

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01327

农杆菌介导转基因植物 T-DNA 的整合方式

杨琳, 付凤玲, 李晚忱

四川农业大学玉米所, 成都 611130

摘要: 农杆菌介导的遗传转化已被广泛应用于植物转基因研究。作为外源基因的载体, 农杆菌 T-DNA 片段在植物基因组中的整合方式, 不仅影响外源基因的整合效率及稳定性, 还会影响外源基因的表达特性。文章就农杆菌介导的 T-DNA 整合的两种主要模式、规律及相关研究手段进行综述, 为农杆菌介导的转基因及 T-DNA 插入突变等相关研究提供借鉴。

关键词: 农杆菌; T-DNA; 侧翼序列; 整合; 转基因

T-DNA integration patterns in transgenic plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

YANG Lin, FU Feng-Ling, LI Wan-Chen

Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: The genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* has been widely applied to research of transgenic plants. As the vector of the exotic genes, the integration patterns of T-DNA fragments affects not only transformation efficiency and stability, but also expression properties of the transgenes. This review summaries the two major patterns and the rules of T-DNA integration in *Agrobacterium*-mediated transformation, rules of T-DNA mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, as well as research tools for flanking sequence amplification. It is attempted to provide references for researches on transformation and T-DNA integration mutation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; transfer DNA; flanking sequence; integration; transgene

目前有关植物转基因的方法主要分为两大类, 一类是无转化载体引导的DNA的直接转化, 另一类是农杆菌介导的转化, 其中后者由于操作简单、转化效率高、插入片段稳定性好、转基因拷贝数低而成为转基因策略中的首选方法^[1,2]。农杆菌细胞中含

有基因组DNA和质粒DNA, 依农杆菌的不同, 质粒分别有Ti质粒和Ri质粒, 其上都有一段T-DNA。农杆菌细胞侵染植物伤口后, 可将T-DNA插入到植物基因组中, 从而实现外源基因向植物细胞的转移与整合, 最后通过植物细胞和植物组织培养可

收稿日期: 2011-03-30; 修回日期: 2011-07-25

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2009CB118400)和国家自然科学基金项目(编号: 30971795, 31071433)资助

作者简介: 杨琳, 硕士研究生, 专业方向: 生化与分子生物学。E-mail: myyanglin1986@21cn.com

通讯作者: 李晚忱, 博士, 教授, 研究方向: 玉米遗传育种与生物技术。E-mail: aumdys@sicau.edu.cn

网络出版时间: 2011-10-18 8:50:47

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111018.0850.002.html>

再生出转基因植株^[2-4]。T-DNA通过异常重组实现整合进入植物基因组中,它常伴随宿主细胞基因组重排^[5]。这种基因组的重排包括植物基因组整合位点的删除和重复,T-DNA序列的删除和重复,以及染色体上的易位和倒位^[4-7]。染色体重排包括易位和倒位,它们在T-DNA整合的转基因植物中表现出相同的特征。Nacry等^[6]研究发现,T-DNA整合的拟南芥发生染色体易位,断点即是T-DNA整合的位点。Caceres等^[7]研究表明,染色体倒位的位置多发生在转座子和逆转座子中。由于对染色重排的研究较少,其机制还不完善。转基因植物出现的染色体重排与T-DNA整合是否有直接的联系还有待进一步的研究^[2]。转基因作物的遗传稳定性及其品质决定了转基因作物的应用前景。农杆菌介导的T-DNA转化规律及转化模型的了解,不仅有助于外源基因表达及宿主基因表达的影响因素,同时对研究基因功能,转基因作物的应用均具有重要的意义^[8,9]。

1 T-DNA 整合模式及规律

T-DNA整合进入植物基因组,会对宿主细胞的基因组造成改变,这种变化无论是对外源的T-DNA的表达还是植物基因的表达都会产生影响。同时,T-DNA整合进入植物基因组的规律与稳定性将直接影响到转基因作物的品质。目前,虽然利用农杆菌介导的T-DNA转化技术已在多种禾谷类作物中获得成功,但较为完善的转化机制模型并未建立。对T-DNA整合植物基因组规律及植物转基因的整合机制的了解,对研究外源基因以及整合位点的宿主基因的功能,以及转基因作物在实际生产中的应用提供基础^[8,9]。

目前许多研究者通过对T-DNA整合位点的研究以及T-DNA结构特点研究建立外源基因在宿主中的整合与重排机制。针对于农杆菌介导的T-DNA整合宿主基因组的机制主要分为两类,主要分歧在于对VirD2蛋白在整个机制中的作用以及左右两端作用机制是否相同^[10-14]。

1.1 T-DNA 整合模式

T-DNA 整合模型的两种模型,分别是“单链缺

口修复模型”(Single-stranded gap repair, SSGR)和“双链断裂修复模型”(Double-stranded breaking repair, DSBR)。

在“SSGR模型”中(图 1),单链T-DNA的3'端有一段核苷酸序列与植物DNA同源,被取代的植物DNA链的一条链被核苷酸内切酶消化,如单链T-DNA有悬垂的3'端(C图三角形处)也将被核苷酸外切酶或核酸内切酶消化,接着T-DNA被5'端(附着在VirD2蛋白上)结合到互补靶向链的微同源区域,通过T-DNA与植物DNA链的复性使VirD2上的磷酸酐氨基酸键暴露在植物DNA下的3'羟基端,同时以复性的单链T-DNA的3'端作为引物来复制DNA,复制从植物DNA的缺刻按5'端到3'端方向延伸,导致这段植物DNA的缺失,接着位于T-DNA的5'端的磷酸酐氨基酸键被靶向DNA的磷酸二酯键取代,从而使T-DNA共价整合到植物染色体中^[10,15-17,18]。

该模型表明在T-DNA的整合过程中,两端的作用机制是不同的。左边界和宿主基因组的预整合位点结合(pre-insertion site),在整合过程中有缺失,并且与靶向位点处有一小段同源序列(5~7 bp)。而右边界整合过程比较保守,与靶向位点没有同源序列或

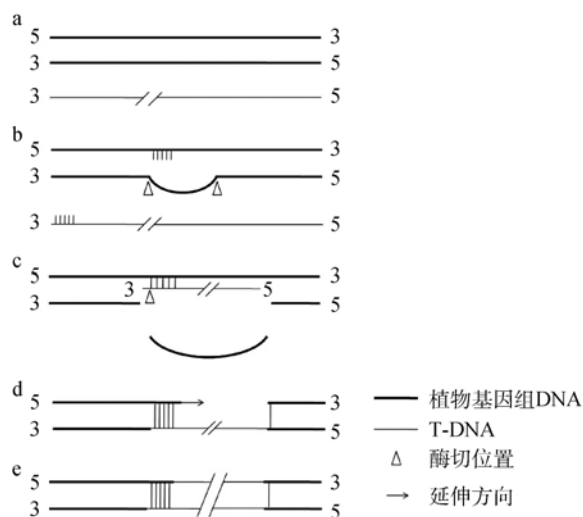


图 1 T-DNA 整合“单链缺口修复模型”

植物基因组的部分序列双链解开,单链T-DNA的3'端有一段核苷酸序列与植物DNA同源,被取代的植物DNA链的一条链被核苷酸内切酶消化,单链T-DNA如果有悬垂的3'端(C图三角形处)也将被核苷酸外切酶或核酸内切酶消化。T-DNA被5'端结合到互补靶向链,依箭头方向复制延伸,T-DNA便共价整合到植物染色体中。

者只有单碱基同源序列。这个模型强调了 VirD2 蛋白的作用, 同时 T-DNA 的整合是通过复性实现的。

然而, 一些研究表明, VirD2 蛋白不具连接酶的活性^[11,12]。Salomon和Puchta^[19]对转基因烟草的研究, 提出了T-DNA整合机制是通过“双链断裂修复机制”完成的, 与VirD2 无关^[5]。Kumar和Fladung 通过对转基因山杨的研究^[14], 完善了以基因组的双链断裂修复为基础的整合模型(图 2)。该模型首先是植物靶 DNA 产生双链断裂, 游离出的 3'端捕获出双链 T-DNA形成的D环, 找到与其同源的小段DNA后开始修复合成, 新合成的DNA序列与植物基因组另一端游离的 3'端有一小段同源的序列或没有同源序列而直接连接到平末端, 通过单链复性使余下的单链缺口被修复。

双链断裂修复模型表明 T-DNA 整合过程中, 左

右边界序列都有部分缺失, 由 T-DNA 的左边界复制形成的填充 DNA 就插入到了 T-DNA 的右侧与基因组序列之间。模型很好地解释了 T-DNA 的整合过程出现的缺失及填充 DNA(filler DNA)的形成。但对于许多研究所报道的多拷贝单位点整合等复杂的整合方式, 及 DNA 直接转化中的整合情况都不能很好地解释。

近期, Tzfira等^[8]和Zhu等^[3]对串联多联体的整合形式提出了“DSB整合模型”。他们认为, 串联的 T-DNA在整合进入植物基因组的过程中, T-DNA两末端对宿主植物的预整合位点不同, 导致染色体倒位。“DSB整合模型”也认为宿主染色体发生了双链的断裂, 但其整合方式比“DSBR模型”复杂。

这些机制分别可以解释研究过程中的一些现象, 但不能适应所有的整合情况, 仍需要完善或提出新的机制加以阐述。

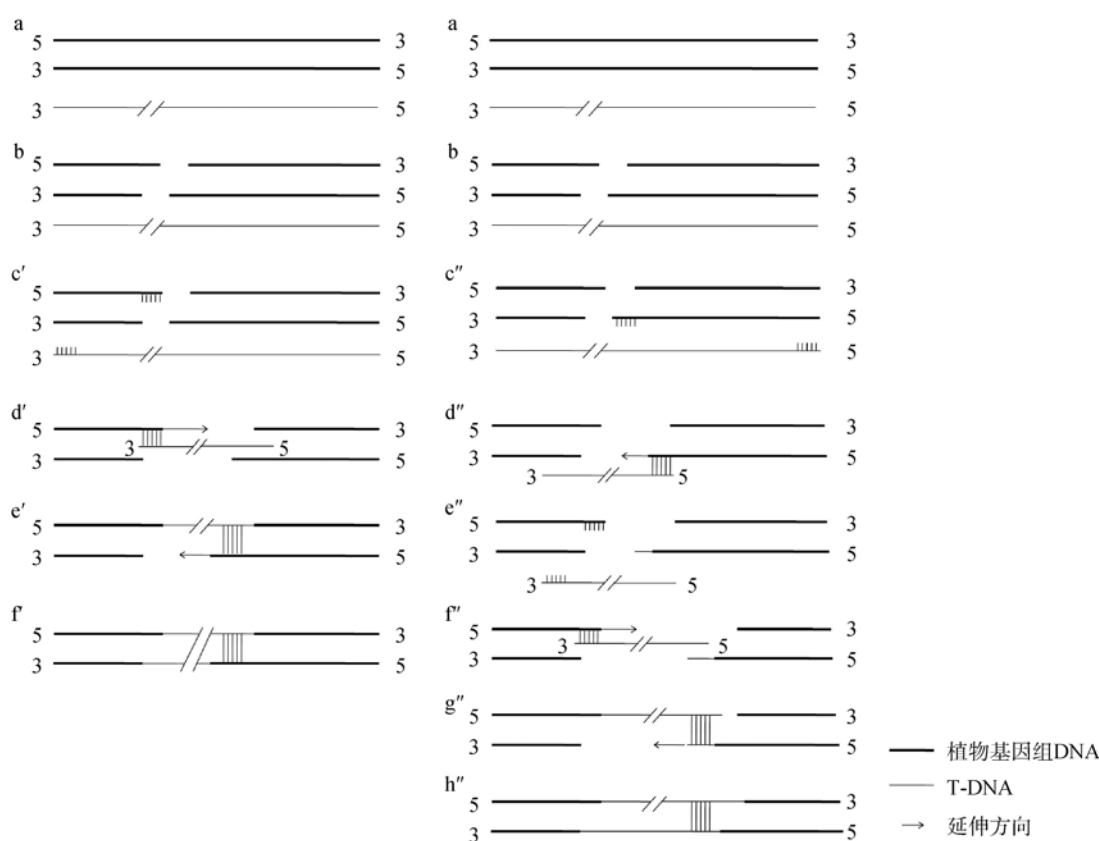


图 2 T-DNA 整合“双链断裂修复模型”

植物 DNA 产生双链断裂, 当植物基因组游离的 3'端捕获到 T-DNA 上的小段同源序列后开始修复合成。新合成的 DNA 序列与植物基因组另一端游离的 3'端有一小段同源的序列或没有同源序列而直接连接到平末端, 通过单链退火使余下的单链缺口被修复, T-DNA 就整合进入植物基因组中。当植物基因组游离的 3'端去捕获 T-DNA 小段同源序列时, 修复合成也可能发生失败, 此时, 植物基因组另一端游离的 3'端与 T-DNA 有小段序列同源结合, 然后依据第一种途径整合进入植物基因组中。

1.2 T-DNA 整合规律

T-DNA 断裂时会出现碱基的缺失, 整合到植物基因组中时会出现碱基序列的填充。Zhang 等^[20]在研究 T-DNA 整合的转基因水稻研究发现, 在插入位点的宿主植物基因片段与 T-DNA 左右边界的 25 bp 反向重复序列间存在边界序列的缺失和填充序列 (filler DNA)。同时, 左右边界出现缺失序列的情况不同且不存在规律, 而填充序列与宿主植物基因片段或 T-DNA 的左右边界存在一定程度的同源性^[21,22]。Matsumoto 等^[23]认为正是由于这种同源性才使得插入的 T-DNA 和靶序列相互靠近, 并有效的发生 DNA 链的交换, 造成了 DNA 的缺失和填充。同时, Buck 等^[24]、Windels 等^[25]和 Zeng 等^[26]也有相似的研究结果。

外源基因整合进入植物基因组中, 通常会将载体的骨架序列一并带入植物基因组。这一现象, 在 Greve 等^[27]、Shou 等^[28]和 Zhu 等^[4]对 T-DNA 整合的拟南芥、玉米、水稻的研究中都有发现。说明载体骨架进入植物基因组是转基因植物中的一种普遍现象, 并没有作物的特异性。Zhang 等^[29]对转基因棉花的研究表明, 载体骨架序列伴随 T-DNA 一同整合进入植物宿主细胞的比例高达 31%。Shou 等^[28]在对转基因玉米中整合进入的载体骨架序列进行研究发现, 伴随进入的骨架片段大小并无规律。骨架序列伴随进入的机制有待进一步研究。

骨架序列的出现与 DNA 边界序列的缺失是相关联的, 其本质是由于 T-DNA 断裂位点不同。当断裂点存在于 T-DNA 边界序列的内部时, 出现了 T-DNA 序列的缺失; 当断裂点存在于 T-DNA 外部时, 载体的骨架序列就会伴随靶序列一同整合进入植物基因组中。由于除了 T-DNA 上 25 bp 的反向重复序列外, 载体上仍然存在其他断裂也存在热点造成的^[30]。

1.3 T-DNA 整合位点的规律

T-DNA 与植物连接处富含 A/T 碱基对在许多植物中都有报道^[31,32]。Brunaud 等^[31]研究者通过分析 9 000 个 T-DNA 整合的拟南芥侧翼序列, 认为 T-DNA 容易整合进入植物富含 AT 碱基的区域。这一观点与 Muller 等^[33]的观点相同, 都认为 AT 碱基含量较高的区域作为 T-DNA 重组的热点可能由于 AT 配对的碱基只含有两个氢键, 它的断裂比 GC

配对的碱基断裂容易, 使得 AT 富含区形成的 DNA 不稳定, 容易解链或者形成 DNA 弯曲结构。

外源基因是以质粒为载体通过同源重组或其他途径整合到受体染色体 DNA 上。对拟南芥这一模式生物的研究中, 普遍认为, T-DNA 作为载体, 整合进入寄主染色体中, 整合位点是随机的。这种随机表现在两个方面: (1) 外源 DNA 可以插入到植物基因组的任何一条染色体; (2) 对于一条染色体而言, 外源基因可以插入其上的任何位点^[34]。而对水稻的研究中, 发现转基因在基因组和基因表达水平均为非随机的^[20], 插入位点表现出热点现象。Barakat 等^[35]认为, 外源片段易整合进入植物基因组中转入活跃的区域。T-DNA 还容易整合进入染色体的末端^[36,37]。Takano 等^[38]在研究转基因水稻的过程中, 提出了 T-DNA 的整合与表达和基因组中染色体的拓扑结构有关。外源基因整合进入植物基因组存在热点, T-DNA 插入位点具有偏好性在对转基因水稻、山杨、桦树等植物的研究中都得到证实^[26,35,38,39]。

T-DNA 整合进入植物基因组是随机的^[40]。在水稻、玉米、桦树等作为转基因材料的研究中出现 T-DNA 插入的偏好性和热点的现象, 并非 T-DNA 整合存在偏好。这一现象的出现, 与目的基因筛选转基因材料有关。当 T-DNA 整合进入内含子, 容易造成基因沉默, 目的基因不表达^[35]; 当 T-DNA 整合进入有功能的基因片段内, 会对基因功能造成影响, 并影响植物的生长, 而这两种影响是非等效的^[3,4]。同时, 在着丝点较远区域相较于离着丝点较近区域, 结构更为松散, 插入片段较易被筛选到^[37,41]。因而, T-DNA 容易插入染色体转录活跃区域, 并非是 T-DNA 整合进入基因组的偏向性所造成, 而是转基因过程中对转基因作物筛选造成的。

2 侧翼序列扩增方法

外源基因的插入改变了一个基因与其邻近基因或与其邻近染色质的位置关系, 从而使它的表型效应也发生变化的现象, 这就是所谓的位置效应^[15,42]。宿主基因组的遗传组成在转基因整合和表达中发挥着重要的作用^[13]。因此, 研究 T-DNA 插入位点的侧翼序列就显得尤为重要。PCR 是最常用的扩增已知序列的方法, 而扩增已知序列的侧翼不能用普通 PCR 的主要原因在于未知序列端上的引物无法预

知。目前扩增侧翼序列的方法主要分成两类,一类通过捆绑实现未知序列扩增,主要有:反向PCR(Inverse PCR),质粒援救法(Plasmid rescue),锅柄PCR(Panhandle PCR),多功能接头PCR(Versatile cassette PCR);另一类通过与兼并引物(Short arbitrary degenerate primer)共同作用实现扩增,主要有TAIL-PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR),改进后的hi-TAIL-PCR(High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR),以及SON-PCR(Single oligonucleotide nested PCR)等。

2.1 反向 PCR(Inverse PCR)

反向PCR^[9,43],可用于研究与已知DNA区段相连接的未知染色体序列,因此又可称为染色体缓移或染色体步移。它是最早提出的基于PCR的一种染色体步行PCR(Walking PCR)技术^[44,45]。通过各方面的改善,基于反向PCR技术开发的反向PCR自连接技术(Self-ligation of inverse PCR products, SLIP)已经可以快速高效地用于质粒库的筛选^[46]。

PCR 只能扩增两端序列已知的基因片段,反向 PCR 可扩增中间一段已知序列而两端序列未知的基因片段,也就是说这一反应体系不是在一对引物之间而是在引物外侧合成 DNA。图 3 所示,扩增前先用限制性内切酶酶切样品 DNA。然后用 DNA 连接酶连接成一个环状 DNA 分子,选择的引

物虽然与核心DNA区两末端序列互补,但两引物方向是相互反向的,通过反向PCR扩增引物的上游片段和下游片段,这对于T-DNA插入序列的确定和基因库染色体上DNA片段序列的识别十分重要^[44,47]。

反向PCR需要从许多酶中选择限制酶,或者说必须选择一种合适的某种植物的酶进行酶切才能得到合理大小的DNA片段,这种选择还不能在非酶切位点切断靶DNA。同时,在大多数有核基因组都含有大量中度和高度重复序列,而在载体中的未知功能序列中有时也会有这样的序列,这样通过反向PCR得到的探针就有可能与多个基因序列杂交^[48]。

此外,质粒援救法^[49,50]、锅柄PCR^[51]、多功能接头PCR等都是通过自我捆绑环化的方法,实现未知侧翼扩增。

2.2 热不对称 PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR)

TAIL-PCR又叫热不对称交错PCR,它是由Liu等^[52]首创并逐步完善。它是通过简并引物扩增出侧翼序列的典型方法。Sessions等^[53]用改进的TAIL-PCR法获得了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的T-DNA侧翼序列。Hi-tail-PCR是Liu等^[54]在TAIL-PCR基础上提出来的,它解决了TAIL-PCR出现的容易出现非特异扩增的问题。

TAIL-PCR 的基本原理是利用目标序列旁的已知序列设计 3 个嵌套的特异性引物(Special primer, 简称 sp1, sp2, sp3, 约 20 bp),用它们分别和 1 个具有低 *T_m* 值的短的随机简并引物(Arbitrary degenerate prime, AD, 约 14 bp)相组合,以基因组 DNA 为模板,根据引物的长短和特异性的差异设计不对称的温度循环,通过分级反应来扩增特异引物。TAIL-PCR 共分 3 次反应(图 4)。TAIL-PCR 是利用巢式特异引物的选择,通过高特异性的退火温度的循环,低特异性的复性温度的循环以及较高特异性的复性温度的循环交替形成超级大循环达到特异性引物和简并引物与模板结合扩增出已知片段的未知序列。

TAIL-PCR 技术简单易行,重复性好,能够在较短的时间内获得目标片段,已经成为分子生物学研究中的一种实用技术。但是由于使用简并引

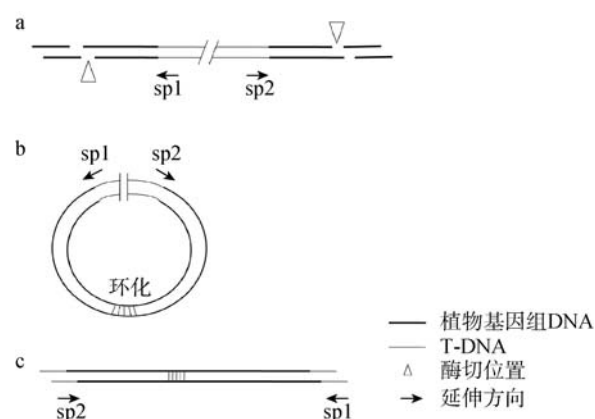


图 3 反向 PCR 扩增未知侧翼示意图

用合适的酶将整合进入植物基因组的 T-DNA 从植物基因组中酶切出带有 T-DNA 和及其位置侧翼的片段,将片段连接,形成环状。并根据已知 T-DNA 片段设计方向朝未知侧翼(植物基因组片段)的引物(sp1, sp2),用 sp1, sp2 扩增片段,就可以得到已知 T-DNA 的未知侧翼序列。

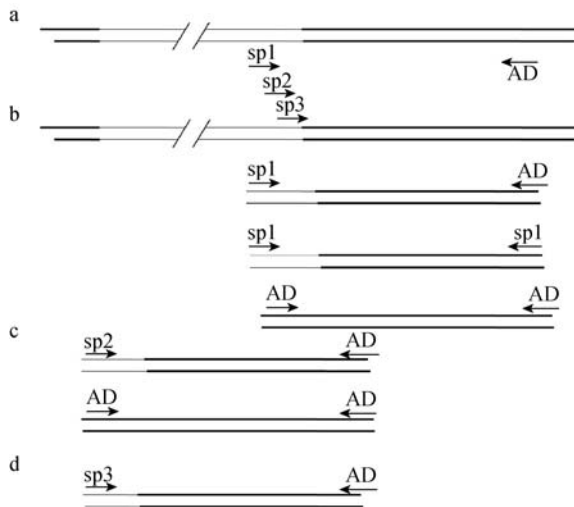


图 4 TAIL-PCR 扩增未知侧翼示意图

在插入的 T-DNA 序列的边界附近设计巢式特异性引物(SP1、SP2、SP3)以及适合转基因植物的简并引物(AD)。以转基因植物基因组 DNA 为模板, SP1 和 AD 为引物, 经过 5 次高特异性、1 次低特异、10 次较低特异性反应和 12 个热不对称的超级循环。经上述反应得到了不同浓度的 3 种类型产物: 由特异性引物和简并引物扩增出的产物, 由同一特异性引物扩增出的产物, 以及由同一简并引物扩增出的产物。将前次扩增产物稀释, 分别用 SP2、SP3 特异性引物经过热不对称循环筛选出与已知序列邻近的目标序列。

物, TAIL-PCR 容易产生非特异性扩增, 经改良过的 TAIL-PCR 能成功地从突变体中克隆到外源插入基因的旁侧序列, 从而为启动子的克隆提供了有效的新方法。

另外, SON-PCR(Single oligonucleotide nested PCR)^[55]方法的提出也是基于 TAIL-PCR, 克服非特异性的产生。Anta 等^[55]认为, 简并引物在某些植物中并不起作用, 他们提出的 SON-PCR 是利用低复性温度引发特异性单引物与已知片段结合的同时, 又与模板的已知片段侧翼的未知序列结合, 扩增出未知侧翼序列。但是此法的效率较低, 且根据物种的同源性, 简并引物对于大多数植物是适用的。

3 结 语

农杆菌介导的 T-DNA 整合进入植物细胞的过程相当复杂。虽然农杆菌介导的 T-DNA 整合方法已经成熟, T-DNA 插入植物基因组特点的研究取得了一定的成果。但是, T-DNA 序列和整合位点的特点因研究植物的不同, 都体现出一定程度的差异。并

且, 转入的外源基因整合是否具有稳定性, 整合的位置以及边界序列的状态等都难以控制。同时, 关于 T-DNA 的整合模式并不完善, 还有待于进一步的研究完善或提出新的模式去阐述 T-DNA 的整合。所以, 研究不同植物不同世代的农杆菌介导的 T-DNA 整合规律, 对于整合规律和模式的研究具有重要的意义。这些研究对于改进基因工程技术也是十分重要的, 也必将加速植物基因工程的发展。

参考文献(References):

- [1] Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9975–9979. DOI
- [2] Zhu CF, Wu JH, He CZ. Induction of chromosomal inversion by integration of T-DNA in the rice genome. *J Genet Genomics*, 2010, 37(3): 189–196. DOI
- [3] Meinke D, Scholl R. The preservation of plant genetic resources. Experiences with *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1046–1050. DOI
- [4] Zhu QH, Ramm K, Eamens AL, Dennis ES, Upadhyaya NM. Transgene structures suggest that multiple mechanisms are involved in T-DNA integration in plants. *Plant Sci*, 2006, 171(3): 308–322. DOI
- [5] 杨继芳, 刘明, 安利佳. T-DNA 整合的研究进展. *遗传*, 2004, 26(6): 991–996. DOI
- [6] Nacry P, Camilleri C, Courtial B, Caboche M, Bouchez D. Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics*, 1992, 149(2): 641–650. DOI
- [7] Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M, Ruiz Z. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science*, 285(5426): 415–418. DOI
- [8] Tzfira T, Li JX, Lacroix B, Citovsky V. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet*, 2004, 20(8): 375–383. DOI
- [9] Kim SR, Jeon JS, An G. Development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice. *Plant Reverse Genetics*, 2011, 678: 139–146. DOI
- [10] Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J*, 2000, 23(1): 11–28. DOI
- [11] Kohli A, Leech M, Vain P, Laurie DA, Christou P. Transgene organization in rice engineered through direct

- DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 7203–7208. [DOI](#)
- [12] Ziemienowicz A, Tinland B, Bryant J, Gloeckler V, Hohn B. Plant enzymes but not *Agrobacterium* VirD2 mediate T-DNA ligation *in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(17): 6317–6322. [DOI](#)
- [13] Kumar S, Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta*, 2001, 213(5): 731–740. [DOI](#)
- [14] Kumar S, Fladung M. Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J*, 2002, 31(4): 543–551. [DOI](#)
- [15] Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(6): 178–184. [DOI](#)
- [16] Zupan JR, Citovsky V, Zambryski P. *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(6): 2392–2397. [DOI](#)
- [17] Lu J, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJJ, Glover JNM. *Agrobacterium tumefaciens* VirC2 enhances T-DNA transfer and virulence through its C-terminal ribbon-helix-helix DNA-binding fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9643–9648. [DOI](#)
- [18] Zhang YG, Zeng FS, Xin Y. Progress on molecular mechanism of T-DNA transport and integration. *Acta Genet Sin*, 2005, 32(6): 655–665. [DOI](#)
- [19] Salomon S, Puchta H. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J*, 1998, 17(20): 6086–6095. [DOI](#)
- [20] Zhang J, Guo D, Chang YX, You CJ, Li XW, Dai XX, Weng QJ, Zhang JW, Chen GX, Li XH, Liu HF, Han B, Zhang QF, Wu CY. Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. *Plant J*, 2007, 49(5): 947–959. [DOI](#)
- [21] Muller AE, Atkinson RG, Sandoval RB, Jorgensen RA. Microhomologies between T-DNA ends and target sites often occur in inverted orientation and may be responsible for the high frequency of T-DNA-associated inversions. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(5): 617–630. [DOI](#)
- [22] Tang W, Newton RJ, Weidner DA. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *J Exp Bot*, 2007, 58(3): 545–554. [DOI](#)
- [23] Matsumoto S, Ito Y, Hosoi T, Takahashi Y, Machida Y. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. *Mol Gen Genet*, 1990, 244(3): 309–316. [DOI](#)
- [24] De Buck S, Podevin N, Nolf J, Jacobs A, Depicker A. The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J*, 2009, 60(1): 134–145. [DOI](#)
- [25] Windels P, De Buck S, van Bockstaele E, De Loose M, Depicker A. T-DNA integration in *Arabidopsis* chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. *Plant Physiol*, 2003, 133(4): 2061–2068. [DOI](#)
- [26] Zeng FS, Zhan YG, Zhao HC, Xin Y, Qi FH, Yang CP. Molecular characterization of T-DNA integration sites in transgenic birch. *Trees*, 2010, 24(4): 753–762. [DOI](#)
- [27] De Greve H, Nguyen VK, Deboeck F, Thia-toong L, Karimi M, Hernalsteens JP. T-DNA tagging of the translation initiation factor eIF-4A1 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2001, 161(4): 685–693. [DOI](#)
- [28] Shou H, Frame BR, Whitham SA, Wang K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed*, 2004, 13(2): 201–208. [DOI](#)
- [29] Zhang J, Cai L, Cheng JQ, Mao HZ, Fan XP, Meng ZH, Chan KM, Zhang HJ, Qi JF, Ji LH, Hong Y. Transgene integration and organization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. *Transgenic Res*, 2008, 17(2): 293–306. [DOI](#)
- [30] 侯雷平, 王小菁, 李洪清, 李梅兰. 应用Tail-PCR扩增蓝猪耳T-DNA侧翼序列. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 871–874. [DOI](#)
- [31] Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, Aubourg S, Samson F, Chauvin S, Bechtold N, Cruaud C, Rose DR, Pelletier G, Lepiniec L, Caboche M, Lecharny A. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep*, 2002, 3(12): 1152–1157. [DOI](#)
- [32] Forsbach A, Schubert D, Lechtenberg B, Gils M, Schmidt R. A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(1): 161–176. [DOI](#)
- [33] Müller AE, Kamisugi Y, Grüneberg R, Niedenhof I, Hörold RJ, Meyer P. Palindromic sequences and A+T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. *J Mol Biol*, 1999, 291(1): 29–46. [DOI](#)
- [34] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002: 623–624. [DOI](#)
- [35] Barakat A, Gallois P, Raynal M, Mestre-Ortega D, Sallaud

- C, Guiderdoni E, Delseny M, Bernardi G. The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Lett*, 2000, 471(2–3): 161–164. [DOI](#)
- [36] Ten Hoopen R, Robbins TP, Franse PE, Montijn BM, Oud O, Gerats AGM, Nanninga N. Localization of T-DNA Insertions in *Petunia* by Fluorescence in Situ Hybridization: Physical Evidence for Suppression of Recombination. *Plant Cell*, 1996, 8(5): 823–830. [DOI](#)
- [37] Jiang L, Zhang W, Xia Z, Jiang G, Qian Q, Li A, Cheng Z, Zhu L, Mao L, Zhai W. A paracentric inversion suppresses genetic recombination at the FON3 locus with breakpoints corresponding to sequence gaps on rice chromosome 11L. *Mol Genet Genomics*, 2007, 277(3): 263–272. [DOI](#)
- [38] Takano M, Egawa H, Ikenda JE, Wakasa K. The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J*, 1997, 11(3): 353–361. [DOI](#)
- [39] Kumar S, Fladung M. Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Mol Gen Genet*, 2000, 264(1–2): 20–28. [DOI](#)
- [40] Hobbs SLA, Kpodar P, Delong CMO. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol*, 1990, 15(6): 851–864. [DOI](#)
- [41] Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Ábraham E, Kerekes I, Zsigmond L, Nagy R, Alvarado M, Krasovskaja I, Gál M, Berente A, Rédei GP, Haim AB, Koncz C. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J*, 2002, 32(2): 233–242. [DOI](#)
- [42] Peach C, Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(1): 49–60. [DOI](#)
- [43] Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(16): 8186. [DOI](#)
- [44] Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 1988, 120(3): 621–623. [DOI](#)
- [45] Li W, Zhu SL, Li N, Chen XY. Characteristics of nucleotides and amino acids in cDNA sequence of xyloglucan endotransglycosylase cloned from *Anthocephalus chinensis*. *Forestry Studies China*, 2011, 13(1): 45–51. [DOI](#)
- [46] Hoskins RA, Stapleton M, George RA, Yu C, Wan KH, Carlson IW, Celniker SE. Rapid and efficient cDNA library screening by self-ligation of inverse PCR products (SLIP). *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21): e185. [DOI](#)
- [47] Akiyama K, Watanabe H, Tsukada S, Sasai H. A novel method for constructing gene targeting vectors. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(16): e77. [DOI](#)
- [48] Yu Q, Lu Y, Nerurkar VR, Yartagihara R. Amplification and analysis of DNA flanking known sequences of a novel herpesvirus from green turtles with fibropapilloma. *Arch Virol*, 2000, 145(12): 2669–2676. [DOI](#)
- [49] Kiessling U, Platzer M, Strauss M. Plasmid rescue-A tool for reproducible recovery of genes from transfected mammalian cells? *Mol Gen Genet*, 1984, 193(3): 513–519. [DOI](#)
- [50] Wade-Martins R. Developing extrachromosomal gene expression vector technologies: an overview. *Methods Mol Biol*, 2011, 738: 1–17. [DOI](#)
- [51] Jones DH, Winistorfer SC. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(3): 595–600. [DOI](#)
- [52] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, 8(3): 457–463. [DOI](#)
- [53] Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Jennifer S, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA. A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell*, 2002, 14(12): 2985–2994. [DOI](#)
- [54] Liu YG, Chen YL. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649–656. [DOI](#)
- [55] Antal Z, Rasclé C, Fèvre M, Bruel C. Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr Genet*, 2004, 46(4): 240–246. [DOI](#)