

RNAi 技术在大豆中的应用及展望

王宗尧¹, 吴页宝¹, 欧阳享决¹, 喻吉生¹, 孟建²

(1. 吉安市农科所, 江西 吉安 343103; 2. 河北省农业技术推广总站, 河北 石家庄 050000)

摘要: RNAi (RNA interference) 作为一种重要的基因沉默技术, 已在农作物研究中得到广泛应用。该文介绍了 RNAi 的作用机理, 并对国内外 RNAi 在大豆功能基因组学、抗病虫和品质改良研究中的应用及研究进展进行简要概述, 指出目前仍存在的一些问题, 同时阐明 RNAi 在大豆研究中的应用前景。

关键词: RNAi; 大豆; 靶基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)04-0561-04

Progress on Application of RNA Interference in Soybean

WANG Zong-yao¹, WU Ye-bao¹, OUYANG Xiang-yang¹, YU Ji-sheng¹, MENG Jian²

(1. Ji'an Academy of Agricultural Sciences, Ji'an 343103, China; 2. Hebei Agricultural Technology Extension General Station, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: RNA interference refers collectively to diverse RNA-mediated pathways of nucleotide-sequence-specific inhibition of gene expression. Here, we summarized applications of RNA interference in soybean functional genomics and quality improving research, and discussed the difficulties and future directions for this technology in soybean research.

Key words: RNA interference; Soybean; Targeted gene

RNAi (RNA interference) 即 RNA 干扰, 指通过与内源靶基因具有相同序列的小双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 特异地与内源靶基因编码的 mRNA 结合, 促使 mRNA 降解, 导致该基因表达下调, 引起基因沉默的现象^[1]。RNAi 现象广泛存在于微生物和动植物体中, 它可能是生物体抵御病毒基因等外源核酸入侵的一种保护机制, 使自身基因组免受侵害。自从 1998 年 Fire 和 Mello^[1] 首次报道该现象以来, 掀起了基因沉默作用分子机制及其生物学功能研究的热潮, 使 RNAi 成为分子生物学领域最热门的研究课题之一。依据 RNA 干扰现象建立的 RNAi 技术, 即人为设计合成针对某特定基因序列的 dsRNA 来关闭或抑制该基因的表达, 经验证作为一种特异、高效、经济的使基因表达受抑的技术手段, 可有效将靶基因的表达降到一个很低水平, 甚至可以完全清除。近年来, 随着 RNAi 技术不断发展完善, 其在动植物基因功能研究、抵抗外源病毒、生长发育调控和生物品质改良中的应用前景, 逐渐被科研工作者所重视, 并且已在水稻、小麦、玉米、烟草、大豆、棉花和马铃薯等作物中取得广泛应用。本文对 RNAi 技术在大豆研究中的应用及研究进展进行综述, 以期为研究人员提供参考。

1 RNAi 作用机理

随着研究的不断深入, 发现植物体内至少存在 3 种针对特异基因沉默的 RNAi 的途径。对于 RNAi

的作用机理, 研究最清楚、试验设计中最常用的是转录后水平上的干扰机制^[1]。其作用机制大体如下: 外源 dsRNA 激活内切酶 Dicer (酶复合物, 由核酸内切酶和解旋酶组成), 被其切割成长度为 21 ~ 23 bp 短的小干涉 RNA (siRNA), siRNA 形成后经解旋酶作用, 成为单链 RNA, 其中一部分单链与 Dicer 结合形成 RNA 诱导沉默复合物 (RISC), 识别并结合靶 mRNA 分子, 在核酸内切酶的催化下切割、降解靶 mRNA, 使其失去编码蛋白质的功能。另外有一部分单链与靶 mRNA 结合后作为引物, 以靶 mRNA 为模板, 在 RNA 聚合酶 (RdRP) 的作用下, 不断扩增形成新的 dsRNA, 又同样被 Dicer 酶切割成新的 siRNA (次级 siRNA)。次级 siRNA 再次形成 RISC, 继续反作用于靶 mRNA, 就使得作为模板的 dsRNA 和作为引物的 siRNA 不断进行循环扩增。因此, dsRNA 一旦被注入到植物细胞中, RNA 沉默效应能够在整个生长发育过程中维持甚至可以遗传至后代; 另外, dsRNA 可以通过植物维管系统运输到其他细胞中, 使局部的 RNA 沉默传播到整个植株。

2 RNAi 技术在大豆中的应用

当前, RNAi 作为一种后基因组时代基因功能验证与下调表达调控新技术, 可以抑制大豆中某些重要性状基因的表达, 因此在大豆基因功能的鉴定、品质与性状的改良、抗病虫等方面的研究得以开展。

2.1 RNAi 技术在大豆基因功能研究中的应用

RNAi 作为一种重要的反向遗传学的研究方

法,为大豆基因组功能研究提供了一种很好的技术工具。Senthil 等^[2]利用 RNAi 技术分析异黄酮合成酶基因(*IFs*)在大豆叶片和根部的作用效果及其对异黄酮积累的影响时,证明 RNAi 对大豆叶片中 *IFs* 基因的功能分析是有效的。ACS 等^[3]证实 RNAi 介导大豆肌醇-1-磷酸合酶的基因(*GmMIPS1*)使得植酸含量减少并减缓大豆种子的生长发育。Lim 等^[4]利用 RNAi 技术研究发现大豆花叶病毒的辅助成分蛋白酶可以通过抑制潮霉素磷酸转移酶基因来提高潮霉素抗性体细胞胚的自我修复能力。李小平等^[5]以大豆类受体蛋白激酶基因 *rlpk2* 为靶基因,将构建的高效 RNAi 双元表达载体导入大豆植株,从而发现转基因大豆叶片的最大光化学效率显著高于同一时期的野生型大豆,表明 *rlpk2* 基因可能在维持叶绿体的结构及保护叶绿体膜系统的完整性方面起着重要作用,结合其前期研究结果^[6],得出 *rlpk2* 基因对于大豆叶片衰老进程具有调控作用的结论。Kasai 等^[7]采用 RNAi 技术研究大豆种皮受低温诱导变色的分子机制,结果表明,在低温处理后查尔酮合成酶(*CHS*) mRNA 水平的快速增加可能会增强种皮细胞色素沉着,从而导致种皮变色。朱红林等^[8]采用同源序列法克隆大豆中 *LEC1* 的同源基因 *GmLEC1* 的全长 cDNA,成功构建 RNAi 载体并完成对大豆的遗传转化。Keito 等^[9]研究证明 RNAi 技术可以用于大豆体细胞胚以及种子成分功能性研究。Qin 等^[10]利用 RNAi 技术发现磷转运蛋白基因 *GmPT5* 与大豆根瘤磷的获取转运密切相关,尤其是在缺磷的条件下参与磷酸盐的运输。孟颖颖等^[11]利用 RNAi 技术研究显示大豆隐花色素基因 *GmCRY2* 的功能可能是抑制叶片的衰老。Radwan 等^[12]采用 RNAi 技术抑制大豆 14-3-3 蛋白家族中 SGF14c/SGF14l 表达时,表现出大豆根瘤结节数减少、退化,显示这些 14-3-3 蛋白与大豆根瘤发育相关。

2.2 RNAi 技术在大豆抗病毒研究的应用

近年来研究人员利用 RNAi 原理,将各种病毒的不同基因(如复制酶基因、运转蛋白基因、外壳蛋白基因等)片段导入植物,在植株体内形成针对病毒基因片段的 siRNA,致使其基因沉默来阻止病毒的复制扩散^[13],以获得抗病毒的转基因新种质,并且获得的转基因植株具有特异性强、抗病程度高、对环境无污染以及育种周期短等特点^[14]。Zhang 等^[14]构建了豆荚斑驳病毒载体,证明其在大豆基因抑制方面是有效的。许宗宏等^[15]针对大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)的复制酶与外壳蛋白基因,采用 Gateway 技术进行 RNAi 载体的构建,简化了传统 RNA 干扰载体构建方法,提高了效率。Zhang 等^[16]将大豆花叶病毒、豆荚斑驳病毒、苜蓿花叶病毒中部分基因的 cDNA 反向重复序列共同整合导入大豆,获得了能够

同时抵抗多种病毒侵染的植株。

2.3 RNAi 技术在大豆抗虫研究的应用

因为 dsRNA 在昆虫体内无法进行细胞间传递和扩增,Baum 等^[17]通过人工饲喂的方式筛选出了 14 个靶基因,在低浓度 dsRNA 作用下便可下调表达使昆虫生长迟缓或者致死。但是利用 RNAi 技术实现农作物虫害防治仍有较大难度,故在大豆抗虫研究方面所见报道较少。Ibrahim 等^[18]选取大豆南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)体内多个靶基因来构建干涉载体,分别导入大豆受体,结果显示编码酪氨酸磷酸酯酶基因和线粒体应激蛋白 70 基因 2 种干涉载体转化的大豆植株都能大大减轻根结线虫的危害,也为其他植物抗根际寄生线虫提供一条新的有效途径。李冬梅等^[19]利用大豆食心虫的 28S 核糖体 RNA 基因(28SrDNA)片段成功构建了其 RNAi 载体 L4440-28SrDNA,为今后研究防治食心虫技术奠定了基础。

2.4 RNAi 技术在大豆品质改良中的应用

因为 RNAi 的沉默效应可在后代中稳定遗传,所以利用 RNAi 技术进行大豆品质改良研究备受关注。马建等^[20]以吉农 18 的 cDNA 为模板,克隆了 3 种大豆脂肪氧化酶基因(*Loxl*、*Lox2*、*Lox3*)中同源性最高的一段长 357 bp 的外显子片段,以及一段长 230 bp 的 SSR 序列作为内含子,采用重组 PCR 技术构建大豆脂肪氧化酶基因 *ihpRNA* 表达载体 pC*LoxRi*,通过花粉管通道法导入大豆,使脂肪氧化酶基因在籽粒细胞中被抑制。魏益凡等^[21]采用 RT-PCR 克隆大豆凝集素 *Le1* 基因核心保守序列 515 bp 片段,并结合大豆籽粒特异表达载体 pC-*xRi*,构建了在大豆籽粒中进行特异调控凝集素基因的 RNAi 表达载体。柴晓杰等^[22]在成功克隆大豆胰蛋白酶抑制剂 *KSTB3* 基因的基础上,构建了针对该基因高效的 siRNA 表达体系,利用 RNAi 技术抑制胰蛋白酶抑制剂基因的表达。周海涛等^[23]利用 RNAi 技术,构建了针对大豆籽粒中编码胰蛋白酶抑制剂 *KTi* 基因的 RNAi 表达载体,获得的转基因植株蛋白质含量比对照有明显的下降,脂肪含量则有相应的增加。杜娟^[24]构建了 2 个大豆胰蛋白酶抑制剂 *KTi* 基因和凝集素 *SBA* 基因双价 RNAi 表达载体,实现了多基因的同时敲除。王戈亮^[25-26]利用只在大豆种子中特异表达油酸去饱和酶(*gmFAD2-1*)基因中部分序列构建包含内含子的 RNAi 载体,抑制 *FAD2-1* 基因在种子中的表达,导致油酸含量显著提高和多不饱和脂肪酸含量降低。柳青等^[27]通过农杆菌介导和花粉管通道法 2 种转化方法将干扰黄烷酮-3-羟化酶基因(*F3H*)的载体 pF3Hi330

成功整合入大豆基因组,以使更多前体转向异黄酮合成,达到提高异黄酮含量的目的,结果虽使异黄酮含量有较小幅度提高,但效果并不十分不理想。Kyoko 等^[28]利用 RNAi 介导大豆皂甙糖苷配基合成中的关键酶 β -香树素合酶基因,表明在不影响转基因株系生长的情况下,可以通过分子生物学方法控制种子中三萜皂甙的含量和构成成分。Nicholas 等^[29]以油酸去饱和酶(*FAD2-A*)中—420 bp 内含子片段作间隔序列,构建油酸去饱和酶基因 RNAi 表达载体,导致籽粒中油酸含量增加、多不饱和脂肪酸含量降低,并且伴随该间隔序列缩短而作用效果减弱,当该片段小于 60 bp 时抑制作用消失。李夏等^[30]构建大豆 β -伴大豆球蛋白 α' 亚基基因 *ihp*-RNAi 表达载体,成功抑制 α' 亚基的合成,降低大豆 7S 蛋白含量以提高大豆蛋白的营养品质。陈子奇等^[31]通过农杆菌介导的子叶节转化法将大豆 11S 球蛋白 *GY1* 基因 RNA 干扰表达载体导入大豆吉农 28,结果显示转化植株籽粒蛋白质平均降低 1.43%,脂肪平均提高 0.76%,表明利用 RNAi 技术可以提高大豆脂肪含量。

3 问题与展望

3.1 RNAi 技术在大豆研究中存在问题

当前 RNAi 技术应用于大豆研究还有一些限制因素。首先,靶基因序列必须是已知,同一个基因家族甚至非目标基因当中有 7 个连续核苷酸残基和靶基因相同时,就有可能产生脱靶效应,因此需要详细的靶基因序列信息以避免脱靶效应发生。随着大豆基因组和 EST 测序研究的不断深入,相信这方面的限制将会减少。其次,遗传稳定性问题, RNAi 现象在无性繁殖作物中较容易得到保持,而在有性繁殖的作物包括大豆中,信号物质虽然可以传递给下一代,但在后代中的遗传稳定性需要进一步验证。如 Pinto 等^[32]曾通过 RNAi 诱导的水稻黄斑驳病毒(RYMV)的抗性经证明仅能稳定遗传 3 代。再次,在特定发育阶段和特定器官中的调控问题,由于在植物中 RNA 沉默可以在细胞之间、组织之间传播,所以当需要 RNAi 现象在大豆植株一个特定的组织中表达时,它也有可能在其不需要的组织中表达,实现选择性地在大豆发育的不同时期与不同器官中进行靶基因沉默还相当困难。第四,并不是所有的基因都可以被沉默,例如一些表达水平低的基因 RNAi 现象就不明显。

3.2 RNAi 技术在大豆中应用前景

转基因作物的安全性一直存在着巨大的争议,目前国际上还没有达成共识。由 RNAi 技术转化的

转基因大豆植株内由于不会表达外源蛋白,对应的抗病毒转基因作物的营养成分与原作物没有差异,另外转基因作物中残留 dsRNA 因为无法在哺乳动物细胞间传递且能很快被降解,不会产生类似植物体内的循环扩增反应,因此以目前报道的研究结果来看是能够满足人们对其食用安全性的要求。

由于利用 RNAi 技术在大豆研究上的应用研究较晚,大多还仅仅停留在起步阶段。随着 RNAi 技术的不断完善,该技术可以对一些影响大豆性状的基因功能实现高通量鉴定,同时加强其在生长发育过程、抗逆性提高、雄性不育、营养价值改善等领域的应用,并结合其他育种技术可以达到品种改良选育的目的。

参考文献

- [1] G J 汉农. RNAi—基因沉默指南[M]. 北京:科学出版社, 2005. (G J Hannon. RNAi: A guide to gene silencing[M]. Beijing: Science Press, 2005.)
- [2] Senthil S, Madge Y G, Oliver Y, et al. Terrence L. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and enhanced susceptibility to phytophthora sojae [J]. Plant Physiology, 2005, 137 (4): 1345-1353.
- [3] Nunes A C S, Vianna G R, Cuneo F, et al. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene(*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content[J]. Planta, 2006, 224(1): 125-132.
- [4] Lim H S, Ko T S, Lambert K N, et al. Soybean mosaic virus helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43: 1014-1021.
- [5] 李小平, 邓楠, 马媛媛, 等. 大豆类受体蛋白激酶基因(*rlpk2*) RNAi 双元表达载体的构建及其转基因[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(1): 1-8. (Li X P, Deng N, Ma Y Y, et al. Construction of RNAi binary vector of soybean receptor-like kinase gene (*rlpk2*) and its soybean transformation[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2006, 39(1): 1-8.)
- [6] Li X P, Ma Y Y, Li P L. RNAi-mediated knocking-down of *rlpk2* gene retarded soybean leaf senescence [J]. Chinese Science, 2005, 50(12): 1218-1224.
- [7] Kasai A, Ohnishi S, Yamazaki H, et al. Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50(6): 1090-1098.
- [8] 朱红林, 沙爱华, 符秀梅, 等. 转录调控基因 *GmLEC1* 转化大豆及转化方法的比较[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 7-12. (Zhu H L, Sha A H, Fu X M, et al. Cloning and transformation study of transcription factor *GmLEC1* in soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 7-12.)
- [9] Nishizawa K, Takagi K, Teraishi M, et al. Application of somatic embryos to rapid and reliable analysis of soybean seed components by RNA interference-mediated gene silencing[J]. Plant Biotechnology, 2010, 27: 409-420.
- [10] Qin L, Zhao J, Tian J, et al. The high-affinity phosphate transporter *GmPT5* regulates phosphate transport to nodules and nodulation in

- soybean[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1634-1643.
- [11] 孟颖颖. *GmCRYs* 和 *GmCIB3* 基因大豆调控开花及衰老的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012: 85-86. (Meng Y Y. Functional analysis of *CRYs* and *CIB3* in flowering and senescence regulation in soybean[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012: 85-86.)
- [12] Radwan O, Wu X, Govindarajulu M, et al. 14-3-3 proteins SCF14c and SCF14l play critical roles during soybean nodulation[J]. Plant Physiology, 2012, 60: 2125-2136.
- [13] 王新朵, 李莉, 王锡锋. 基于 RNA 干扰原理抗病毒转基因作物的应用及安全性[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 48-54. (Wang X D, Li L, Wang X F. Application and biosafety of transgenic antiviral crops based on RNA interference[J]. Plant Protection, 2011, 37(6): 48-54.)
- [14] Zhang C, Ghabrial S A. Development of bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean[J]. Virology, 2006, 344: 401-411.
- [15] 许宗宏, 郝青南, 陈森森, 等. 基于大豆花叶病毒衣壳蛋白基因的 RNA 干扰植物表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2010, 25(增刊): 1-4. (Xu Z H, Hao Q N, Chen L M, et al. Plant expression construct based on RNAi for soybean mosaic virus[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(Supp): 1-4.)
- [16] Zhang X C, Sato S, Ye X H. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene[J]. Phytopathology, 2011, 101: 1264-1269.
- [17] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25: 1322-1326.
- [18] Ibrahim H M M, Alkharouf N W, Meyer S L F, et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots[J]. Experimental Parasitology, 2011, 127: 90-99.
- [19] 李冬梅, 孟凡立, 王士坤, 等. 大豆食心虫 28SrDNA 基因的克隆及表达分析[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(7): 13-17. (Li D M, Meng F L, Wang Z K, et al. Cloning and characterization of 28SrDNA gene from soybean pod borer(*Leguminivora glycinivorella* Matsumura)[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(7): 13-17.)
- [20] 马建, 厉志, 刘艺苓, 等. 应用重组 PCR 技术构建大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 564-568. (Ma J, Li Z, Liu Y L, et al. Use recombinant PCR to construct RNAi expression vector of soybean lipoxylase[J]. Soybean Science, 2008, 27(4): 564-568.)
- [21] 魏益凡, 马建, 付永平, 等. 抑制大豆 *Le1* 基因表达的 RNAi 载体构建[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(3): 18-20. (Wei Y F, Ma J, Fu Y P, et al. Construction of RNAi vector inhibit expression of soybean *Le1* gene[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2010, 35(3): 18-20.)
- [22] 柴晓杰, 吕品, 张宇, 等. 胰蛋白酶抑制剂基因 siRNA 表达体系的构建[J]. 生物技术通报, 2007(6): 117-117. (Chai X J, Lyu P, Zhang Y, et al. Construction of siRNA expression system on *KST3* gene of soybean Kunitz-type Trypsin inhibitor[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(6): 117-117.)
- [23] 周海涛, 付永平, 王丕武. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因 RNAi 载体的构建[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 742-746. (Zhou H T, Fu Y P, Wang P W. Construction of RNAi expression vector of kunitz trypsin inhibitor gene from soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 742-746.)
- [24] 杜娟. 大豆胰蛋白酶抑制剂和凝集素双价 RNAi 载体的构建及转化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011: 56-63. (Du J. Construction of RNAi expressed vector of Kunitz trypsin inhibitor and soybean agglutinin gene from soybean and its transformation of soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011: 56-63.)
- [25] 王戈亮. 植物油脂积累机理和品质改良[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2007. (Wang G L. The Improvement of soybean oil quality using RNAi[D]. Beijing: Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, 2007.)
- [26] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean(*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(7): 1177-1184.
- [27] 柳青, 李欣达, 王玉民, 等. RNAi 干扰的 *F3H* 基因转化大豆的研究[J]. 北京农业, 2010(15): 7-11. (Liu Q, Li X D, Wang Y M, et al. Studies on transformation of *F3H* gene interfered by RNAi in soybean[J]. Beijing Agriculture, 2010(15): 7-11.)
- [28] Takagi K, Nishizawa K, Hirose A, et al. Manipulation of saponin biosynthesis by RNA interference-mediated silencing of beta-amyrin synthase gene expression in soybean[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(10): 1835-1846.
- [29] Wagner N, Mroczka A, Roberts P D, et al. RNAi trigger fragment truncation attenuates soybean FAD2-1 transcript suppression and yields intermediate oil phenotypes[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(7): 723-728.
- [30] 李夏, 戴佳乐, 陈子奇, 等. β -伴大豆球蛋白 α' -亚基基因 *ihp*-RNAi 表达载体的构建[J]. 西北农林科技大学学报, 2012, 40(10): 191-198. (Li X, Dai J L, Chen Z Q, et al. Construction of the *ihp*-RNAi expression vector of soybean β -conglycinin α' -subunits gene[J]. Journal of Northwest Agricultural & Forestry University, 2012, 40(10): 191-198.)
- [31] 陈子奇, 李夏, 王丕武, 等. 利用 RNA 干扰技术提高大豆脂肪含量[J]. 大豆科学, 2012, 27(4): 529-533. (Chen Z Q, Li X, Wang P W, et al. Using RNA interference technology to improve soybean fat content [J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 529-533.)
- [32] Pinto Y M, Kok R A, Baulcombe D C, et al. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 702-707.