

## 向大豆导入琉璃苣 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的初步研究

宋丽雅, 盖燕, 何聪芬

(北京工商大学 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

**摘要:** 采用 RT-PCR 法扩增出中国境内生长的琉璃苣  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因, 序列分析表明, 该基因全长为 1 359 个核苷酸, 与美国德克萨斯州的琉璃苣  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因同源性可达到 99%。将克隆到的基因连接 pRTL2 质粒的 35S 启动子, 构建重组载体 pPTN-D6D, 并通过农杆菌介导的子叶节转化系统, 将该基因导入到垦农 18 和小粒豆 2 个大豆品种中。经 PCR 检测分析, 初步证明琉璃苣  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因已导入并整合到大豆基因组中。

**关键词:**  $\gamma$ -亚麻酸; 大豆;  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因; 农杆菌介导

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2012)02-0173-05

## A Preliminary Study on Transferring $\Delta 6$ -Fatty Acid Desaturase Gene from *Borago officinalis* into Soybean

SONG Li-ya, GE Yan, HE Cong-fen

(Beijing Technology and Business University, Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048, China)

**Abstract:**  $\gamma$ -linolenic acid is an essential polyunsaturated fatty acid in human metabolism.  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase (D6D) is the key enzyme that can convert linoleic acid into  $\gamma$ -linolenic acid *in vivo*. In this study, the  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene from *Borago officinalis* was amplified by RT-PCR. Sequence analysis showed that the full cDNA contained 1 359 nucleotides. The homology of *Borago officinalis* D6D gene in China and that registered in Texas USA was 99%. Recombinant vector pPTN-D6D was constructed that containing the  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene from *Borago officinalis* and 35S promoter from plasmid pRTL2. The gene was transferred into two soybean cultivars, Xiaolidou and Kennong18, with *Agrobacterium* mediated cotyledon node transformation system. The results of PCR indicated that the D6D gene had been introduced and integrated into soybean genome which laid a foundation for soybean quality improvement.

**Key words:**  $\gamma$ -linolenic acid; Soybean;  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene; *Agrobacterium* mediated

亚麻酸是人体不能缺少、自身又不能合成的必需脂肪酸, 人体一旦缺乏, 其免疫、心脑血管、生殖内分泌等系统就会出现异常。 $\gamma$ -亚麻酸 (Gamma linolenic acid, GLA) 是一种多不饱和脂肪酸, 分子式为  $C_{18}H_{30}O_2$ , 化学名称为 6, 9, 12-十八碳三烯酸。近年来的研究发现, GLA 具有降血脂、降血压、抗炎消炎, 抗肿瘤, 抗菌作用以及防治过敏性皮炎等功能, 用于化妆品能改善皮肤的干燥现象, 产生润滑舒适的作用<sup>[1-4]</sup>。GLA 主要存在于植物和微生物中, 集中分布于柳叶菜科 (*Onagraceae*) 和紫草科 (*Boraginaceae*) 的植物中, 如月见草、琉璃苣等。琉璃苣 (*Borago officinalis*) 是紫草科琉璃苣属草本植物, 其种子油中含有大量  $\gamma$ -亚麻酸。

$\gamma$ -亚麻酸在生物体内经由亚油酸形成, 其代谢途径中的关键酶为  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶 ( $\Delta 6$ -fatty acid desaturase, D6D), 该酶可以在不饱和脂肪酸的第 6 位和第 7 位碳原子脱氢引入双键。D6D 属于膜结合酶, 一般存在于植物叶绿体膜、类囊体膜和

内质网上, 它以 NADH: 细胞色素 b5 (Cytb5) 还原酶和 Cytb5 作为电子供体催化复合脂中的脂肪酸脱氢<sup>[3-5]</sup>, 具有 3 个保守的组氨酸富集区和 2 个疏水区。目前, 研究人员已经从蓝细菌、霉菌以及一些动植物中克隆到了 D6D 基因<sup>[6-7]</sup>, 并将该基因转至烟草、油菜、大豆等植物中, 用以提高植物中  $\gamma$ -亚麻酸含量<sup>[8-10]</sup>, 但是将琉璃苣中的 D6D 基因转入大豆中的研究还未见报道。

大豆中含有丰富的蛋白质和多种维生素, 已经逐渐开发成为各种功能性食品。大豆中亚油酸含量可以占到大豆脂肪酸总量的 50% 左右, 而亚麻酸含量却很低<sup>[11-13]</sup>。因而该研究利用 RT-PCR 方法由琉璃苣中扩增出  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因, 采用农杆菌介导的转化方法, 将该基因转入到小粒豆和垦农 18 大豆中, 以期培育出富含  $\gamma$ -亚麻酸的转基因大豆, 从而改善大豆脂肪酸组成。为大豆品质的改良和脂肪酸脱氢酶调控机制等方面的研究奠定基础。

收稿日期: 2011-12-02

基金项目: 北京市教委科技发展计划项目 (KM2009011008); 北京市自然科学基金项目 (6112003)。

第一作者简介: 宋丽雅 (1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为酶工程。E-mail: songly@th.btbu.edu.cn。

通讯作者: 何聪芬 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: hecf@th.btbu.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 琉璃苣由中国科学院北京植物所提供,大豆品种绥农 27、绥农 24、蒙豆 30、中豆 32、小粒豆、黑农 37 和垦农 18,由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.1.2 菌种和质粒 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105,质粒 pRTL2,质粒 pPTN-200 由中国农业科学院作物科学研究所叶兴国先生馈赠。

1.1.3 试剂 反转录试剂盒和 pGEM-T Easy Vector System 为 Promega 公司产品;ExTaq 酶、T4 DNA 连接酶、DNA 酶、RNA 酶 H、RNA 酶 A、各种限制性内切酶、DNA 分子标准、X-gal、IPTG 为 TaKaRa 公司产品;DNA 回收试剂盒,DNA 产物纯化试剂盒等购自北京天根生物技术有限公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆与测序 提取琉璃苣总 RNA,根据 Genebank 中已经公布的 *D6D* 基因序列设计合成引物,进行 RT-PCR 扩增,将 PCR 产物回收连接在 pGEM-TEasy Vector 形成质粒 pGD6D,进行测序工作,确定最终成功克隆到目的基因 *D6D*。引物序列是 5'-CATTTTTCATCAATG-GCTGCTC-3' 和 5'-TTAACCATGAGTGTGAAGAGCT-TCC-3'。反应条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min。共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

1.2.2 植物表达载体的构建 把质粒 pGD6D 上的 *D6D* 片段克隆进含有 35S 启动子的质粒 pRTL2 中,形成含有目的基因的表达式载体 pRT-D6D,把质粒 pRT-D6D 上的含有启动子和目的基因的片段克隆进含有 T-DNA 的质粒 pPTN-200 中,形成共转化表达式载体 pPTN-D6D;利用三亲杂交、热激、电击的方法将共转化表达式载体 pPTN-D6D 转入到根癌农杆菌 EHA105 中,构建转化大豆的工程菌。

1.2.3 农杆菌的培养及制备 挑取经 PCR 验证的阳性克隆放入 5 mL 抗性 LB (50 mg·L<sup>-1</sup> Kna + 40 mg·L<sup>-1</sup> Str + 40 mg·mL<sup>-1</sup>) 的液体培养基中,28℃,200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养。1:20 稀释菌液,28℃,200 r·min<sup>-1</sup> 培养 4~6 h,至 OD<sub>600</sub> 在 0.5 左右。4 000 r·min<sup>-1</sup>,5 min,4℃ 离心收集菌体。用不含激素的液体 MSB 培养基重悬沉淀,加入 AS (0.1 mmol·L<sup>-1</sup>),调节 MSB 的量,使 OD<sub>600</sub> 在 0.5 左右。所得菌液用于侵染。

1.2.4 外植体获得 挑取无病斑,种皮完好的大

豆种子,灭菌后,置于发芽培养基<sup>[14]</sup>中,培养 5 d,然后放 4℃ 冰箱 1 d。筛选表型上为绿色健壮的幼苗。用手术刀做切口。切口长度为 3~4 mm 时,接种。

1.2.5 大豆基因型的筛选 将试验所用的 7 个基因型的大豆子叶节接种于诱导培养基<sup>[14]</sup>,待子叶节长出 0.3~1.0 cm 长的不定芽时,统计形成愈伤和不定芽的数量。将不定芽切下转入生长培养基<sup>[14]</sup>中,待不定芽抽出小苗长至 2~3 cm 高时,转入生根培养基<sup>[14]</sup>中生根,计算丛生芽诱导率和平均丛生芽数,筛选出再生频率较高的大豆基因型。

丛生芽诱导率(%) = 出芽外植体数/外植体总数 × 100

平均丛生芽数(%) = 丛生芽数/出芽外植体数 × 100

1.2.6 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化 将农杆菌菌液和外植体侵染后,共培养 3 d,于诱导丛生芽培养基<sup>[14]</sup>上培养 4 周,转入芽伸长培养基<sup>[14]</sup>培养 12 周后,于生根培养基中生根 4 周,移栽至装有硅石和土壤混合物的塑料桶中培养。

1.2.7 抑菌抗生素浓度的确定 每平皿 5 个外植体分别接种于含有 0、250、500、750 和 1 000 mg·L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠的丛生芽分化培养基上,培养 15 d。3 次重复。计算丛生芽诱导率,并观察芽状态与菌污染情况。

1.2.8 转基因大豆的分子生物学检测 取头孢噻肟钠筛选过的抗性愈伤和再生植株,用 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取基因组 DNA,PCR 扩增 *D6D* 基因。引物序列为 (5'-3') 35S: GACGCACAATCCCCTATCCTTC 和 35T: CACATGAGCGAAACCCTATAGGAAC。反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min。

## 2 结果与分析

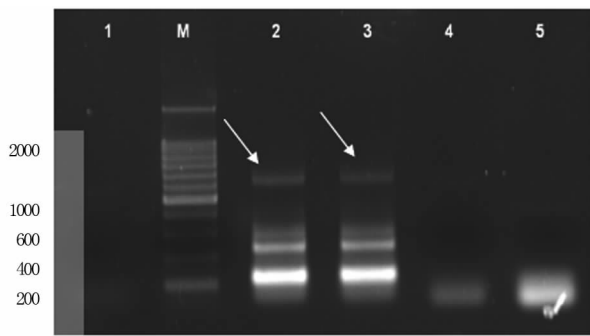
### 2.1 琉璃苣 *D6D* 基因的克隆

从琉璃苣提取总 RNA 后,经 RT-PCR 扩增,电泳检测可见到约 1 400 bp 的电泳带,与预期条带大小一致(图 1)。

所测序列在 Genebank 中采用 BLAST 程序进行序列同源性分析,结果表明该序列与报道的从美国德克萨斯州琉璃苣中克隆的 *D6D* 基因序列同源率为 99%,证明所克隆的正是目的基因 *D6D*,全长 1 359 bp,编码 452 个氨基酸。含有起始密码子和终止密码子,克隆到了基因全长。

### 2.2 共转化载体构建

将琉璃苣 *D6D* 基因与载体 pRTL2 以 *Noc* I、*Xba* I 分别进行双酶切,将酶切产物连接构建重组



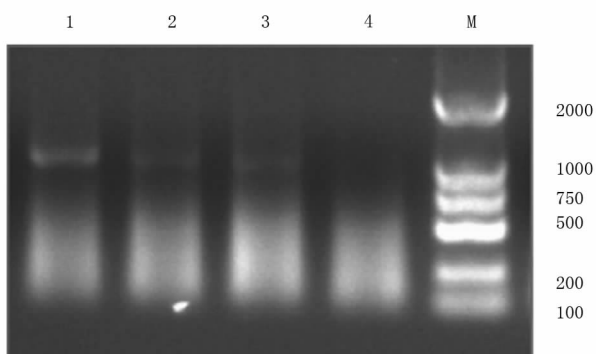
M:2000 bp DNA ladder; 1:阴性对照; 2,3:PCR 产物; 4,5:单引物对照

M:2000 bp DNA ladder; 1:Negative control; 2,3:PCR product; 4,5:Single primer control

图 1 琉璃苣 *D6D* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *D6D* gene

载体 pRT-D6D,将 pRT-D6D 与 pPTN-200 载体分别进行 *Pst* I 酶切,将切下的带有启动子的 *D6D* 基因与载体 pPTN-200 连接,构建共转化载体 pPTN-D6D。pPTN-D6D 的 PCR 鉴定结果如图 2 所示,待鉴定质粒 pPTN-D6D 目的片段的扩增在 1 400 bp 附近出现条带,与质粒 pGD6D 扩增结果相同,说明 pPTN-D6D 含有目的片段,表达载体 pPTN-D6D 已构建成功。重组质粒 pPTN-D6D 酶切鉴定结果如图 3 所示,以限制性内切酶 *Pst* I 进行酶切,酶切后出现 2 条带,其中一条带与目的基因大小一致,说明  $\Delta 6$  脂肪酸脱氢酶基因共转化表达载体 pPTN-D6D 构建成功。将该质粒进行 DNA 序列测定。测序结果表明连接正确,序列与克隆载体上目的基因的序列完全一致。



M:Marker DL2000; 1:以质粒 pGD6D 为模板的 PCR 产物; 2,3:以表达载体 pPTN-D6D 为模板的 PCR 产物

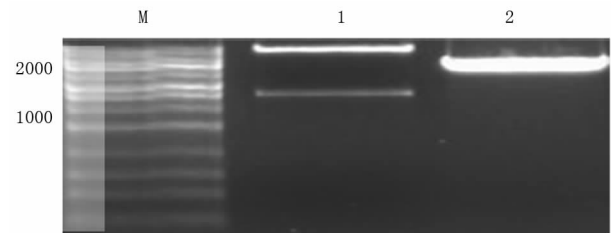
M:Marker DL2000; 1:PCR product of recombinant plasmid pGD6D; 2,3:PCR product of recombinant plasmid pPTN-D6D

图 2 pPTN-D6D 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of pPTN-D6D by PCR amplification

利用三亲杂交法将表达载体导入农杆菌 EHA105,进行特异引物的 PCR 扩增,体系与基因克隆相同,结果如图 4 所示,泳道 1、2、3、4 均为阳性结果。从图中可知待鉴定的农杆菌 Mini-Ti 质粒目的

片段的扩增结果与表达载体 pPTN-D6D 目的片段的扩增结果一致,均在 1 400 bp 左右同一位置出现一条明亮条带。这说明共转化表达载体 pPTN-D6D 已经导入农杆菌 EHA105 (Rif<sup>r</sup>)。将阳性菌液进行测序,测序结果与预期一致,证明共转化表达载体 pPTN-D6D 已导入农杆菌 EHA105 (Rif<sup>r</sup>) 中。

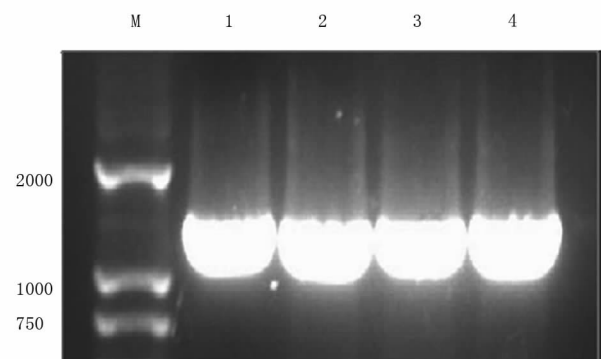


M:1000 bp DNA ladder; 1:表达载体 pPTN-D6D *Pst* I 酶切结果; 2:质粒 pPTN-20

M:1000 bp DNA ladder; 1:pPTN-D6D digested by *Pst* I; 2:pPTN-D6D-20 plasmid

图 3 表达载体 pPTN-D6D 的 *Pst* I 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pPTN-D6D digested by *Pst* I



M:2000 bp DNA Ladder; 1~4:阳性结果

M:Marker DL2000; 1-4:PCR product of recombinant *Agrobacterium*

图 4 农杆菌的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant

*Agrobacterium* by PCR amplification

### 2.3 不同大豆品种子叶节丛生芽诱导率的比较

农杆菌介导的大豆转化系统具有较高的基因型依赖性,不同的农杆菌菌株对不同大豆品系的感染能力相差悬殊,所以筛选合适的大豆基因型是成功进行基因转化的前提。供试的 7 个大豆品种均能从子叶节诱导出丛生芽,但是不同品种的差异很大,通过计算丛生芽诱导率和平均丛生芽数可以筛选出用于转化的大豆基因型。由表 1 看出,小粒豆和垦农 18 的丛生芽诱导率最高,平均丛生芽数最多,且丛生芽生长的比较健壮。

### 2.4 抑菌抗生素浓度的确定

由于一定浓度的头孢霉素会对叶片的生长以及分化造成伤害,因而添加的抗生素浓度既要能有效的抑制农杆菌的生长,又要尽可能降低对外植体造成的伤害。表 2 为头孢噻肟钠 (Cef) 对大豆子叶

节不定芽分化的影响。试验结果表明,大豆子叶节对头孢噻肟钠具有一定抗性,筛选培养时加入  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的头孢噻肟钠不会影响子叶节分化,并且还能够抑制农杆菌的生长。由此确定  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为头孢噻肟钠的杀菌浓度。

表1 不同大豆品种丛生芽的诱导率

Table 1 Induction rate of shoots from different soybean cultivar

基因型 Genotype	外植体 Total explants	出芽 Total bud explants	丛生芽 诱导率 of shoots/%	丛生芽数 Total shoots	平均丛生芽数 Average number of shoots
绥农 27 Suinong 27	400	278	69.50	484	1.74
绥农 24 Suinong 24	400	302	75.50	462	1.53
蒙豆 30 Mengdou 30	400	223	55.75	317	1.42
中豆 32 Zhongdou 32	400	265	66.25	493	1.86
小粒豆 Xiaolidou	400	347	86.75	857	2.47
黑农 37 Heinong 37	400	311	77.75	594	1.91
垦农 18 Kennong 18	400	353	88.25	755	2.14

表2 头孢噻肟钠 (Cef) 对大豆子叶节不定芽分化的影响

Table 2 Influence of Cef on shoots differentiation of soybean cotyledon node

基因型 Genotype	Cef 浓度 Cef concentration $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	丛生芽诱导率 Shoots induction rate /%	不定芽黄化率 Shoots etiolation rate /%	菌污染情况 Pollution condition of
小粒豆 Xiaolidou	0	81.33	0	++++
	250	79.46	0	++
	500	76.00	0	-
	750	73.52	1	-
	1000	70.97	25	-
垦农 18 Kennong 18	0	78.84	0	++++
	250	77.69	0	++
	500	75.37	0	-
	750	74.61	1	-
	1000	71.22	29	-

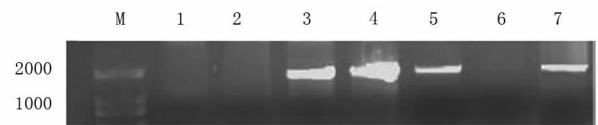
“++++”菌污染严重;“++”菌污染较轻;“-”无菌出现。

“++++” Serious pollution; “++” Slight pollution; “-” No pollution.

## 2.5 转基因大豆的分子生物学检测分析

将筛选出的 10 株抗性植株,以 CTAB 法提取基因组 DNA,利用 D6D 特异性引物进行 PCR 扩增,结果表明,4 株大豆抗性再生植株能扩增出大小为

1 400 bp 左右特异条带,说明目的基因 *D6D* 已转入并整合进此 4 株大豆转化再生植株的基因组中(图 5)。该结果与大豆转化抗性再生植株除草剂 Glufosinate 抗性检测结果一致。



M:Marker DL2000; 1: 阴性对照 (未转入外源基因的大豆); 2~7:抗性植株

M:Marker DL2000; 1:Negative control; 2-7:Resistant soybean

图5 大豆抗性植株的 PCR 检测

Fig.5 PCR identification of resistant soybean

## 3 讨论

近年来许多编码脂肪酸合成过程中的关键酶的基因得以分离和克隆,并在油菜、大豆等油料作物中得到表达,带动植物脂肪酸调控基因工程的发展。其中  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因催化亚油酸脱氢产生亚麻酸,是生物体内多不饱和脂肪酸亚麻酸形成的关键步骤,从而成为研究的热点之一。1993 年,Reddy 等<sup>[16]</sup>首次克隆到  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因,并进行了表达。随后,科研人员通过 cDNA 文库、cDNA 末端扩增等技术陆续将该基因从动物、植物和微生物中扩增出来<sup>[17]</sup>,一些研究者将不同来源的  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因转入微生物和植物中进行了表达研究,如王德培等<sup>[18]</sup>将雅致枝霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中进行表达,王广科等<sup>[8]</sup>将高山被孢霉的  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶转入了大豆中进行研究,张琦等<sup>[9]</sup>将少根根霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在转基因油菜中进行表达,并证明油菜中确有  $\gamma$ -亚麻酸生成。但到目前为止,将琉璃苣  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因转入大豆中的研究还未见报道,因而该研究将中国琉璃苣  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因转入大豆中,以期提高大豆中的亚麻酸含量,改善大豆脂肪酸的组成,提高其品质。

农杆菌介导法是大豆遗传转化中的常用方法,该方法简单易行,但转化效率不高。近年来的研究表明,不同基因型大豆对不同农杆菌的敏感性不同<sup>[19]</sup>,王罡等<sup>[20]</sup>以栽培大豆吉林 30、吉林 43、绥农 8、黑农 35 和东农 42 等的下胚轴为外植体,用 EHA105 和 LBA4404 2 个根癌农杆菌菌株研究大豆基因型对根癌农杆菌的敏感性,发现大豆基因型对根癌农杆菌的敏感性存在显著差异。因而该研究选取了 7 个不同的大豆品种进行丛生芽诱导,旨在筛选出对农杆菌 EHA105 敏感性较高的大豆品种,提高最终的转化率。结果表明,不同品种的大豆丛

生芽诱导率相差较大,最低的是蒙豆 30,诱导率为 55.75%,最高的是垦农 18,诱导率达到了 88.25%,其次为小粒豆,诱导率为 86.75%。所以选取诱导率高的垦农 18 和小粒豆进行下一步试验。

抗生素浓度对于农杆菌介导的大豆的转化非常重要,直接影响到大豆遗传转化的质量。抗生素浓度过高时,虽然可以严格控制菌污染情况,但是对大豆叶片的生长以及分化有毒害作用;抗生素浓度过低时,农杆菌生长旺盛,导致菌污染严重,影响子叶节丛生芽生长。所以需要选择合适的浓度,既可控制菌污染,又不会影响子叶节丛生芽<sup>[21]</sup>。该研究选取了不同浓度的抗生素头孢噻肟钠进行试验,发现抗生素浓度在 0 和 250 mg·L<sup>-1</sup>时,均会出现菌污染现象,而浓度达到 750 mg·L<sup>-1</sup>时就会影响芽生长,因而选取 500 mg·L<sup>-1</sup>的浓度进行后续试验。

## 参考文献

- [1] 卜云萍,王光风,陈竺.转基因高  $\gamma$ -亚麻酸大豆油抗肿瘤作用的研究[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(7):92-97. (Bu Y P, Wang G F, Chen Z. Antitumor of the transgenic soybean oil[J]. China Biotechnology, 2005, 25(7):92-97.)
- [2] Murphy D J. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops[J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(6):206-213.
- [3] Ohlrogge J B. Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism[J]. Plant Physiology, 1994, 104:821-826.
- [4] Giamarellos-Bourboulis E J, Grecka P, Dionysiou-Asteriou A, et al. In vitro influence of polyunsaturated fatty acids on nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*: a preliminary report[J]. Int Antimicrob Agents, 1995, 6(1):47-50.
- [5] 武小霞,李文滨,张淑珍.我国大豆转基因研究进展[J]. 大豆科学,2005,24(2):145-149. (Wu X X, Li W B, Zhang S Z. The research advance on soybean transgene in China[J]. Soybean Science, 2005, 24(2):145-149.)
- [6] 白义春,康相涛,孙桂荣,等.  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶研究进展[J]. 河南农业科学,2008(2):4-12. (Bai Y C, Kang X T, Sun G R, et al. Advance in  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase research[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2008(2):4-12.)
- [7] Khang N T, Jennen D G, Tholen E, et al. Association of the *FADS2* gene with omega-6 and omega-3 PUFA concentration in the egg yolk of Japanese quail[J]. Animal Biotechnology, 2007, 18(3):189-201.
- [8] 王广科,李明春,李晋川,等.高山被孢霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因转化大豆的研究[J]. 成都医学院学报,2010,5(2):93-96. (Wang G K, Li M C, Li J C, et al. The study on transformation of  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase genes from *Mortierella alpina* into soybean[J]. Journal of Chengdu Medical College, 2010, 5(2):93-96.)
- [9] 张琦,李明春,蔡易,等.少根根霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在转基因油菜中的表达[J]. 中国农业科学,2006,39(3):463-469. (Zhang Q, Li M C, Cai Y, et al. Expression of *Rhizopus arrhizus*  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene in transgenic rapeseed[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(3):463-469.)
- [10] 李明春,刘莉,胡国武,等.深黄被孢霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在转基因烟草中的表达[J]. 生物工程学报,2003,19(2):178-184. (Li C M, Liu L, Hu G W, et al. Expression of *Mortierella isabellina*  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene in  $\gamma$ -linolenic acid production in transgenic tobacco[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(2):178-184.)
- [11] 苗兴芬,徐文平,李灿东,等.东北地区大豆品种脂肪酸组成与含量分析[J]. 大豆科学,2011,30(1):529-531. (Miao X F, Xu W P, Li C D, et al. Analysis of the fatty acid composition of soybean varieties in northeast China[J]. Soybean Science, 2011, 30(1):529-531.)
- [12] 李文滨,郑宇宏,韩英鹏.大豆种质资源脂肪酸组分含量及品质性状的相关性分析[J]. 大豆科学,2008,27(5):740-745. (Li W B, Zheng Y H, Han Y P. Analysis of fatty acid composition and other quality traits in soybean varieties developed in Heilongjiang province[J]. Soybean Science, 2008, 27(5):740-745.)
- [13] Messina M, Messina V L, Chan P. Soyfoods, hyperuricemia and gout: a review of the epidemiologic and clinical data[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2011, 20(3):347-358.
- [14] 徐香玲,邹联沛.向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学,1999,18(2):101-108. (Xu X L, Zou L P. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybeans. [J]. Soybean Science, 1999, 18(2):101-108.)
- [15] 陈向明.用 CTAB 法提取植物 DNA 的技术改进[J]. 合肥教育学院学报,2000,17(4):14-16. (Chen X M. The technology improvement of extracting DNA from plants by CTAB[J]. Journal of Hefei Institute of Education, 2000, 17(4):14-16.)
- [16] Reddy A S, Nuccio M L, Ross L M, et al. Isolation of a  $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(2):293-300.
- [17] 刘睿杰.应用 RACE 技术克隆月见草  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因 cDNA[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2007:1-35. (Liu R J. Cloning of  $\Delta 6$  fatty acid desaturase gene cDNA from *Oenothera biennis* using technology of race [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2007:1-35.)
- [18] 王德培,李明春,魏东盛,等.雅致枝霉  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报,2006,46(1):74-79. (Wang D P, Li M C, Wei D S, et al. Cloning and expression of  $\Delta 6$ -desaturase gene from *Thamnidium elegans* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(1):74-79.)
- [19] Mauro A O, Pfeiffer T W, Collies G B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation[J]. Crop Science, 1995, 35:1152-1156.
- [20] 王罡,王萍,蔺宇,等.大豆基因型对根瘤农杆菌菌株敏感性的研究[J]. 遗传,2002,24(3):297-300. (Wang G, Wang P, Lin Y, et al. The studies of sensitivity of genotypes in soybean to lines of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Hereditas, 2002, 24(3):297-300.)
- [21] 张书利,刘丽君,唐晓飞,等.利用农杆菌介导法将 *BrCS* 基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学,2011,30(4):569-573. (Zhang S L, Liu L J, Tang X F, et al. Transformation of *BrCS* gene into soybean by *Agrobacterium*-mediated method[J]. Soybean Science, 2011, 30(4):569-573.)