

利用正义 RNAi 技术提高玉米直链淀粉含量效果的研究

张桂堂^{1,2}, 卢东长城^{1,2}, 孙重霞^{1,2}, 梁荣奇³, 杨凤萍², 张晓东²

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100048; 2. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 3. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室, 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为了研究利用正义 RNAi 技术提高玉米直链淀粉含量效果, 用基因枪法将构建的 *sbe II b* 正义 RNAi 表达载体 pBAC506 和 pBAC508 (筛选标记基因分别为 35S 启动子及 *Adh1*-intron1 增强驱动的 *epsps* 和 *bar*) 导入玉米 (*Zea mays*) 自交系幼胚愈伤组织, 经过筛选、分化和再生获得了 44 株转基因当代植株, 经 PCR 扩增、PCR-Southern 检测有 30 株为阳性。选择 9 株健壮的阳性植株进行基因组 Southern-blotting 分析, 结果表明 7 株 T_0 植株整合了目的基因, 其中 4 株整合了 1 个转基因拷贝, 2 株整合了 2 个转基因拷贝, 1 株整合了 3 个转基因拷贝。这 7 株中有 2 株结实, 直链淀粉含量分别为 23.22% 和 24.60%, 有一定的小幅提高。下一步要进行较大规模的基因枪转化, 得到比较大的转基因群体, 以对更多转基因后代进行鉴定, 期望筛选出外源基因多拷贝插入和直链淀粉含量大幅提高的株系。

关键词: 玉米; 淀粉分支酶; 正义 RNAi; 直链淀粉

中图分类号: S336 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0092-05

Increasing of Maize Amylose Content by Sense RNA Interference

ZHANG Gui-tang^{1,2}, LU Dong-chang-cheng^{1,2}, SUN Chong-xia^{1,2},
LIANG Rong-qi³, YANG Feng-ping², ZHANG Xiao-dong²

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China; 3. Key Lab of Crop Genomics & Genetic Improvement, Beijing Key Lab of Crop Genetic Improvement, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to explore the effect of sense RNAi (RNA interference) on increase the amylose content of maize (*Zea mays*), two sense-RNAi vectors pBAC506 and pBAC508 with the sense *sbeIIb* and selection gene *epsps* or *bar* were constructed and transformed to maize callus induced from immature embryos of the elite inbred lines by biolistic PDS1000/He. Forty-four T_0 transformed plantlets were regenerated, and thirty plants were positive by analysis of PCR and PCR-Southern hybridization. Southern-blotting results of 9 strong PCR-positive plants showed that the RNAi constructs in 7 plants were successful integrated into their genomes, 4 with one copy of transgene, 2 with two copies and 1 with three copies. The amylose content of 2 T_2 transgenic lines were 23.22% and 24.60%, respectively. The results suggested that a big transgenic population was necessary for screening the transgenic plants with multi-copy transgene and high amylose content.

Key words: Maize; Starch branching enzyme; Sense-RNAi; Amylose

玉米淀粉约占其籽粒干质量的 70%, 有直链淀粉 (Amylose) 和支链淀粉 (Amylopectin) 两种, 二者比例约为 1:3。直链淀粉是重要的工业原料, 广泛

应用于酿酒、造纸、粘合剂、纺织、食(药)品包装纸、密封材料、高度印刷线路板、电子芯片、耐水耐压材料及生物降解塑料的生产中, 应用前景十分广阔。

收稿日期: 2009-07-22

基金项目: 北京市农林科学院优秀青年科研基金 (2006-16)

作者简介: 张桂堂 (1984-), 男, 山东人, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者: 梁荣奇 (1970-), 男, 山东莒县人, 副教授, 博士, 主要从事小麦遗传育种研究。

另外,高直链淀粉的玉米淀粉属于抗消化淀粉(Resistant starch, RS),食用后人体血糖水平不易升高,因此,可用于制作糖尿病、肥胖、高血压、胆结石等病人的保健食品,作为脂肪代替物制成的低脂食品,并有发现表明对结肠癌有显著的预防作用^[1-3]。

淀粉分支酶(Starch branching enzymes, SBE)是支链淀粉生物合成过程中的一个关键酶,催化形成葡萄糖以 α -(1,6)键,形成分支结构^[4,5]。玉米淀粉分支酶有3种同功酶,*sbeI*、*sbeIIa*和*sbeIIb*。其中*sbeIIb*对胚乳直链淀粉含量的作用最大,其编码基因的突变(玉米ae突变体)可使玉米胚乳中直链淀粉的含量达到50%以上。从普通玉米淀粉中提取直链淀粉成本很高,只有高直链玉米淀粉(直链淀粉含量高于50%)才具有商业开发价值,但我国还没有高直链玉米淀粉品种规模化商业种植,主要是由于高直链淀粉种质资源匮乏,影响了品种的培育。我国工业所需要的直链淀粉主要从美国进口,进口原料价格比普通玉米淀粉高16倍^[1,6]。

80年代初卡斯汤姆种子子公司利用ae及其修饰基因采用轮回选择法培育出5级(直链淀粉55%~60%)、6级(直链淀粉60%~70%)和7级(直链淀粉70%~80%)高直链淀粉玉米杂交种^[7]。中国农业大学国家玉米改良中心利用美国引进ae突变体为非轮回亲本,经过多代回交转育和自交选择而获得自交系S1127ae/ae和HZ32ae/ae,在国内率先培育出高直链淀粉玉米新组合ND-AE-0201,现暂命名为“中农大401”。但常规遗传改良一直存在育种周期长,优良组合的预见性差,优良亲本自交系的当选率低、培育和改造困难,遗传连锁累赘难以打破等缺点。为了克服传统育种方法的局限,创造新种质、拓宽育种资源,利用遗传工程技术引入基因获得新性状、或者消除基因去掉坏性状,已经广泛地、成功地应用于作物遗传改良和育种中。

共抑制(Cosuppression)可以简单定义为所转入的外源基因和同源内源性基因的表达同时减弱的现象,是与外源基因和同源内源性基因共表达状态相反的一种状态^[8,9]。有3种转基因方法可以引起植物内源基因的RNA沉默:产生双链RNA(dsRNA)转录本的反向重复转基因(Inverted repeat RNA interference, IR-RNAi),反义RNA技术和正义过量表达转基因。当正义转基因高水平表达时能引发有效的RNA沉默,这种方法称为正义共抑制或正义RNAi(Sense RNA interference, Sense-RNAi)^[10]。sense-RNAi需要强启动子驱动正义转录本的合成^[11],而且高水平的拷贝数能提升sense-RNAi的沉

默效果。

目前,玉米的遗传转化一般使用基因枪法和农杆菌介导转化法。农杆菌介导转化法导入基因拷贝数低,大多只有1~3个,表达效果好,遗传稳定,多数符合孟德尔遗传规律。而基因枪转化法是目前玉米遗传转化中用得最多、效果最好的方法,外源基因插入往往是多拷贝成簇整合到受体基因组中,适于sense-RNAi的研究。

本研究构建了玉米淀粉分支酶基因*sbeIIb*的特异sense-RNAi载体,导入先早17、501、478、178、07-2、024、058和旱21等8个玉米自交系,旨在探讨sense-RNAi技术在作物遗传改良中的应用前景,期望筛选出直链淀粉含量大幅度增加的玉米新种质类型,为下一步培育高直链淀粉的玉米杂交种奠定材料基础。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米(*Zea mays*)自交系先早17、501、178、478、178、07-2、058、旱21,由北京市农林科学院生物技术中心实验室提供。载体pGEM-T easy Vector购自Promega公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 购于Promega公司。

Taq酶、氨苄青霉素、IPTG、X-gal等试剂均购自大连宝生物工程有限公司;T₄DNA连接酶、DNA回收试剂盒购自Promega公司;限制性内切酶购自Promega、NEB或TaKaRa公司;RNaseA购自Promega公司;地高辛(DIG)标记与检测试剂盒和化学发光检测试剂盒购自Roche Diagnostics GmbH公司;普通生化试剂购自Sigma公司或Promega公司。普通化学试剂为国产分析纯。基因测序采用BECKMAN公司的CEQ2000XL DNA Analysis System。

根据已发表的玉米*sbeIIb* mRNA序列(GenBank Accession No AF072725)设计引物,在上游引物一端引入SacII位点,在下游引物的一端引入SacI位点,从玉米基因组中特异扩增包括3'-UTR区域的*sbeIIb*基因片段(2225~2660)。表达载体结构示意图如图1:

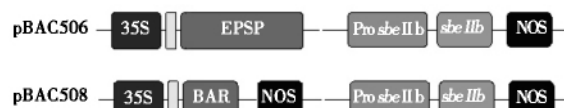


图1 质粒pBAC506和pBAC508的结构示意图

Fig 1 Schematic map of expression vector pBAC506 and pBAC508

1.2 玉米基因枪转化体系的建立

取玉米自交系授粉后 10~11 d 玉米幼胚(大小为 1~2 mm)放入幼胚组织愈伤诱导培养基(N6 基本培养基+10 mg/L AgNO_3 +100 mg/L 肌醇+2 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂)中 26℃ 下暗培养 1 周。按张晓东等^[12]方法进行基因枪微弹的制备。用基因枪(PDS1000/He)转化后的愈伤组织恢复培养一周,转入含筛选剂 0.1 mg/L 草甘膦或 0.2 mg/L Bialaphos 的愈伤诱导培养基继续暗培养 2~3 周,然后转入分化筛选培养基(N6 基本培养基+0.5 mg/L AgNO_3 +100 mg/L 肌醇+1.5 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂+0.05 mg/L 草甘膦或 0.1 mg/L Bialaphos)上筛选培养,分化的绿苗转入壮苗生根培养基(1/2 MS 基本培养基+2 mg/L 多效唑+100 mg/L 肌醇+0.5 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂)上,炼苗 3~5 d 后,将培养基洗净移栽至大田。

1.3 转基因再生玉米植株的 PCR 检测

按 CTAB 法提取玉米叶片 DNA,以 pBAC506 作为阳性对照,未转基因植株作为阴性对照,不加 DNA 的作空白对照,对转基因玉米基因组 DNA 的 *sbeIIb* 转基因片段进行 PCR 扩增。根据 *sbeIIb* 片段和 Nos'终止子的序列设计上下游特异引物 P5:

上游引物为 5'-CCGCGGGAGGAGGATAAGGT-GATTGTG-3';下游引物为 5'-CTCATAAATAACGT-CATGCATTAC-3'。

反应体系:玉米基因组 DNA 1.0 μL ; 10 \times PCR Reaction Buffer 2.5 μL ; dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL ; 5'引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL ; 3'引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL ; Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.5 μL ; ddH₂O 15 μL 。

玉米基因组 DNA 1.0 μL 10 \times PCR Reaction Buffer 2.5 μL dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL 5'引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL 3'引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.5 μL ddH₂O 15 μL 反应条件:95℃ 变性 3 min; 94℃ 变性 50 s, 54℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。反应产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上检测。

1.4 转基因再生玉米的 PCR-Southern 检测

按照 Roche 公司 PCR DIG Probe Synthesis Kit 提供的方法对 *sbeIIb* 基因探针进行 DIG 标记。对初步筛选后的转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 反应,引物和反应体系同 *sbeIIb* 基因检测体系。按照 785 型真空吸印仪(Bio-Rad)使用手册进行 DNA 转膜,信号检测按照 Roche 公司的 DIG DNA labeling and Detection Kit 提供的方法进行。

1.5 转基因再生玉米的 Southern-blotting 检测

为了避免内源基因影响对 Southern 结果的分析,本试验根据 Nos'终止子和载体的序列设计 Southern 杂交探针标记的 PCR 引物 P6(上游引物为 5'-ATGATTAGAGTCCCGCAATT-3',下游引物为 5'-TCGGTGATGACGGTGAAA-3')。以质粒 pBAC506 为阳性对照,未转化的转基因植株为阴性对照,用 Hind III 完全酶切 150 μg 转基因植株基因组 DNA。浓缩酶切产物,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。将胶置于 0.25 mol/L HCl 中脱嘌呤 15 min,重蒸水洗两次。其后操作步骤,除 X 光片曝光时间延长为 3~4 h 外,和 PCR-Southern 操作步骤相同。

1.6 转基因玉米的直链淀粉含量测定

将经分子水平检测为阳性的再生玉米株系在海南繁殖,转基因玉米株系成熟果穗单株脱粒,根据 Unicam UV-Visible Spectrometry (Helios Alpha) 使用说明进行玉米直链淀粉含量的测定,重复 3 次。参照农业标准数据库《谷物籽粒粗淀粉测定法》(GB7648.87)测定玉米直链淀粉含量。

2 结果与分析

2.1 转基因再生玉米植株的获得

用 PDS1000/He 基因枪对先早 17、501、478、178、07-2、024、058、旱 21 等 8 份材料的幼胚愈伤组织进行了转化,转化 7 d 后在筛选培养基上继代,对转化体进行选择后转至分化培养基中生长,最终获得 44 株转基因当代植株。

2.2 玉米转化植株的 PCR 检测

根据 *sbeIIb* 片段和 Nos3'终止子的序列设计上下游特异引物 P5,以去除内源 *sbeIIb* 基因的干扰。利用引物 P5 对移栽成活的 32 株转基因植株进行 PCR 检测,其中有 30 株扩增出 600 bp 目标片段(图 2),分别为 T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T10、T11、T12、T13、T14、T15、T16、T20、T21、T22、T23、T25、T26、T27、T28、T29、T30、T32、T35、T36、T41、T43。初步说明这 30 株转基因植株中含有外源 *sbeIIb* 基因片段。

2.3 转基因玉米的外源 *sbeIIb* 片段 PCR-Southern 杂交检测

用地高辛标记 600 bp *sbeIIb*-Nos3'探针,对移栽成活的 32 株转基因玉米株系的 T₀ 叶片进行 PCR-Southern 杂交检测(图 3),杂交结果表明,泳道 1 的阳性对照质粒有特异的杂交信号,泳道 2 的非转基因植株及泳道 3 的空白对照都没有出现特异杂交信号。30 株经检测均有特异杂交信号。进一步说明

将这 30 株转化植株的外源 *sbeIIb* 基因片段已经整合到了其基因组中。

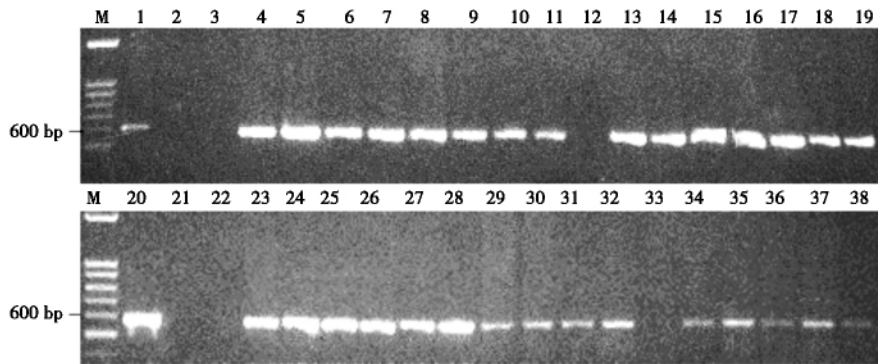


图 2 转基因植株外源 *sbeIIb* 片段的 PCR 检测结果
M. 1 kb ladder; 1 20. 阳性质粒 pBAC506; 2 21. 空白; 3 22. 阴性对照 (ck1); 4 ~ 19 23 ~ 38. 分别为不同的转基因植株。图 4 同。
M. 1 kb ladder; 1 20. Plasmid pBAC506; 2 21. Blank; 3 22. Negative maize (ck1); 4 ~ 19 23 ~ 38. Different transgenic plants. The same as below.

图 2 转基因植株外源 *sbeIIb* 片段的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR analysis result of *sbeIIb* in transgenic plants

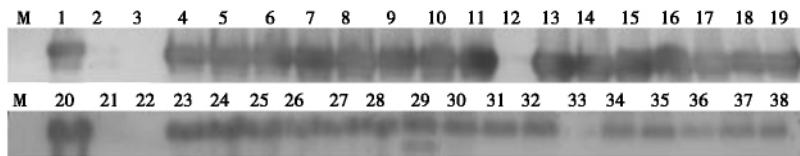
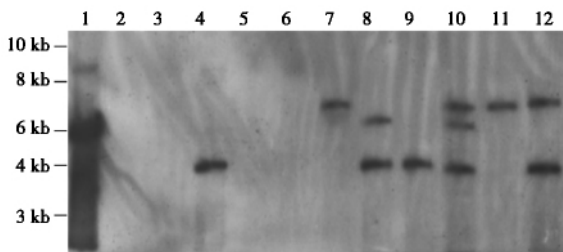


图 3 转基因植株外源 *sbeIIb-Nos3'* 片段的 PCR-Southern 检测结果

Fig. 3 PCR-Southern analysis result of *sbeIIb-Nos3'* in transgenic plants

2.4 玉米转化植株的 Southern-blotting 检测

根据 Nos'终止子和载体的序列设计 Southern 杂交探针 PCR 引物 P6 ,探针用地高辛标记后 ,从 30 株 T₀ 转基因玉米株系中选择健壮的 9 株提取叶片基因组 DNA 进行 Southern 杂交检测(图 4) ,杂交结果表明 ,泳道 1 的阳性对照质粒有特异的杂交信号 ,泳道 2 的非转基因植株没有出现特异杂交信号。7 株经检测有特异杂交信号 ,分别为 T17、T10、T30、T36、T37、T43、T29。从 Southern-blotting 的结果可以看出转基因植株 T17、T10、T36、T37 有 1 个转基因拷贝 ,转基因植株 T30、T29 有 2 个转基因拷贝 ,转基因植株 T43 有 3 个转基因拷贝。



1. 阳性质粒 pBAC505; 2. 阴性对照; 3. 空白 4. T20; 5. T17; 6. T35; 7. T21; 8. T30; 9. T36; 10. T43; 11. T37; 12. T29。

1. Plasmid pBAC506; 2. Negative maize (CK1); 3. Blank; 4. T20; 5. T17; 6. T35; 7. T21; 8. T30; 9. T36; 10. T43; 11. T37; 12. T29。

图 4 转基因植株载体的 Southern 杂交检测结果

Fig. 4 Southern-blotting analysis of vector in transgenic plants

2.5 转基因玉米植株籽粒直链淀粉含量的初步测定

上述 7 株 Southern 阳性转基因玉米植株中 T20、T21 正常结实 ,其籽粒的直链淀粉含量见表 1 ,

两个转基因玉米株系的直链淀粉分别为 23. 22% 和 24. 60% ,有一定的小幅提高。

表 1 玉米籽粒直链淀粉含量

Tab. 1 The content of amylose of transgenic maize seeds

编号 Serial number	直链淀粉含量 / % Amylose	提高幅度 / % Frequency increment
501(CK)	23. 87 ± 0. 06	—
ae(CK)	44. 10 ± 0. 12	—
T20	24. 22 ± 0. 13	1. 26
T21	24. 60 ± 0. 14	3. 06

注: ae. 常规高直链淀粉玉米材料; 501. 未转基因自交系对照; T20 , T21. 阳性转基因玉米株系。

Note: ae. High amylose maize line; 501. CK; T20 ,T21. Positive transgenic lines.

3 讨 论

正义 RNAi 发挥干扰作用的靶序列的选择是至关重要的。选择有价值的靶序列不仅是合成正义 RNAi 的前提 ,而且是正义 RNAi 能够产生高效抑制作用的关键。3'末端非翻译区 (3'-UTR 序列) 是指 mRNA 上从终止密码子 (不包括终止密码子) 到 poly (A) 起始位点的核苷酸区域。现在已经证明 ,3'-UTR 的主要功能有: 控制 mRNA 的细胞和亚细胞定位; 控制 mRNA 的稳定性; 以及控制 mRNA 的翻译效率^[13]。3'-UTR 区域参与真核基因的翻译调控。真核生物 mRNA 降解的主要途径首先是 poly (A) 尾巴的缩短。去腺苷酸化既能诱发 5'端脱掉帽子结构 ,然后由 5'→3'方向降解 RNA; 也能直接由 3'→5'方向降解 mRNA^[14]。mRNA 的 3'-UTR 即使在同源

性高的基因中往往也不具有高的保守性,一段 9 ~ 11nt 的序列能够区分基因组中 95% 的基因。Ohnishi 等^[15]认为,3'-UTR 较基因编码区对 RISCs 更敏感,而位于基因编码区的 RNAi 位点只能被有活性的 RISCs 识别。

鉴于玉米高直链淀粉在工业上的重要价值,创制高直链淀粉含量的玉米新种质的关键指标是直链淀粉含量,也即直链淀粉含量是否得到大幅度的提高,是否达到商业应用的要求。国际专利 WO9722703A2 把 *sbeIIb* 的 cDNA 或部分片段正向或反向置于玉米 zein 蛋白启动子(胚乳特异性启动子)下组成一系列植物表达载体,并获得了转基因玉米植株。在转化 *sbeIIb* 基因 3'部分序列、5'部分序列以及 *sbeIIb* 基因全长 cDNA 反义结构的转基因玉米中,内源的 *sbe* 基因受到了抑制,转基因玉米淀粉粒中较长糖链增加了近 2 倍^[16]。柴晓杰等^[17]构建了玉米 *sbeIIb* 基因的 siRNA 表达结构,通过花粉管通道法成功地导入玉米自交系,获得了分支酶活性明显地低于对照的转基因植株,其总淀粉含量与对照之间基本没有差异,但直链淀粉的含量达到 50% 左右。郭新梅等^[18]构建了 *sbeIIb* 启动子驱动的含有 *sbeIIb* 目标序列的反向重复序列的表达载体,用基因枪法导入玉米自交系幼胚愈伤组织, T₁ 代转基因玉米籽粒总淀粉含量比对照没有显著变化,其中 1 个转基因玉米株系的直链淀粉含量是 26.7%,比对照(23.1%)提高了 15.6%。

本研究转基因玉米籽粒的直链淀粉含量分别是 24.22% 和 24.6%,比对照提高幅度较小,最高才 3.06%。可能是最终得到的转基因群体比较小,且在结实的 2 个株系中 sense-RNAi 构件是单拷贝插入。下一步还需要进行较大规模的基因枪转化、得到比较大的转基因群体,以对更多的转基因后代进行鉴定,期望筛选出外源基因多拷贝插入和直链淀粉含量大幅提高的株系;进而可对直链淀粉含量大幅提高的再生株系常规杂交进行聚合育种,以得到遗传稳定的超亲类型的高代株系。

参考文献:

- [1] 王振华,亢伟民,张新. 高淀粉玉米及其开发利用[J]. 玉米科学, 2002, 10(3): 90-92.
- [2] 张文青. 抗性淀粉——功能性食物成分[J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 2(4): 232-235.
- [3] 张志英,沈建福. 抗性淀粉最新研究进展[J]. 粮油食品科技, 2005, 13(4): 29-31.
- [4] Visser R G, FJ Jacobsen E. Towards modifying plants for altered starch content and composition[J]. Trends Biotechnol, 1993, 11: 63-68.
- [5] Smith A M, Denyer K, Martin C. The synthesis of the starch granule[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 67-87.
- [6] Fergason V. High amylose and waxy corns [C]//Hallauer A R. Specialty corn. Boca Rotan: 1994, CRC Press.
- [7] 陈艳萍,袁建华,颜伟,等. 高直链淀粉玉米研究进展[J]. 南京农专学报, 2002, 18(3): 32-40.
- [8] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans[J]. Plant Cell, 1990, 2: 279.
- [9] Van der Krol A P, Mur L A, Beld M, et al. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression [J]. Plant Cell, 1990, 2: 291-299.
- [10] Jorgensen R A, Ma C L, Doetsch N. Functional genomics by sense-RNAi: a forward genetic approach for cell-type-targeted mutagenesis [C]. Plant Genomics in China VI, 2005: 1.
- [11] Que Q, Wang H Y, English J J, et al. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence [J]. Plant Cell, 1997, 9(8): 1357-1368.
- [12] ZHANG Xiaodong, LIANG Rongqi, CHEN Xuqing, et al. Transgene inheritance and quality improvement by expressing novel HMW glutenin subunit (HMW-GS) genes in winter wheat[J]. Chinese Science Bulletin(科学通报英文版), 2003, 48(8): 771-776.
- [13] Pesole G, Liuni S, Grillo G, et al. UTRdb and UTRsite: specialize databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 335-340.
- [14] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [15] Ohnishi Y, Tokunaga K, Hohjoh H. Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 329: 516-521.
- [16] 徐军望,李旭刚,朱祯. 基因工程改良淀粉品质[J]. 生物技术通报, 2000(1): 11-19.
- [17] 柴晓杰,王丕武,关淑艳,等. 应用 RNA 干扰技术降低玉米支链淀粉含量[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(6): 625-630.
- [18] 郭新梅,张晓东,梁荣奇,等. 利用 RNAi 技术提高玉米直链淀粉含量[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 658-661.