

# 转 $\gamma$ -生育酚甲基转移酶基因大豆的获得<sup>\*</sup>

康小虎<sup>1,3</sup> 欧阳青<sup>1,2</sup> 吴存祥<sup>1</sup> 张玉满<sup>2</sup> 白羊年<sup>1</sup> 曹孜义<sup>3</sup>  
蔡文启<sup>2, \*\*</sup> 韩天富<sup>1, \*\*</sup>

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080;  
3. 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

**摘要** 以大豆子叶节为外植体, 利用  $\gamma$ -生育酚甲基转移酶基因 ( $\gamma$ -TMT) 的种子特异性表达载体 p7S-TMTL, 通过农杆菌介导法转化大豆, 获得 26 株抗卡那霉素再生植株。PCR 检测结果表明其中 4 株为阳性, 初步证明  $\gamma$ -TMT 已整合到这 4 株大豆的基因组中。

**关键词** 大豆;  $\gamma$ -TMT;  $\alpha$ -生育酚; 农杆菌介导; 子叶节; PCR

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)03-0236-03

生育酚(俗称维生素 E)是仅由光合生物合成的一类脂溶性的强抗氧化剂, 是人体和动物所必需的维生素之一。维生素 E 日吸收量达 10-13.4 IU (国际单位)(约 7-9mg $\alpha$ -生育酚)时方可维持成人肌肉、心血管和中枢神经系统及其它器官的正常功能。临床研究表明, 维生素 E 可提高人体免疫功能、防治或延缓多种慢性病的进程、降低患心血管疾病和某些癌症的危险<sup>[1]</sup>。缺乏时, 很容易出现生殖系统的萎缩和损害。在天然存在的 8 种生育酚形式中, 完全被甲基化了的  $\alpha$ -生育酚生物活性最高, 而且可被人体优先吸收和利用<sup>[2]</sup>。植物油是生育酚的主要膳食来源, 但在大多数植物油中  $\alpha$ -生育酚含量偏低, 而其生物合成前体  $\gamma$ -生育酚含量则较高。大豆油中  $\alpha$ -生育酚的含量仅占生育酚总量的 7%, 而  $\gamma$ -生育酚却高达 70%<sup>[3]</sup>。目前, 生育酚生物合成途径的相关基因大多已被克隆、鉴定<sup>[4-6]</sup>, 现已证实  $\gamma$ -生育酚甲基转移酶 ( $\gamma$ -TMT) 催化  $\gamma$ -生育酚向  $\alpha$ -生育酚的转变<sup>[7,8]</sup>。随着分子生物学的迅速发展, 通过基因工程手段可望提高大豆中  $\gamma$ -TMT 的表达, 使  $\gamma$ -生育酚转变为  $\alpha$ -生育酚。本文旨在利用种子特异性表达载体 p7S-TMTL 将  $\gamma$ -TMT 转入大豆以提高豆油中  $\alpha$ -生育酚的含量, 从而提高其营养价值。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料及菌株

选作外植体的大豆品种为吉林小粒 1 号, 由吉林农业科学院杨光宇研究员提供。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 (PMP90) 由本实验室保存。

#### 1.1.2 种子特异性表达载体

含种子特异性启动子 7S 的质粒 pU8-2 由中国科学院植物研究所宋艳茹研究员惠赠。 $\gamma$ -TMT 基因克隆自结球甘蓝<sup>[9]</sup>, 种子特异性表达载体 p7S-TMTL (图 1) 为本课题组构建。载体 p7S-TMTL 上带有种子特异性表达的启动子 7S 和 NOS 终止子, 顺向插有 1.06 kb 的  $\gamma$ -TMT, 筛选标记基因为 NPTII (新霉素转移酶基因)。

#### 1.1.3 培养基及化学试剂

实验所用基本培养基为 MSB; MS 无机盐成分 + B5 有机成分。诱导丛生芽培养基: MSB 培养基中含 0.2mg/L IBA, 2.0mg/L 6-BA 和 30mg/L 乙酰丁香酮。筛选丛生芽培养基: MSB 培养基中含 0.05mg/L IBA、1.5mg/L 6-BA、50mg/L 卡那霉素。诱导生根培养基: MSB 培养基中含 1.2mg/L 6-BA。

PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成, Taq DNA Polymerase 购自 Takara 公司。6-BA、IBA、Cef、Kan、乙酰丁香酮均购自 SIGMA 公司。

\* 收稿日期: 2004-04-05

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30270856)和国家重点基础研究发展计划(2002CB111301)资助。

\*\* 通讯作者: E-mail: caiwq@sun.im.ac.cn; E-mail: hantf@mail.caas.net.cn

作者简介: 康小虎(1977-), 男, 在读硕士研究生



图 1 种子特异性表达载体 p7S-TMTL

Fig. 1 Seed specific expression vector p7S-TMTL

1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导法

农杆菌介导的子叶节转化参照欧阳青<sup>[9]</sup>、王萍等<sup>[10]</sup>方法。

1.2.2 转基因大豆的 PCR 检测

应用改进的 CTAB 法提取大豆基因组 DNA<sup>[9]</sup>, 质粒提取和纯化参照标准实验方案进行<sup>[11]</sup>, 所用引物为 P7S5 和 GSP3, 扩增的目的片段包含种子特异性表达启动子的部分片段和  $\gamma$ -TMT, 长度为 1.3 kb。

P7S5: 5'-CCCAAGCTTCTATCTGTCAC-TTC-3'  
 GSP3: 5'-GCAGATTCTGTCCAAGAGGTTCC-3'

PCR 反应体系: 10-50ng 大豆基因组 DNA 为模板, 以 P7S5 和 GSP3 为引物对目的片段进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94℃ 4min; 94℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 40s, 35 个循环; 72℃ 10min。反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 所用凝胶成像系统为 BIO-RAD Universal Hood II。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的大豆子叶节转化

大豆子叶节用农杆菌侵染后, 在诱导丛生芽培养基上培养 10 天, 可观察到丛生芽出现(图 2, I), 伸长至 1-2cm 时, 转移到筛选丛生芽培养基上。

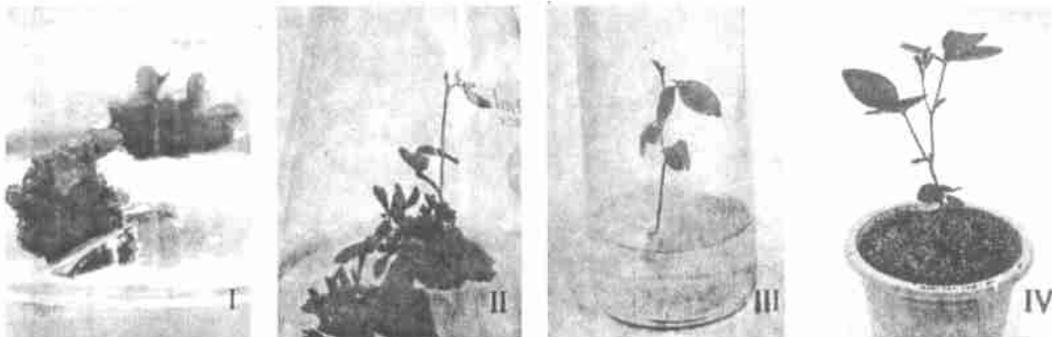


图 2 转基因大豆的再生

Fig 2 Regeneration of transgenic soybean

- I 丛生芽 II 丛生芽筛选 III 抗性苗生根 IV 移栽后的转基因大豆
- I Multiple shoot-buds; II Screening of multiple shoot-buds
- III Induction of root regeneration; IV Transplanted transgenic soybean

在含有卡那霉素的培养基上, 筛选丛生芽, 能很好地抽长且生长健壮的丛生芽称为抗性苗(图 2, II)。待其抽长至 4-5cm 后开始在诱导生根培养基中诱导生根(图 2, III), 生根后移栽(图 2, IV)。

2.2 PCR 检测结果

移栽成活后剪取约 1cm<sup>2</sup> 叶片提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。以 P7S5 和 GSP3 为引物, 以 p7S-TMTL 质粒作为阳性对照, 野生型的吉林小粒 1 号为阴性对照。PCR 检测结果显示, 26 株抗性植株中有 4 株扩增出 1300bp 的目的片段, 而阴性对照中未能扩增出相应片段(图 3)。初步证明目的基因已整合进大豆基因组。



图 3 Kan 抗性苗的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR detection of Kanamycin resistant soybean 1: 野生型大豆; 2-5: 转基因植株; 6: 阳性对照(质粒 p7S-TMTL); M: DNA marker (DL2000)  
1: Wild type soybean; 2-5: Transgenic plants; 6: Positive control(plasmid p7S-TMTL); M: DNA marker (DL2000)

3 讨论

随着对生育酚生物合成途径的进一步了解,应用生育酚生物合成过程中的关键基因提高 $\alpha$ -生育酚含量成为可能。自1998年Shintani和DellaPenna<sup>[4]</sup>将拟南芥的 $\gamma$ -TMT基因置于种子特异性表达的启动子DC3下转化拟南芥获得成功之后,Alison<sup>[12]</sup>等于2003年将拟南芥的 $\gamma$ -TMT在大豆种子中特异性表达也取得显著进展,这些工作为进一步揭示 $\alpha$ -生育酚合成途径奠定了良好基础。同年,欧阳青<sup>[9]</sup>等从结球甘蓝中克隆了 $\gamma$ -TMT(命名为BoTMT),并构建了种子特异性表达载体p7S-TMTL。为提高豆油中 $\alpha$ -生育酚含量,我们利用p7S-TMTL转化大豆。该转基因大豆的获得,是培育高 $\alpha$ -生育酚含量大豆新品种的良好开端,也为以后的研究工作奠定坚实的基础。

本研究通过POR检测试验4株为阳性,植株初步证明 $\gamma$ -TMT已整合到这4株大豆基因组中,但仍需进一步进行分子杂交验证。

## 参 考 文 献

- 1 National Research Council (U. S.), Food and Nutritional Board. NAS-NRC Recommended Dietary Allowances (10th ed.) [R]. Washington DC., National Academy Press, 1989, 284.
- 2 Shintani D., DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of

- plants through metabolic engineering. Science, 1998, 282: 2098-2100.
- 3 黄筱声. 天然维生素E与人体健康[J]. 粮食与油脂, 2001, 9: 35-36.
- 4 Shintani D.K., Cheng Z., DellaPenna D. The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp [J]. PCC6803. FEBS Lett, 2002, 511: 1-5.
- 5 Soll J., Schultz G. 2-methyl-6-phytylquinol and 2,3-dimethyl-5-phytylquinol as precursors of tocopherol synthesis in spinach chloroplasts [J]. Phytochem, 1980, 19: 215-218.
- 6 Ouyang Q., Fan C., Sun H. et al. Cloning and analysis of a  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase gene from *Brassica oleracea* and the function of its recombinant protein [J]. Progress in Natural Science, 2003, 13: 709-715.
- 7 Eckardt N. A. Vitamin E-defective mutants of *Arabidopsis* tell tales of convergent evolution [J]. Plant Cell, 2003, 15: 2233-2235.
- 8 Karin H. Vitamin production in transgenic plants [J]. Plant Physiol, 2003, 160: 821-829.
- 9 欧阳青. 结球甘蓝 $\gamma$ -生育酚基因的克隆及转基因大豆研究[D]. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2003.
- 10 王萍, 王军军, 商德虎, 等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子的研究 [J]. 吉林农业科学, 2001, 26(6): 20-23.
- 11 J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔 著 黄培堂 等译. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- 12 Alison L., Eenennaam V., Lincoln K., et al. Engineering Vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. Plant Cell, 2003, 15: 3007-3019.

## TRANSFORMATION OF SOYBEAN WITH $\gamma$ -TMT FROM *BRASSICA OLERAEA* FOR $\alpha$ -TOCOPHEROL ELEVATION

Kang Xiaohu<sup>1,3</sup> Ouyang Qing<sup>1,2</sup> Wu Cunxiang<sup>1</sup> Zhang Yuman<sup>2</sup> Bai Yangnian<sup>1</sup>  
Cao Ziyi<sup>3</sup> Cai Wenqi<sup>2</sup> Han Tianfu<sup>1</sup>

1. *Institute of Crop Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;*
2. *Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;*
3. *College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070* )

**Abstract** Transformation of soybean with seed specific expression vector p7S-TMTL was conducted through *Agrobacterium*-mediated co-transformation. Twenty-six Kanamycin resistant plants were examined by PCR with specific primers. Four plants showed positive signals, indicating that  $\gamma$ -TMT was transformed into the genome of these four plants.

**Key words** Soybean;  $\gamma$ -TMT;  $\alpha$ -tocopherol; *Agrobacterium*-mediated co-transformation; Cotyledonary node; PCR