多的脯氨酸、鸟氨酸和谷氨酸时, 2-AP 的含量增加, 并随着脯氨酸的增加, 2-AP 的含量是对照的 3 倍多。示踪试验结果表明 2-AP 的氮源来自脯氨酸, 所以认为脯氨酸是 2-AP 合成的主要前体物质, 其次为谷氨酸和鸟氨酸。另外脯氨酸和鸟氨酸的基本碳架则来源于谷氨酸^[12]。由上可知, 脯氨酸是香气形成主要前体物质。但是, 到现在为止也没有学者报道形成香气的关键酶是什么, 所

以本研究的目的就是应用 RNA 干扰技术和超表达技术调控香稻中脯氨酸氧化酶(Proline oxidase, *PRO*) 的活性, 进一步能从分子水平上深入探讨 *PRO* 在香稻形成中的作用机制, 看是否是香气形成的关键酶, 并且也能探明 *PRO* 是否是香气形成过程中主要的前提物质, 从而还可以发掘其新的生理功能。

本研究以香稻为材料, 对其 *PRO* 的 cDNA 序列进行克隆和测序, 并成功构建了 *PRO* 基因超表达载体和 *PRO* 基因干涉载体, 进一步为导入香稻中进行基因的功能鉴定奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

农杆菌菌株(EHA105)和大肠杆菌菌株(DH10B、DH5、TOP10)为本实验室所保存。干涉和

收稿日期: 2009 - 03 - 04

基金项目: 中国博士后科学基金(20070420142); 国家自然科学基金项目(30671221); 高等学校博士学科点专项科研基金(4100 - C08023);

广东省自然科学基金项目(8151064201000017); 广东省农业攻关重点专项(2006A20303001)

作者简介: 田 华(1977 -), 女, 蒙古族, 内蒙古临河人, 博士后, 讲师, 主要从事植物分子生理研究。

通讯作者: 唐湘如(1964 -), 男, 湖南宁乡人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事作物栽培和生理研究。

超表达所用组成型载体 pRNAi-Ubi 由华南农业大学刘耀光研究员提供^[13]。测序由上海博亚测序公司完成。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶, T_4 -DNA 连接酶, 高保真 KOD-plus DNA polymerase 及 DNA 回收试剂盒均购自大连宝生物公司, 引物由上海生工生物工程公司代为合成, 其他生化试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计

Primer5.0 设计特异引物, 然后作 RT-PCR 扩增, 扩增产物即为要装载的基因目的片段。试验中所用引物序列如下: 扩出 *PRO* cDNA 最大开放阅读框序列 (1 428 bp) 的引物 (PRO-F: 5'-ACTTGGAAGCTTCAGGCACAAATCCGACCTTC-3'; PRO-R: 5'-AATATCACGCGTTTACCGGAGCAGCTGICTGTG-3'); 扩出 *PRO* cDNA 全长序列中的一部分 (582 bp) 的引物 (PRO-RNAi-F: 5'-ATAGTAGGATCCGACGAAGCTGCATGGAAAG-3'; PRO-RNAi-R: 5'-ATATACAACTTACGCTGCCCGGACTCGACGTT-3')。

1.4 RT-PCR 扩增目的片段

以水稻叶片材料的 cDNA 为模板, 扩 *PRO* cDNA 的最大开放阅读框序列 (1 428 bp) 用引物 PRO-F 和 PRO-R, 高保真 KOD-plus DNA polymerase 进行 PCR, 94 3 min 一个循环; 94 40 s, 58 40 s, 72 1.5 min, 25 个循环; 72 延伸 5 min。扩 *PRO* cDNA 全长序列中的一部分 (582 bp) 用引物 PRO-RNAi-F 和 PRO-RNAi-R, 高保真 KOD-plus DNA polymerase 进行 PCR, 94 3 min 一个循环, 94 40 s, 55 40 s, 72 40 s, 30 个循环后, 72 延伸 5 min。2 个 PCR 产物 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PRO 超表达载体 (简称 pOVER-PRO) 和干涉表达载体 (简称 pRNAi-PRO) 构建

载体 pOVER-PRO 构建 PRO-F 和 PRO-R 引物分别引入了 *Hind* III 和 *Mlu* I 两个酶切位点, 在组成型载体 pRNAi-Ubi 上也有单一的 *Hind* III 和 *Mlu* I 酶切位点, 用试剂盒回收相应的 *PRO* 全长目的片段, 用 T_4 连接酶连接, 构建成含有 *PRO* 基因插入的超表达载体 pOVER-PRO。

载体 pRNAi-PRO 构建: 为了能够正确地将目的基因片段插入到干涉所用组成型载体 pRNAi-Ubi 的多克隆位点区 1 (MCS1) 之间, 在引物的 5 端分别设计了加上了酶切位点和保护碱基, 其中 PRO-RNAi-F 加 *Bam* H I 酶切位点, PRO-RNAi-R 加 *Hind* III 酶切位点, RNAi 转化载体的构建需要将目的片

段分别以正向和反向的形式插入到 MCS1 和 MCS2, 在多克隆位点区 1 (MCS1) 有 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切位点, 在 MCS1 两侧有通用引物 *Mlu* Kpn (RNAi-*Mlu* I: 5'-CACCTGACCCGTGGT GTTACTTCTGAAGAGG-3') 和 *Apa* Pst2 (RNAi-*Pst* I: 5'-ACTAGAACTGCAGCCTCAGATCTACCATGGTTCG-3') 的结合位点, 上游引物 *Mlu* Kpn 上带有 *Mlu* I 酶切位点, 下游引物 *Apa* Pst2 上带有 *Pst* I 酶切位点; 在多克隆位点区 2 (MCS2) 有 *Pst* I 和 *Mlu* I 酶切位点, 酶切位点 *Pst* I 位于上游, *Mlu* I 则位于下游, 这样在连入第一个目的片段后, 利用 pRNAi 上的通用引物 *Mlu* Kpn 和 *Apa* Pst2 就可以扩增出带有 *Mlu* I 和 *Pst* I 两个酶切位点的目的片段, 将目的片段和载体分别用 *Mlu* I 和 *Pst* I 双酶切后连接, 则相对于第一次连接, 目的片段反向连接到 MCS2 处, 形成反向重复序列, 由于反向重复序列由一个共同的启动子控制, 经转录后就可形成含内含子的具发夹环结构的 dsRNA。

1.6 感受态细胞的制备和细菌转化

农杆菌菌株 (EHA105) 和大肠杆菌菌株 (DH10B、DH5、TOP10) 感受态制备用 $CaCl_2$ 方法。大肠杆菌和农杆菌的转化分别采用热激法及冻融法^[14]。

2 结果与分析

2.1 水稻 PRO 基因的生物信息学分析

根据 GenBank 里可利用的数据, 在 NCBI 网站所搜索到的结果为: 水稻 *PRO* 的 cDNA 全基因的最大开放阅读框 (ORF) 序列大小为 1 428 bp, 编码一个 476 个氨基酸的蛋白质 (图 1)。通过 RCP 网站的自动基因预测 <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/> 搜索得知 *PRO* 在第 10 染色体上。

2.2 水稻总 RNA 的提取

本试验以香稻叶片为材料提取香稻叶片总 RNA, 经 1 % 变性琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 所提 RNA 未发生降解; 紫外分光光度计分析其浓度和纯度, 其 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$, $OD_{260}/OD_{230} > 2$, 纯度和完整性符合试验要求。

2.3 RT-PCR 扩增目的片段

以水稻 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 顺利地扩增出符合大小的 *PRO* 基因最大开放阅读框 (图 3)。扩增片段的特异性强, 无非特异带; 大小为 1.4 kb 左右, 与报道的 *PRO* 基因的 cDNA 序列大小相符, 初步确定扩增片段为目的片段。同理也以水稻 cDNA 为模板中扩出水稻 *PRO* 基因的干涉片段, 大小为 0.6 kb 左右 (图 4), 与预测的片段大小相符。

1	atggccatcgctcccgcatccaagcgcgtgcttgcctcttc		721	gcggaggaggagaggagctcgagatggcgacggcgctgctg	
	MAIASRIQKRVLASF	15		AEEERELEMAHGRL	255
46	gccggccgcccgcagccaagctccggaggcgccgtcgccg		766	gcgatcgccgagcgggtgcgggagtagacatcccgtgctg	
	AAAAAAKLPEAAVAA	30		AIGERCAEYDIPLLV	270
91	gccggaggcgccgcagagcggtggaggaggtcgcttccgtg		811	gacggcgagtagccaccgtgcagcgccgcatgactactcacg	
	AGGAAEAVEEVASSV	45		DAEYATVQPAIDYFT	285
136	caggagcaggtgcaggcgaggagcgaggtgttgagttggg		856	ttcgccggcgctggcggtcaacggcgccggaggccatcg	
	QEQVQAQGAQVLEFG	60		FAGALAFNGGGRPIV	300
181	gataccgagaggtgttcggcgaggaggtgcagtcgctggtg		901	cacggcaccgtccagcctacccgcgacgcgcgacgggtg	
	DTERLFAGERSTSLV	75		HGTVQAYLRDARDRL	315
226	cgacgctcgccgtgctgcagcgctgtcggtggcccgctcg		946	gaggccatggcgagcgccgcagggcgagcgctgctcgcg	
	RTLAVLQALS VGPLV	90		EAMARAAQGERVCLA	330
271	gacgtggcgagcgccgctgaggtcgccggcggtggccgggagc		991	ctcaagctggtcgccgcgctacgtggcgcgaggcccgctc	
	DVATAALRSPAVAGS	105		LKLVRGAYLAREARL	345
316	gcggcgggcgccgcccggcgaggggcaccgctaccagcacttc		1 036	gcggcctccctcgcggtgcgctgcgggtccaccgcagcatccag	
	AAGRAAARATAYQHF	120		AASLGVPSPVHRSIQ	360
361	tgcggcggggagaccgcccaggaaggccgcccggcggtgcggcg		1 081	gacaccacgactgtactaacgctgcggcggtctctctcgac	
	CAGETAEEAAA VRR	135		DTHDCYNGCAAFLLD	375
406	ctctggcgccggcgatggcgggatcctcgactacggcatcgag		1 126	cgcttcgcccgccgcccggcgccgtgacgtcgccacgcacaac	
	LWRGGMGGILDYIE	150		RVRRGAAAVTLATHN	390
451	Gacggcgagagcgccccgctcgacggcaacgccggcgatgc		1 171	gtcgagtcggcgagctcgccggcgaggcgctggagctcgcc	
	DAEDGPACDRNAAGF	165		VESGQLAAARALELG	405
496	ctcgccgccatgacgtcgccggcgctgctctcgctcgccg		1 216	atcgcgccggcgccgaccggcgctcgagtcgcgacgtgatg	
	LAAIDVAAALPPGSA	180		IGGGGDRGLQFAQLM	420
541	agcggtgcatcaagatcacggcgctgccccggtcggtgctg		1 261	ggcatggcggtggcctctcgctcgccctcgcaacggcggttc	
	SVCIKITALCPVALL	195		GMADGLSLGLRNAGF	435
586	gagaagcgagtgatctgctgggtggcagcagaagcaccggcg		1 306	cagggtgagcaagtacgtccgtacgtccagtggagcagatc	
	EKASDLLRWQKHPA	210		QVSKYLPYGPVEQII	450
631	acgaagctgccatgaaagtgcacgggttccgggtgctgctgc		1 351	ccgtacctcatcagacgagcagaggagaacagggttgctctcg	
	TKLPWKVHGFPVLCV	225		PYLIRRAEENRGLLS	465
676	tccagcccgtgtacctgacggcgccggagccggcgctggag		1 396	tcttctctctcgacagacgctgctccggtaa	
	SSPLYLTAAEPPALE	240		SSSFDRQLLR.*	476

图 1 水稻 PRO 基因的开放阅读框及导出的编码蛋白的氨基酸序列

Fig.1 ORF sequence of PRO gene and coding the amino acid sequence in rice

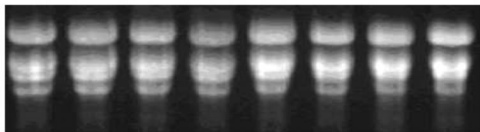
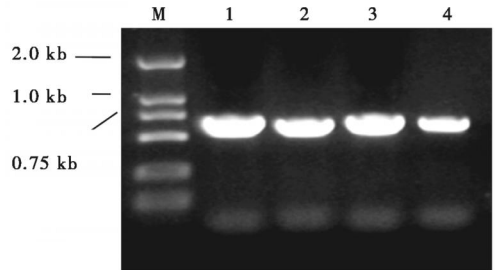


图 2 水稻叶片总 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Denature agar electrophoresis of total RNA in rice leaves



M. 分子量标记 DL2000; 1~4. RF-PCR 扩增产物。

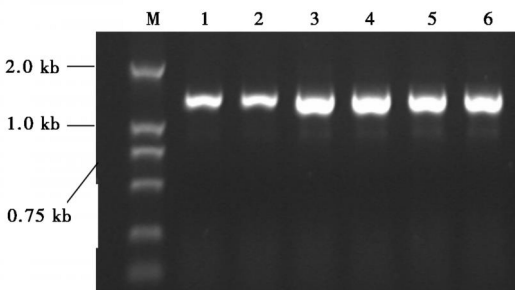
M. DL2000 Marker; 1 - 4. RF-PCR products.

图 4 水稻 PRO 基因的干涉片段 RF-PCR 扩增结果

Fig.4 RF-PCR to acquire the target gene fragment

2.4 酶切鉴定装载成功的 pOVER-PRO 和 pRNAi-PRO

pOVER-PRO 连接后装载完的质粒选用 *Hind* III 和 *Mlu* I 双酶切检测后(图 5),可以看出切出了相应大小的片段约 1.4 kb,至此证实了 pOVER-PRO 重组载体已成功构建。二次装载完的质粒可选用 *Bam*HI 单酶切检测,由图 6 可以看出:切出了的片段大小约为 1.4,其



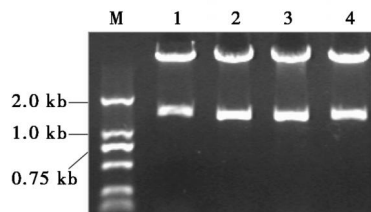
M. 分子量标记 DL2000; 1~6. RF-PCR 扩增产物。

M. DL2000 Marker; 1 - 6. RF-PCR products.

图 3 水稻 PRO 基因 ORF 的 RF-PCR 扩增结果

Fig.3 RF-PCR to acquire the target gene fragment

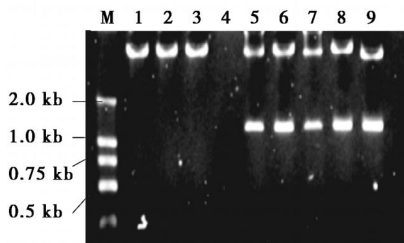
中包括了反向重复序列间导入的内含子 250 bp ,由此证实 pRNAi- *PRO* 重组载体已成功构建。送上海博亚公司进行测序,结果表明,所扩增的 *PRO* 基因全序列与 GenBank 中 *PRO* 的 cDNA 全序列 100 %相似,扩增 *PRO* 基因的干涉片段也与 GenBank 中相对应的 *PRO* 的 cDNA 序列 100 %相似。说明所构建的两个载体都能达到要求。



M. 分子量标记 DL2000;1~4. pOVER- *PRO* 连接后的酶切鉴定。
M. DL2000 Marker ;1 - 4. Identification ligation of pOVER- *PRO*.

图5 pOVER *PRO* 连接后的酶切鉴定

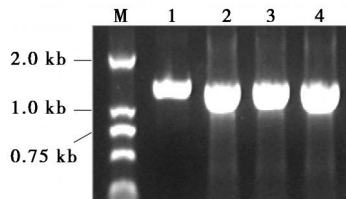
Fig.5 Identification of ligation. of pOVER- *PRO*



M. 分子量标记 DL2000;1~3. 假阳性克隆 ;4. 阴性对照;
5~9. 阳性克隆的 *Bam*H I 单酶切。
M. DL2000 Marker ;1 - 3. The fake recombination vectors ;
4. CK⁻ ;5 - 9. Digestion with *Bam*H I.

图6 pRNAi- *PRO* 两次都装载完的质粒用
*Bam*H I 单酶切检测

Fig.6 *Bam*H I digestion on the final recombination vectors



M. 分子量标记 DL2000;1~4:PCR 产物。
M. DL2000 Marker ;1 - 4. Results of PCR.

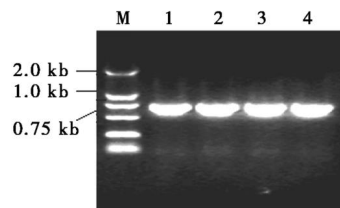
图7 装载成功的 pOVER *PRO* 重组质粒在农杆菌中
稳定性的鉴定

Fig.7 The success of the load pOVER- *PRO*
of the stability of the identification in *Agrobacterium*

2.5 装载成功的重组质粒在农杆菌中的稳定性鉴定

序列成功装入由 *ubi* 启动子驱动的水稻组成型超表达和干涉表达载体中(图 7,8),把构建好的组成型超表达载体(pOVER- *PRO*)和干涉载体(pRNAi- *PRO*)用 PCR 方法扩增目的片段来检测在农杆菌中的稳定性,结果表明,这两种不同的质粒 DNA 都可以扩出相应大小的片段,图 7 显示扩出了 1.4 kb 左

右的带,图 8 显示扩出了 0.6 kb 左右的带,都与目的片段大小相符。说明质粒结构在农杆菌中保持稳定,没有发生变异,可以用于植物的转化。稳定性将已经鉴定好的农杆菌的菌液加上终浓度为 15 %的甘油,置 - 75 °C 冰箱保存便于做植物转基因侵染用。



M. 分子量标记 DL2000;1~4. PCR 产物。
M. DL2000 Marker ;1 - 4. Results of PCR.

图8 装载成功的 pRNAi- *PRO* 重组质粒
在农杆菌中稳定性的鉴定

Fig.8 The success of the load pRNAi- *PRO* of the
stability of the identification in *Agrobacterium*

3 讨论

RNA 干涉技术首先应用于线虫的基因组研究中,体外或体内转录生成 dsRNA ,再用显微注射、浸泡或喂养的方法导入线虫,目前已探索了几乎整个线虫基因组的所有基因(约 19 000 个)。研究结果表明:其中 50 % ~ 80 % 序列选择有效,10 % 的基因封闭产生了明显的异常表型^[15]。RNA 干涉应用于果蝇的基因组研究取得了满意的结果^[16]。由于在植物体中,不能通过简单的注射、浸泡等方法将 dsRNA 导入细胞,而植物转化中农杆菌介导法是常用的方法,所以可以通过构建转化表达载体来利用 RNA 干涉。有研究表明,构建能转录出发夹结构的 dsRNA 的表达载体能高效引发 RNA 干涉,获得一系列由弱到强的突变体^[17-20]。通常在同一启动子下连接目的基因的相应正义片段和反义片段,在两片段间插入一间隔区,就可实现在植物体中转录出发夹结构的 dsRNA ,引发 RNA 干涉。干涉技术是研究基因功能最为有效的手段之一。组成型干涉技术已在功能基因分析以及生物性状的分子改良方面被广泛应用^[21,22]。本试验采用 582 bp 的片段再加酶切位点的 RNA 干涉片段,构建了 RNA 干涉载体并成功转化农杆菌。

鉴定基因功能的另一个常用的方法是超表达或称过量表达技术。有时通过 RNAi、反义 RNA 技术或插入失活等手段都不能产生表型的变异。其原因可能是基因的功能冗余,从人类基因组、水稻、拟南芥、线虫、小鼠、果蝇等一大批生物基因组的测序成功及全基因组分析知道,基因组中存在着大量的功能相同或相似的基因,某一功能冗余基因的突变,其

作用可以被其他功能基因所替代,因此往往得不到易于识别的表型特征^[23,24]。在这种情况下,超表达或过量表达技术提供了对基因功能进行鉴定的另一种途径;即使基因功能缺失后有表型,应用超表达技术也可以与之相验证^[25]。在本研究中,我们利用超表达技术将 PRO 活性水平上调来研究相关的代谢过程的变化。

应用 RNA 干扰技术下调 PRO 活性和超表达技术上调 PRO 的活性,进一步能从分子水平上深入探讨 PRO 在香稻 2-AP 形成中的作用机制,同时脯氨酸是 PRO 的反应前提,而脯氨酸又是一个逆境指标,借此从而研究在水分控制中脯氨酸代谢及相关的酶和香稻 2-AP 之间的关系,探明水分对 2-AP 形成的调控机理,探明 PRO 与抗旱性的关系,初步研究香稻 2-AP 形成的生理生化机制。为制定香稻浓香优质的栽培措施提供理论依据和技术支持,提高我国香米在国际市场的竞争力。

参考文献:

- [1] Giovanni M C, Mandy J C, Robert J H, *et al.* Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence [J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9: 245 - 250.
- [2] Sugunya W, Kanchana D, Sakda J, *et al.* Effects of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105 [J]. *Food Chemistry*, 2004, 87: 407 - 414.
- [3] Buttery R G, Ling L C, Juliano B O, *et al.* Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31: 823 - 826.
- [4] Lorieux M, Petrov M, Huang N, *et al.* Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theoretical and 2-AP plied [J]. *Genetics*, 1996, 93: 1145 - 1151.
- [5] Jezussek M, Juliano B O, Schieberle P. Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 1101 - 1105.
- [6] Laksanalamai V, Ilangantileke S. Comparison of aroma compound (2-acetyl-1-pyrroline) in leaves from Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) and Thai fragrant rice (Khao Dawk Mali-105) [J]. *Cereal Chemistry*, 1993, 70: 381 - 384.
- [7] Paule C M, Powers J. Sensory and chemical examination of aromatic and nonaromatic rices [J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54: 343 - 347.
- [8] 任鄞胜, 肖培村, 吴先军, 等. 香稻保持系香味遗传初步研究 [J]. *中国稻米*, 2004(2): 15 - 17.
- [9] 任鄞胜, 肖培村, 吴先军, 等. 香稻香味研究进展 [J]. *中国稻米*, 2004(3): 8 - 10.
- [10] 谢新华, 肖 昕, 李晓方. 水稻香味的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2004, 20(1): 57 - 59.
- [11] Tadashi Y, Nguyen T, and Hideo I. Precursors of 2-Acetyl-1-pyrroline, a Potent Flavor Compound of an Aromatic Rice Variety [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 2001 - 2004.
- [12] Jin Qingshen, Qiu Boqin, Yan Wenchao *et al.* Tagging of a gene for aroma in rice by R2-APD and RHP() [J]. *Acta agriculture Zhejiang Gensis*, 1996, 8(1): 19 - 23.
- [13] 胡旭霞, 刘耀光. 植物 RNA 干扰载体的构建及其在水稻基因表达沉默中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2006, 5(4): 621 - 626.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*, 2nd [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi [J]. *Nature*, 2003, 421: 231 - 237.
- [16] Boutros M, Kiger A, Susan Armknecht, *et al.* Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in drosophila cells [J]. *Science*, 2004, 303(5659): 832 - 835.
- [17] Chuang C, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-strand RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4985 - 4990.
- [18] Smith N A, Singh S P, Wang M B *et al.* Total silencing by intron spliced hairpin RNA [J]. *Nature*, 2000, 407: 319 - 320.
- [19] Escobar M A, Civerolo E L, Summerfelt K R *et al.* RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13437 - 13442.
- [20] Levin J Z, Framond A J, Tuttle A *et al.* Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(6): 759 - 775.
- [21] 石东乔, 陈正华. 反义 RNA 及其在植物学研究中的应用 [J]. *遗传学报*, 2001, 23(1): 73 - 76.
- [22] 赫 然, 刘秋云. RNA 干扰与功能基因组 [J]. *生物技术通讯*, 2002, 3(13): 202 - 204.
- [23] Miklos G L, Rubin G M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms [J]. *Cell*, 1996, 86(4): 521 - 529.
- [24] Palatnik J F, Allen E, Wu X *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs [J]. *Nature*, 2003, 425: 257 - 263.
- [25] Zhang C, Kim S H. Overview of structural genomics: from structure to function [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(1): 28 - 32.