

大豆异黄酮合成关键酶基因的克隆及表达分析

钱丹丹¹, 龚德顺², 焦 丽¹, 翟 莹¹, 张海军¹, 李景文¹, 王 英¹, 王庆钰¹

(1. 吉林大学 植物科学学院, 植物种质资源与利用实验室, 吉林 长春 130062; 2. 中国科学技术大学 生命科学学院, 合肥微尺度物质科学国家实验室, 安徽 合肥 230027)

摘要: 采用 RT-PCR 法克隆了大豆异黄酮生物合成途径中查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)和查尔酮异构酶(Chalcone Isomerase, CHI) 2 个关键酶基因, 并利用 SOE-PCR 技术成功将 2 个基因融合, 将其均构建原核表达载体, 在大肠杆菌中进行了初步的表达研究, 为进一步研究 CHS 和 CHI 2 种关键酶的功能奠定了基础。同时构建了真核表达载体, 采用农杆菌转化法侵染大豆子叶节, 获得了转基因抗性植株。

关键词: 大豆异黄酮; 查尔酮合酶; 查尔酮异构酶; 表达分析

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)05-0743-06

Cloning and Expression Analysis of Key Enzymes Genes in Biosynthesis of Soybean Isoflavones

QIAN Dan-dan¹, GONG De-shun², JIAO Li¹, ZHAI Ying¹, ZHANG Hai-jun¹, LI Jing-wen¹, WANG Ying¹, WANG Qing-yu¹

(1. Plant Germplasm and Application Laboratory, Plant Science College, Jilin University, Changchun 130062, Jilin; 2. Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China)

Abstract: Chalcone Synthase(CHS) and Chalcone Isomerase(CHI) are two key enzymes in soybean isoflavones biosynthesis pathway, the cDNAs of CHS and CHI were cloned using RT-PCR method and these two genes were fused using SOE-PCR, then constructed *E. coli* expression vectors to study the expression. The eukaryocyte expression vectors were also constructed and transferred into soybean cotyledonary nodes using *Agrobacterium*-mediated transformation, and then obtained the resistant transgenic plants.

Key words: Soybean isoflavones; Chalcone synthase; Chalcone Isomerase; Expression Analysis

大豆异黄酮是大豆生长中形成的一种重要的次生代谢产物。研究发现大豆异黄酮在预防癌症、骨质疏松症、心血管疾病和改善妇女更年期综合症等方面具有生物效应, 是应用比较广泛的保健性活性物质^[1-2]。异黄酮的合成需要一系列的关键酶, 其中包括查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)和异黄酮合酶(Isoflavone synthase, IFS)。

近年来有很多通过转化单个关键酶基因来提高异黄酮含量的报道^[3-5], 但是都没有达到稳定高效提高异黄酮含量的效果。随着基因工程的快速发展, 多基因转化策略越来越受到重视。由于目前仍然没有稳定高效的大豆遗传转化体系^[6], 在侵染大豆时分次转化或共转化多个基因就成为一个难点。利用串联基因簇或连接肽进行多基因融合是有效的多基因转化手段^[2, 7]。在进行多基因融合表达载体的构建

时, 连接肽的选择很重要。连接多肽 2A 是一段来自口蹄疫病毒的多肽, 编码 20 个氨基酸, 在真核生物体内表达时, 在第 19 个氨基酸和第 20 个氨基酸之间会发生自剪切作用, 形成 2 个肽段^[7-10]。用连接肽 2A 进行多基因转化的研究多以哺乳动物、人类、真菌细胞、昆虫、病毒为受体, 在植物中主要以模式植物烟草和拟南芥为对象, 迄今为止在主要农作物中的研究报道只局限于单子叶的玉米, 如果这种多基因转化手段可以在大豆等双子叶植物中应用, 将会大大促进转基因大豆新品种的培育, 为多价转基因农作物的获得提供一种新的技术手段^[11]。

该试验利用 SOE-PCR 技术将大豆异黄酮生物合成途径中查尔酮合酶和查尔酮异构酶基因融合, 在大肠杆菌中进行初步的表达研究, 为 CHS 和 CHI 蛋白的功能研究以及生物合成奠定了基础。同时构建真核表达载体, 采用农杆菌转化法侵染大豆子

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-003); 吉林省科技厅重点资助项目(20080204); 国家自然科学基金资助项目(30971808)。

第一作者简介: 钱丹丹(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: QIANDANDAN2008K@163.com。

通讯作者: 王庆钰(1963-), 女, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

叶节,获得了转基因抗性植株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆材料 大豆品种吉林 32,用于总 RNA 提取;大豆品种平安 8 号用于农杆菌侵染;均由吉林大学植物科学学院植物种质资源与利用研究室提供。

1.1.2 质粒和菌种 pMD-18T 载体购自 TAKARA 公司;质粒 pBI121、质粒 p28 以及大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21 感受态细胞、农杆菌 EHA105 感受态细胞均由植物种质资源与利用实验室保存。

1.1.3 酶和其它试剂 反转录酶、Taq 酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 Trizol 等试剂均购自 TAKARA 公司;DNA 回收试剂盒购自维特洁生物技术责任有限公司;其余各种试剂均为国产分析纯,购自金太化玻公司;引物合成、基因测序由华大基因公司完成。

1.2 试验方法

采用 Trizol 试剂盒提取大豆 RNA,随后利用反转录 PCR 技术分别进行 *CHSK*、*CHIK* 基因的扩增,融合基因的拼接采用重叠延伸拼接 PCR 技术,又称之为 SOE-PCR 技术(Gene splicing by overlap extension, SOE)。然后分别构建单个基因和融合基因的原核和真核表达载体,并进行初步的原核表达分析以及转基因研究。

1.2.1 大豆 RNA 的提取及反转录 大豆 RNA 的提取按照 Invitrogen 的 Trizol 试剂盒说明进行操作, mRNA 的反转录参照 Liu 等的方法^[12]。

1.2.2 *CHSK* 基因的扩增 以大豆 *CHS* 基因序列(GenBank:AY237728.1)为模板,设计了一对特异引物:

上游引物 SF:5'-GCTCTAGAACCCTTCAACCCTCACATAC-3'

下游引物 SR:5'-CGGGATCCTATATTAGGCATCTCAGATG-3'

其中划线部分为 *Xba*1, *Bam*H1 的酶切位点序列。以 SF, SR 为引物做 TD-PCR 扩增大豆 *CHS* 编码基因及前端 KOZAK 序列,简称为 *CHSK*。PCR 反应体系:10 \times buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, SF 1 μ L, SR 1 μ L, 模板 2 μ L, DNA Polymerase 0.3 μ L, 加 ddH₂O 至总体积 25 μ L。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min;

10 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收得到目的片段连接至 pMD-18T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,利用 α 互补及菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取连接有目的片段的质粒,酶切鉴定正确的质粒送交华大基因公司测序。

1.2.3 *CHIK* 基因的扩增 以大豆 *CHI* 基因序列(GenBank:AY595415.1)为模板,设计了一对特异引物:

上游引物 IF:5'-GCTCTAGATGGCAATGGCATTCCCGTCC-3'

下游引物 IR:5'-CGAGCTCACAGCAGAGTGGTAAGGGATTTTG-3'

其中划线部分为 *Xba*1, *Sac*1 的酶切位点序列。以 IF, IR 为引物做 TD-PCR 扩增大豆 *CHI* 编码基因及其前端 KOZAK 序列,简称为 *CHIK*。PCR 反应体系:10 \times buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, SF 1 μ L, SR 1 μ L, 模板 2 μ L, DNA Polymerase 0.3 μ L, 加 ddH₂O 至总体积 25 μ L。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 70.3 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;25 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min;10 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收得到目的片段连接至 pMD-18T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,利用 α 互补及菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取连接有目的片段的质粒,酶切鉴定正确的质粒送至华大基因公司测序。

1.2.4 融合基因 *SI* 和 *SAI* 的扩增 以测序正确的分别连有 *CHS* 基因和 *CHI* 基因的质粒为模板,设计基因交错拼接(Gene splicing by overlap extension, SOE) SOE-PCR 的引物:

CHSF:5'-GCTCTAGAATGGTGAGCGTAGCTGATCCGCCAGGCAC-3'

CHSAR:5'-TCCCGCAAGCTTAAGAAGGTCAAAATTCAACAGTTGGATGGCCACACTGCGCAG-3'

CHIAF:5'-CTTAAGCTTGGCGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCTATGGCATTTCGGTCCGTAA-3'

CHIR:5'-CGGGATCCTCACTTATGAGATTGAGG GTCACAAACCCAGG-3'

CHSR:5'-TGAAGAACCACCGATGGCCACACTGCGCAGAAC-3'

CHIF:5'-GGTGTTCTTCAATGGCATTTCGGTCGTAACCTCTGTAACTGTG-3'

其中双下划线部分为接头序列,阴影部分为 2A 肽基因序列。SOE-PCR 反应体系(含有 2A 肽基因):以测序正确的连有 *CHS* 基因的质粒为模板,以

CHSF, CHSAR 为引物做 TD-PCR 扩增 *CHS* 编码序列基因,反应条件同上 1.2.2,将其第一次退火温度改为 77℃;以测序正确的连有 *CHI* 基因的质粒为模板,以 CHIAF, CHIR 为引物做 TD-PCR 扩增 *CHI* 编码序列基因,反应条件同上 1.2.3,将其第一次退火温度改为 77℃;PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收得到目的片段各 1.0 μL 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系如下: ddH₂O 19.7 μL , 10 \times buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTP 0.5 μL , exTaq 0.3 μL , PCR 反应程序: 94℃ 预变性 8 min, 94℃ 变性 30 s, 45℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 10 个循环。以此反应液为模板,补齐体系: ddH₂O 19.7 μL , 10 \times buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTP 0.5 μL , CHSF、CHIR 各 1.0 μL , exTaq 0.3 μL 。进行 PCR 扩增反应: 94℃ 预变性 8 min, 94℃ 变性 30 s, 76.7℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 94℃ 变性 30 s, 45℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 25 个循环; 72℃ 后延伸 5 min; 10℃ 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收得到目的片段连接至 pMD-18T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,利用 α 互补及菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取连接有目的片段 *SAI* 的质粒,酶切鉴定正确送去测序。试验中为了最后检测 2A 连接肽是否有作用,同时构建了含有 GGSS 氨基酸序列 linker 的融合基因 *SI*,反应条件同上,只是将引物 CHSAR 换为 CHSR, CHIAF 换为 CHIF。

1.2.5 原核表达载体的构建与转化 设计包含 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点的引物,以分别含有 *CHS*, *CHI*, *SI*, *SAI* 的 pMD-18T 载体为模板进行 PCR 得到各基因的编码序列,采用 pET-28a 改造而来的 p28 为原核表达载体,相比于 pET-28a, p28 的区别仅在于少了 thrombin 酶切位点。连接转化,将载体转入大肠杆菌常用表达菌株 BL21 中,抽提质粒酶切鉴定,测序结果正确。取 10 μL 菌种接入到 5 mL 含有 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那抗性的 LB 液体培养基中,37℃ 摇菌,过夜。次日转接入 300 mL LB 的大瓶培养基中,37℃ 摇至 OD 值至 0.8 ~ 1.0 之间,冰上冷却菌液,加入 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 进行诱导,转入 16℃ 摇床诱导表达 24 h。离心收集菌体,超声破碎,分别取上清沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,观察蛋白表达与否。结果初步显示 *SI* 和 *SAI* 没有表达,于是将 p28-*SI* 和 p28-*SAI* 质粒转入适合表达毒性蛋白的大肠杆菌 C43 表达菌株中,其余步骤与在 BL21 菌株中表达 *CHS* 和 *CHI* 蛋白的步骤相同。

1.2.6 真核表达载体的构建与转化 用 *Xba*I 和

*Sac*I 双酶切处理植物表达载体 pBI121 及含有目的片段的 pMD-18T 载体,分别回收载体片段及目的基因片段,用 T4DNA 连接酶,16℃ 连接 3 h,将连接产物转入大肠杆菌感受态 DH5 α 内,利用 α 互补及菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取连接有目的片段的质粒,酶切鉴定正确送去测序。测序正确的重组质粒利用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,挑取单菌落活化,做菌液 PCR 鉴定。根癌农杆菌感受态制备及冻融法转化根癌农杆菌参照 Zhu 的方法^[13]。

1.2.7 大豆子叶节外植体的制备与转化 平安 8 号大豆种子消毒参照 Di 等^[14] 的氯气消毒法。灭菌后的大豆种子接种于萌发培养基中,在 25℃、16/8 h 的光周期下萌发 6 d,将大豆种子沿纵轴面切开,下胚轴留下 3 ~ 5 cm,去除种皮与真叶,在子叶节节点处用 15 号解剖刀进行 7 ~ 10 次划伤,得到子叶节外植体以备侵染。

挑取菌液 PCR 鉴定正确的农杆菌种活化,将制备好的大豆子叶节外植体在农杆菌菌液中真空辅助浸染 10 min。浸染后的外植体在无菌滤纸上吸取多余的菌液后置放在共培养基上,22℃ 黑暗条件下培养。共培养 5 d 后接种于筛选培养基中培养,每 15 d 继代 1 次,6 周后将其移置抽茎培养基中培养,待茎长至 3 cm 以上,移至生根培养基培养,记录抗性苗的数目。

2 结果与分析

2.1 扩增 *CHSK*, *CHIK* 基因

图 1A 为 *CHSK* 基因 PCR 产物的电泳图,其大小为 1 439 bp;图 1B 为 *CHIK* 基因 PCR 产物的电泳图,其大小为 735 bp;测序结果经过 NCBI 在线 Blast 比对分析,相似度均在 99% 以上。说明已成功克隆得到 *CHSK*, *CHIK* 基因。

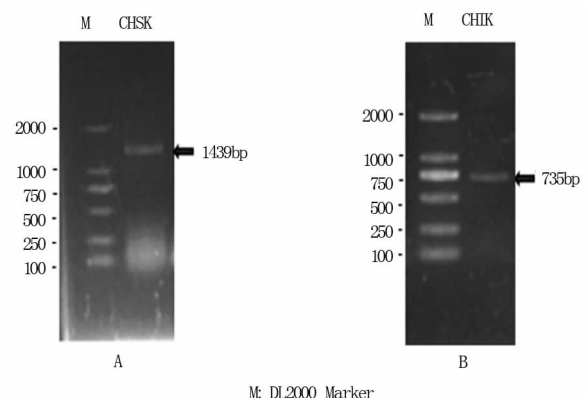


图 1 *CHSK* 和 *CHIK* 的 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *CHSK* and *CHIK*

2.2 SOE-PCR 扩增融合基因

图2A为 *CHSA* 和 *CHIA* 的 PCR 产物电泳图, *CHSA* 是 *CHS* 基因编码序列加上 2A 肽的前段, *CHIA* 则是 2A 肽的后段加上 *CHI* 基因编码序列,以二者作为模板,利用 SOE-PCR 扩增技术即可得到 1 905 bp 融合基因片段 *SAI* (图 2C)。同样, *CHS2* 表

明 *CHS* 基因编码序列加上 GS-rich 的 linker, *CHI2* 则是 linker 加上 *CHI* 基因的编码序列(图 2B),用这 2 个基因片段作模板进行 SOE-PCR,即可得到 1 857 bp 融合基因片段 *SI* (图 2D),对得到的 2 个融合基因进行测序,测序结果显示已成功获得了分别含有 *SAI*, *SI* 融合基因的 2 种载体。

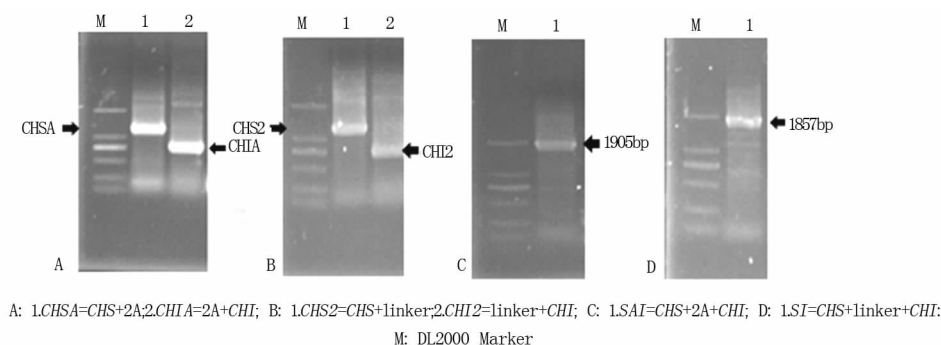


图2 融合基因的 SOE-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of SOE-PCR products of *SI* and *SAI*

2.3 原核表达载体的构建

采用由原核载体 pET-28a 改造而来的 p28 载体作为表达载体,其图谱如图 3 所示,抗性为卡那霉素,其大小为 5.4 kb。图 4 为以含有酶切位点 *Nde*I 和 *Xho*I 的引物,分别以含有目的基因 *CHS*、*CHI*、*SI* 和 *SAI* 的 pMD-18T 质粒为模板 PCR 得到的产物电泳图,这样就可以得到含有酶切位点的目的基因产物,其大小分别为 1 167、678、1 857 和 1 905 bp,以便和 p28 表达载体进行连接转化。图 5 为重组质粒

酶切鉴定结果,泳道 1,3,5,7 分别为没有进行双酶切的重组质粒 p28-*CHI*, p28-*CHS*, p28-*SI*, p28-*SAI*, 而泳道 2,4,6,8 则分别为 4 种重组质粒的双酶切鉴定,与对照相比,4 种重组质粒都切出了与目的基因大小相符的片段,证明原核表达载体构建成功。

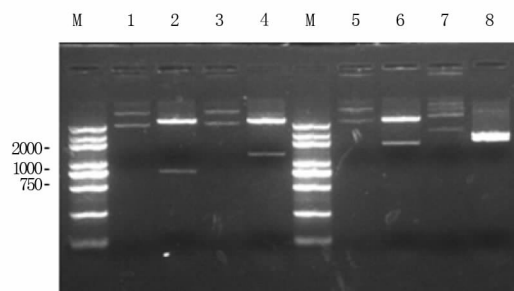


图5 p28 重组质粒酶切鉴定

Fig. 5 Electrophoresis of digested recombinant plasmid

2.4 原核表达分析

如图 6 所示,相比于没有诱导的对照,诱导菌体经过超声破碎后得到的上清中(沉淀中没有目的蛋白,电泳图没显示),可以明显的看到 *CHI* 蛋白的表达,分子量为 25.8 kD。而在诱导菌体破碎后的沉淀中(上清中没有目的蛋白,电泳图没显示),可以明显看到 *CHS* 蛋白的表达,分子量为 43.9 kD。目的条带大小与预期分子量相符,从而可以初步认定 *CHS* 和 *CHI* 在原核中获得表达。

如图 7 所示,1,4 分别为 *SI* 和 *SAI* 没有诱导的阴性对照,2,3 为 *SI* 诱导菌体破碎后得到上清和沉淀,5,6 为 *SAI* 诱导菌体破碎后得到的上清和沉淀,由图 7 可以看出,在 *SI* 预期分子量大小 70.1 kD 处, *SI* 蛋白在上清和沉淀中都有表达,同样,在 *SAI*

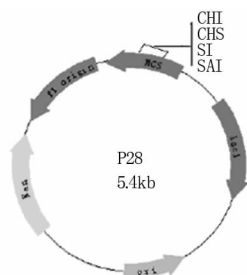


图3 表达载体 p28 图谱

Fig. 3 Map of expression vector p28

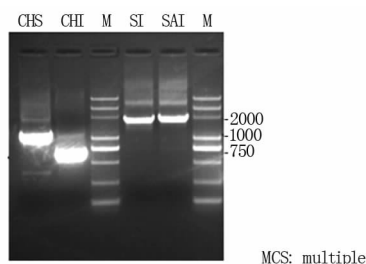


图4 四种基因片段的 PCR 产物

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products of *CHS*, *CHI*, *SI* and *SAI*

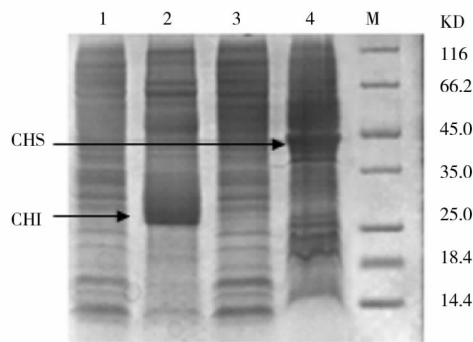


图6 CHI 和 CHS 诱导蛋白的表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of CHS and CHI induced protein

预期分子量大小 70.7 kD 处,SAI 蛋白在上清和沉淀中也均有表达。如箭头所示位置,目的条带大小与预期分子量基本相符,可以初步认为 *SI* 和 *SAI* 在原核中获得表达。

2.5 真核表达载体的构建

真核表达载体 pBI121 的 T-DNA 区段包含新霉

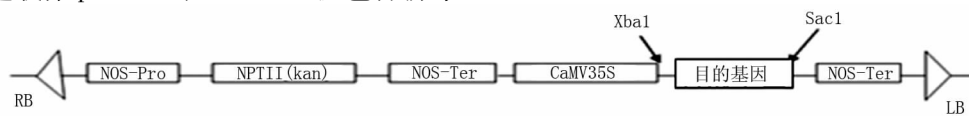


图8 pBI121 载体

Fig. 8 Map of expression vector pBI121

2.6 重组质粒导入根癌农杆菌

将测序正确的重组质粒利用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,挑取单菌落扩大培养,然后做菌液 PCR 鉴定。图 9A 为 *CHI* 基因的转化鉴定图,1,2,3,4 表示所挑取的 4 个单克隆,均扩增出与 *CHIK* 基因(735 bp)大小相符的目的片段;图 9B 为 *CHS* 基因的转化鉴定图,图中 1,2,3 表示所挑取的 3 个单克隆,均扩增出与 *CHSK* 基因(1 439 bp)大小相符的目的片段;C 图和 D 图分别表示 *SI* 基因和 *SAI* 基因的转化鉴定图,C 图中第 2 个克隆扩增出与 *SI* 基因(1 857 bp)大小相符的目的片段,D 图中第 4 和第 5 个克隆扩增出与 *SAI* 基因(1 905 bp)大小相符的目的片段,证明 4 种基因的重组质粒确已导入根癌农杆菌。

2.7 农杆菌转化大豆子叶节

采用农杆菌转化法侵染大豆子叶节,大豆种脐向下接种于萌发培养基中(图 10A),经过 6 d 的萌发培养,处理得到子叶节外植体,在农杆菌菌液中真空处理 10 min,接入共培养培养基中(图 10B),经过多次抗性筛选得到抗性重生芽(图 10C,10D),待重生芽抽茎长至 3 cm 时转入生根培养基中(图 10E),生根后移至经 121℃ 灭菌 20 min 的土壤中,已得到转基因抗性植株。

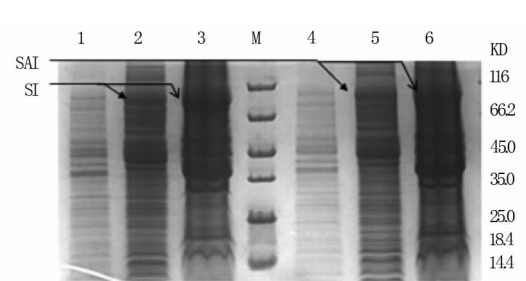


图7 SAI 和 SI 诱导蛋白的表达

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of SI and SAI induced protein

素磷酸转移酶(*NPTII*)基因,启动子为 CaMV35S,终止子 NOS 序列。目的基因插入位点在 *XbaI* 和 *SacI* 酶切位点之间(图 8)。用 *XbaI* 和 *SacI* 酶切 pBI121 重组质粒,鉴定正确后送华大公司测序,测序结果经过 NCBI 在线 Blast 比对分析,证明已成功构建了目的基因真核表达载体。

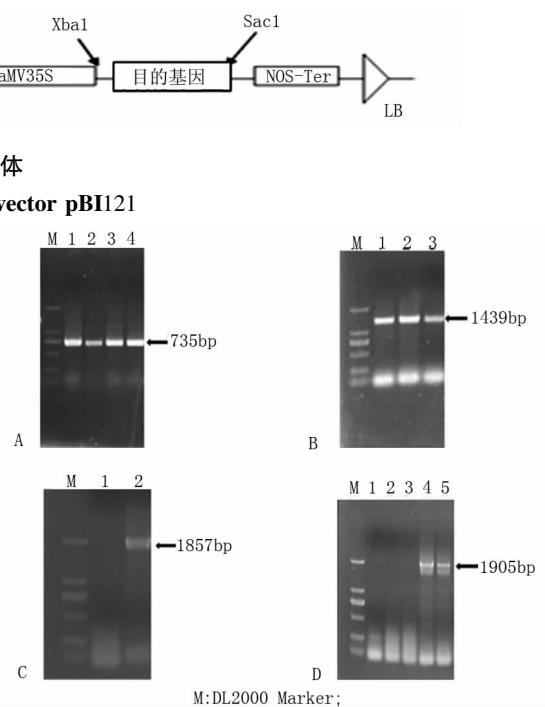


图9 农杆菌菌液 PCR 电泳

Fig. 9 Electrophoresis of PCR products of suspension of *Agrobacterium*

3 讨论

CHS,CHI 是异黄酮合成途径中的 2 个关键酶,它们在植物中的表达效率直接影响到异黄酮的含量。大豆中含有 9 个 *CHS* 基因家族的成员,从 *CHS1* 到 *CHS9*,其中 *CHS1* 有 2 个拷贝。虽然这个家族的成员在序列上有高度的相似性,但它们在植物发育过程中却发挥着不同的作用。在异黄酮合

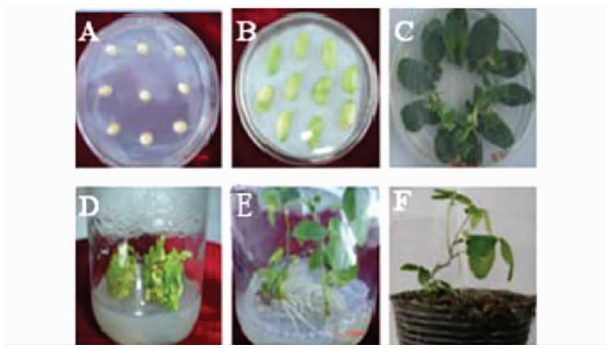


图 10 农杆菌转化大豆子叶节进程

Fig. 10 Process of transferred soybean cotyledonary nodes using *Agrobacterium*-mediated transformation

成代谢途径中主要涉及的是 *CHS7* 和 *CHS8*^[15]。*CHI* 主要有 2 种类型,其中 *CHI2* 仅存在于豆科植物中,可分别催化柚皮素查尔酮和异甘草素为柚皮素和甘草素,它与异黄酮的生物合成有一致性^[16]。所以该研究选择克隆 *CHS8* 和 *CHI2* 基因构建表达载体,期望提高大豆中异黄酮的含量。

该研究顺利的克隆了 *CHS8* 基因和 *CHI2* 基因,采用 SOE-PCR 的方法将二者构建成融合基因,并同时单基因和融合基因进行了原核表达载体和真核表达载体的构建,对 4 种蛋白都进行了初步的原核表达研究,结果表明 *CHS* 和 *CHI* 在大肠杆菌表达菌株 BL21 中都成功的获得了表达,而其二者的融合蛋白 SAI 和 SI 在大肠杆菌 C43 中同样获得了表达,结果表明 2A 连接肽对蛋白的表达没有影响,2A 肽在大肠杆菌中不存在自剪切现象。同时分别将 4 个植物表达载体转化根癌农杆菌 EHA105,通过菌落 PCR 验证,均已转化成功。采用农杆菌转化法侵染大豆子叶节,成功的获得了转基因抗性植株。

该研究在融合表达载体的构建过程中,采用了 SOE-PCR 法将 2 个单基因融合在一起,比传统的酶切连接相对省时方便,且无需考虑载体上的酶切位点是否相应。融合表达载体的构建能够高效、方便、快速的实现多基因转化。原核表达的研究对 *CHS* 和 *CHI* 2 种蛋白的功能研究以及生物合成奠定了基础。

另外,该研究初次在大豆转基因中尝试采用 2A 连接肽,与其它连接肽相比,它具有以下的优势:2A 来自口蹄疫病毒,为病毒的自我剪切,不需要任何蛋白酶的参与,并且 2A 的序列较短。2A 作为连接肽,可以同时连接 2 个或 2 个以上的基因,组成 1 个聚蛋白,在 2A 所连接的基因前加上信号肽,基因就可以到达各自的靶标位点^[11]。这些优势都预示着它在转基因植物研究中有广泛的应用前景。在使用 2A 肽作为连接肽的同时,使用 GGSS 氨基酸序列 linker 作为对照,以确定 2A 在大豆中和原核中是否进行剪切,在原核中初步确定使用 2A 肽做为连接肽构建融合表达载体并不影响其表达,2A 肽也不发生自剪切作用。该研究已经成功将 4 种载体转入农杆菌中,采用农杆菌介导法转化大豆子叶节,通过

抗性筛选做了初步的转化鉴定,这为 *CHS* 和 *CHI* 基因在大豆中的单独和融合表达研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘春龙,李忠秋,孙海霞,等. 大豆异黄酮的生理作用及其在医学方面的研究进展[J]. 大豆科学,2008,27(4):693-696. (Liu C L, Li Z Q, Sun H X, et al. Research progress and physiological function of soybean isoflavone on medicine[J]. Soybean Science, 2008,27(4):693-696.)
- [2] 夏循礼,杨广笑,何光源. 大豆异黄酮生物合成串联基因簇及其表达载体的构建[J]. 大豆科学 2009,28(1):7-10. (Xia X L, Yang G X, He G Y. Design of tandem genes cluster and expression vectors for soybean isoflavone biosynthesis[J]. Soybean Science, 2009,28(1):7-10.)
- [3] Shih C H, Chen Y, Wang M, et al. Accumulation of isoflavone genistin in transgenic tomato plants overexpressing a soybean isoflavone synthase gene[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008,56(14):5655-5661.
- [4] Zhang H C, Liu J M, Lu H Y, et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment[J]. Plant Cell Reports, 2009,28(8):1205-1213.
- [5] Cain C C, Saslowsky D E, Walker R A, et al. Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase proteins in *Arabidopsis* seedlings[J]. Plant Molecular Biology, 1997,35:377-381.
- [6] Li G L, Qiao Y K, Yang S H. Study of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005,31(2):170-176.
- [7] 李艳萍,郎志宏,李敏,等. 融合基因在转基因植物中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(5):137-141. (Li Y P, Lang Z H, Li M, et al. The application of polyprotein in transgenic plants[J]. China Biotechnology, 2007,27(5):137-141.)
- [8] Abdelhak E A, Barakate A, Barak M A. Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene[J]. Plant Physiology, 2004,135:16-24.
- [9] Felipe P D, Luke G A, Hues L E. Eunum pluribus; multiple proteins from a self-processing polyprotein[J]. Trends in Biotechnology, 2006,24(2):68-75.
- [10] Francois I E, Broekaert W F, Cammue B P. Different approaches for multitransgene-stacking in plants[J]. Plant Science, 2002,163:281-295.
- [11] 孙鹤. 多基因融合转化方法在转基因玉米中的研究[D]. 中国农业科学院,2009. (Sun H. The research of the multigene fusion transformation in transgenic maize[D]. The Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.)
- [12] Liu M, Yang J, Cheng Y Q, et al. Optimization of soybean (*Glycine max* L. Merrill) in planta ovary transformation using a linear minimal *GUS* gene cassette[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2009,10(12):870-876.
- [13] Zhu J H, Quan J L, He Y K, et al. Studies on the transformation of plasmid Prok II into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and C₅₈ C₁[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Nature Science Edition), 2006,34(7):91-95.
- [14] Di R, Purcell V, Collins G B. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Reports, 1996,15:746-750.
- [15] Yi J, Derynck M R, Chen L, et al. Differential expression of *CHS7* and *CHS8* genes in soybean[J]. Planta, 2010,231:741-753.
- [16] Mckenize K S, Rutger J N. Genetic analysis of amylase content, alkali spreading score and grain dimensions in rice[J]. Crop Science, 1983,23(2):306-313.