

## 利用 RNA 干扰技术提高大豆脂肪含量

陈子奇, 李 夏, 王丕武, 付永平, 李鲁华, 马 建, 曲 静

(吉林农业大学 生物技术中心, 吉林 长春 130118)

**摘要:** 利用冻融法将大豆 11S 球蛋白 *GY1* 基因 RNA 干扰表达载体转入农杆菌 EH105 中, 以大豆“吉农 28”为受体, 通过农杆菌介导的大豆子叶节转化法导入大豆, 获得  $T_1$  代转基因苗 12 株, 并对得到的转基因植株进行分子生物学鉴定。PCR 和 Southern 杂交检测表明, RNAi 植物表达载体 p3301-Gy1 已成功插入到转基因大豆植株的基因组 DNA 中; RT-PCR 和 SDS-PAGE 检测结果表明 RNA 干扰在转录后水平发挥了作用, 11S 球蛋白表达含量降低; 利用 BUCHI N-500 型近红外光谱分析仪对转化的大豆蛋白质和脂肪含量进行检测, 结果转化植株的籽粒蛋白质含量 (36.07%) 平均降低 1.43 个百分点, 脂肪含量 (21.28%) 平均提高 0.76 个百分点。因此, 利用 RNA 干扰技术提高大豆脂肪含量是可行的。

**关键词:** 大豆; *GY1* 基因; RNA 干扰; 遗传转化

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2012)04-0529-05

## Using RNA Interference Technology to Improve Soybean Fat Content

CHEN Zi-qi, LI Xia, WANG Pi-wu, FU Yong-ping, LI Lu-hua, MA Jian, QU Jing

(Biotechnology Center, Jilin Agricultural University, Changchun 130018, Jilin, China)

**Abstract:** Protein was negatively correlated with fat content in soybean. We aimed to improve fat content by reducing protein content through RNA interference in this research. The RNA interference expression vector-p3301-GY1 of 11S globulin *GY1* gene was transformed into cotyledon nodes of soybean Jinong 28 by *Agrobacterium*-mediated method. We got 12 positive transgenic plants in  $T_1$  generation by PCR detection. Southern blot confirmed the RNAi expression vector of *GY1* gene had been expressed in soybean genome. RT-PCR and SDS-PAGE further indicated the expression level of *GY1* gene were decreased. Seed detection showed the protein content of transformed plants decreased from 37.50% to 36.07%, and fat content increased from 20.52% to 21.28%. Results suggest it is possible to improve fat content of soybean through RNA interference technology.

**Key words:** Soybean; *GY1* gene; RNAi; Genetic transformation

大豆蛋白质中主要成分为贮藏蛋白, 大豆贮藏蛋白中 11S 大豆球蛋白 (glycinin) 和 7S  $\beta$ -伴大豆球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin) 占总蛋白的 70% 左右<sup>[1]</sup>。大豆基因组中存在多个大豆球蛋白基因及大豆球蛋白相关基因, 并且它们之间具有很高的同源性<sup>[2]</sup>。大豆 11S 球蛋白由多基因家族编码, 其中 7 个球蛋白基因 *GY1* ~ *GY7* 已经被克隆和测序。大豆 11S 球蛋白是六聚体复合物<sup>[3-4]</sup>, 由 5 个亚基 (A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 和 A5A4B3) 组成, 每个亚基由一条酸性肽 (简称 A, 包括 A1a, A1b, A2, A3, A4 和 A5) 和一条碱性肽 (简称 B, 包括 B1a, B1b, B2, B3 和 B4) 通过一个二硫键连接的<sup>[5]</sup>。

目前全国食用大豆年消费量在 800 万 t 以上<sup>[6]</sup>, 大豆油消费量超过 900 万 t, 占植物油总消费量的 40% 以上<sup>[7]</sup>。大豆脂肪中含有 1.8% ~ 3.2% 的磷脂, 能降低血液中胆固醇含量和血液粘度, 促

进脂肪吸收, 有助于防止脂肪肝和控制体重, 并且有溶解老年斑、促进腺体分泌等多种功能。大豆甾醇是一种微量活性成份, 含量约为大豆油的 0.1% ~ 0.8%。大量流行病学资料和实验室研究表明, 大豆甾醇可有效地降低多种慢性病的发病率, 如高血压、冠心病等心血管疾病<sup>[8]</sup>。因此, 如何能有效的提高大豆脂肪含量, 是大豆育种的主要研究方向之一。但是, 仅仅通过常规育种技术来提高大豆油产量的方法是十分局限的, 随着近几年分子生物学和基因工程学的快速发展, 特别是 RNA 干扰技术的广泛应用, 为利用基因工程手段来改良大豆脂肪含量和组分提供了新的思路。本研究构建 *GY1* 基因 RNAi 植物表达载体, 通过 RNA 干扰机制抑制大豆 11S 球蛋白 *GY1* 基因的表达, 以期降低大豆贮藏蛋白的含量, 进而提高大豆脂肪含量, 探讨大豆脂肪改良的可能途径。

收稿日期: 2012-03-02

第一作者简介: 陈子奇 (1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail: imchenziqi@yahoo.cn。

通讯作者: 王丕武 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种吉农 28,由吉林农业大学生物技术实验室中心提供。

1.1.2 菌种和质粒 菌种为大肠杆菌种 *E. coli* DHS5 $\alpha$ ,质粒 pCAMBIA3301,大豆 11S 贮藏蛋白 GY1 基因 RNA 干扰表达载体 p7 $\alpha$ P-Gy1 由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、RNase、溶菌酶、DNAMarker DL-2000 分子量标准购自 TaKaRa 公司,电泳回收试剂盒购自北京鼎国生物公司,其他试剂均为国产分析纯产品。

1.1.4 培养基 大肠杆菌培养:LB 培养基;农杆菌培养:YEP 培养基;大豆遗传转化:1/10B5 萌发培养基、MB 预培养培养基、MB 共培养培养基、MB 筛选培养基、MB 伸长培养基、MB 生根培养基(遗传转化的培养基中,M 为 MS 大量母液和 MS 微量母液;B 为 B5 有机母液)。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆 11S 贮藏蛋白 GY1 基因 RNA 干扰表达载体的改造 原植物表达载体 p7 $\alpha$ P-Gy1 是利用潮霉素基因作为筛选标记,该实验利用 pCAMBIA3301 植物表达载体上含有 *Bar* 基因的特点,将原植物表达载体 p7 $\alpha$ P-Gy1 改造成利用 *Bar* 基因作为筛选标记的植物表达载体。实验选取了原重组植物表达载体 p7 $\alpha$ P-Gy1 和 pCAMBIA3301 植物表达载体上共有的酶切位点 *EcoRI* 和 *BstEII*,并且在原植物表达载体 p7 $\alpha$ P-Gy1 中,这 2 个酶切位点之间包含了完整的 RNA 干扰表达载体构成所需的功能性原件(种子特异性启动子 + GY1 基因反义片段 + 功能性间隔序列 GFP + GY1 基因正义片段)。将原重组植物表达载体和 pCAMBIA3301 植物表达载体同时进行双酶切反应。反应体系为:10  $\times$  Tango: 2  $\mu$ L;*EcoRI*:1  $\mu$ L;*BstEII*:1  $\mu$ L;模板:5  $\mu$ L;ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C 反应 1h。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外成像仪下分别切下大载体片段和目的片段,回收纯化后以 3:1 的比例进行连接反应,构建成新的以 *Bar* 基因为筛选标记的植物表达载体 p3301-GY1。

#### 1.2.2 农杆菌介导的大豆遗传转化

农杆菌工程菌液的制备:

采用冻融法将 RNAi 植物表达载体 p3301-GY1

的质粒 DNA 转入根癌农杆菌感受态 EHA105 中,然后将农杆菌单菌落分别接种于含有 100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Kan 的 5 mL YEP 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、210 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>振荡培养过夜。次日,将其转入 50 mL YEP 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、210 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>振荡培养至 OD600 值在 0.5~0.7 时,收集菌体,用 MS 液体培养基悬浮,待用。

大豆的遗传转化:

将前期处理好的大豆子叶节外植体用解剖刀在胚轴与子叶连接部位轻轻划几刀制造伤口,然后于农杆菌工程菌液中浸泡 30 min,转入共体培养基中,于 25 $^{\circ}$ C、暗培养 3 d。然后将其转入含适宜除草剂浓度的筛选培养基中,诱导丛生芽生长,培养条件为 25 $^{\circ}$ C、光照 16 h $\cdot$ d<sup>-1</sup>,光照强度为 2 000 lx。每隔 15 d 继代 1 次。当抗性芽生长至 1~2 cm 时,将芽切下,转移到伸长培养基中,促进植株茎的生长;当茎长至 3~5 cm 时,转移到生根培养基中生根。最后当根系发育健全后进行炼苗移栽。

#### 1.2.3 转基因植株的检测

转基因植株 PCR 检测:

根据 CTAB 法提取转基因植株和非转基因植株叶片的总 DNA,以此为模板,利用植物表达载体 p3301-GY1 上 *Bar* 基因的特异性引物进行 PCR 检测,非转基因植株为阴性对照。引物序列如下:

M3301barS:5' AAGTCCAGCTGCCAGAAACC3';  
M3301barAS:5' CTGCACCATCGTCAACCACTACA3',  
片段长度 441 bp。

PCR 扩增反应体系: dNTP 2  $\mu$ L,引物各 25 pmol,模板 0.1  $\mu$ g,ExTaq 0.25  $\mu$ L,10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L 以 ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。

PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

转基因植株 Southern 杂交检测:

对 PCR 鉴定为阳性的植株,提取大豆叶片基因组 DNA,利用 *Hind*Ⅲ 酶消化,因 GY1 基因为大豆内源基因,故以 *Bar* 基因作为探针进行 Southern 杂交检测,具体过程参照罗氏公司 DIG DNA Labeling and Detection Kit 试剂盒进行。

转基因植株 RT-PCR 检测:

利用 Total RNA Extraction Kit 提取试剂盒提取大豆结荚后 40 d 的未成熟种子总 RNA,然后反转录,以反转录的 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 方法扩增 GY1 基因。GY1 基因的特异性引物为: Gy1S 5'-ATGGCCAAGCTAGTTTT- 3'; Gy1A 5'-CTAAGC-

CACAGCTCTCT-3', 扩增片段长度为 1 488 bp。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 50℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 18 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min。以大豆生长因子基因为 RT-PCR 的内标, 内标引物为: EFS: 5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAA GCG-3', EFAS: 5'-AGACACAGACTACAGAAAAGAA AC-3', 片段长度为 746 bp; PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 50℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 18 个循环; 72℃ 延伸 8 min。

1.2.4 转基因植株的蛋白质与脂肪含量测定 利用 BUCHI N-500 型远红外线谷物分析仪对转基因植株进行检测, 取转基因大豆种子与非转基因大豆种子各 80 粒, 3 次测量取平均值。

1.2.5 SDS-PAGE 分析 利用 Nagano 法<sup>[9]</sup> 提取转基因大豆与非转基因大豆的贮藏蛋白。用不连续垂直板状凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 4%、分离胶浓度为 15%, 浓缩胶高度 2 cm, 上样量为 10 μL, 将电压控制在 80 V, 恒压电泳 4~5 h, 当样品中所含的溴酚蓝指示剂迁移至下沿约 1~1.5 cm 处即停止电泳。之后用 10% (w/v) 三氯乙酸固定过夜, 考马斯亮蓝 R-250 染色 3~4 h, 冰醋酸-甲醇水溶液脱色 2~3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体 p3301-GY1 的鉴定

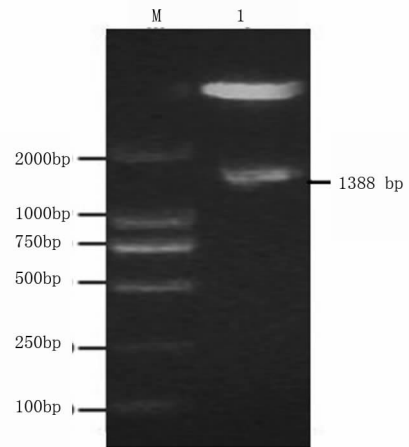
将 1.2.1 中得到的连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂布在含有 Kan 抗生素的 LB 平板培养基中选择培养。待单菌落形成后, 随机挑去 5 个单菌落于 LB 液体培养基中震荡培养, 用质粒小提试剂盒提取质粒 DNA 进行酶切鉴定。结果如图 1 所示, 在 1 388 bp 处为种子特异性启动子, 证实了目的片段插入正确, 成功构建了新的植物表达载体 p3301-GY1。

### 2.2 转基因植株的 PCR 检测

利用农杆菌介导的大豆的遗传转化法浸染大豆子叶节, 获得转基因大豆 1 株, 得到 T<sub>0</sub> 代种子 35 粒, 将得到的籽粒萌发, 成苗 25 株, 提取单株叶片总 DNA, 以此为模板进行 PCR 检测, 结果显示, 共获得阳性植株 12 株。图 2 为随机抽取 8 棵阳性植株的电泳结果。

### 2.3 转基因植株的 Southern 杂交检测

将 PCR 检测为阳性的转基因植株的 PCR 产物进行测序, 选取测序正确的转基因植株, 提取叶片基因组 DNA, 进行 Southern 杂交, 检测重组表达载体的 R-DNA 区是否已经整合到转基因植株的基因

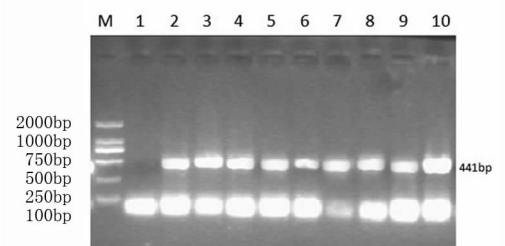


M: DNA 分子量标准 (DL2000); 1: *EcoRI* + *BstEII* 双酶切

M: DNA Marker DL-2000; 1: Digested *EcoRI* + *BstEII*

图 1 表达载体 p3301-GY1 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of expression vector p3301-GY1

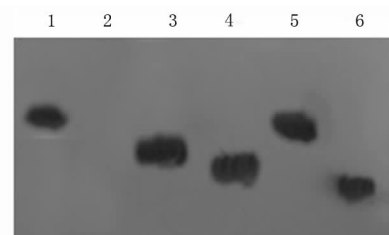


M: DNA marker DL-2000; 1: 未转化的植株; 2: 质粒阳性对照; 3~10: 转基因植株

M: DNA marker DL-2000; 1: Non-transgenic plant; 2: Positive control; 3-10: Transgenic plant

图 2 转基因植株 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR analysis of transgenic plants



1: 阳性对照; 2: 未转化的植株; 3~6: 为转基因植株

1: Positive control; 2: Non-transgenic plant; 3~6: Transgenic plant

图 3 转基因植株 Southern blot 检测

Fig. 3 Southern blot analysis of transgenic plants

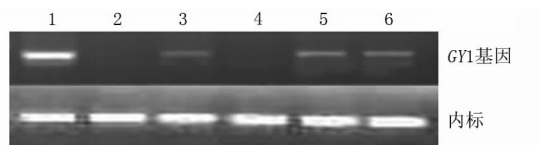
组中。

从图 3 中可以看出, 转基因植株 3~6 号有杂交带出现, 而非转基因植株没有杂交带出现。因此可以证明表达载体的 T-DNA 区已经整合到植物基因组中。并且 3~6 号转基因植株的杂交带大小有所不同, 说明外源基因整合位点并不相同。

### 2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测

取授粉 30 d 的转基因大豆籽粒, 通过异硫氰酸胍法提取总 RNA, 用甲醛变性凝胶电泳分离 RNA。

以转基因大豆籽粒的总 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,用大豆 *GY1* 基因片段引物做 18 个循环的 PCR 反应,同时以大豆生长因子作为内标,做 18 个循环的 PCR 反应(图 4)。结果显示转基因植株 2 号和 4 号 11S 球蛋白 *GY1* 基因 mRNA 的含量较非转基因植株明显下降,3 号、5 号和 6 号也有不同程度的减弱,说明外源基因在转基因植株中能正常转录,并导致 11S 球蛋白 *GY1* 基因 mRNA 发生降解。



1:非转基因植株;2~6:转基因植株

1:Non-transformed plant;2~6:Transgenic plants

图 4 转基因植株 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR detection of transgenic plants

## 2.5 转基因植株蛋白质与脂肪含量测定

利用 BUCHI N-500 型远红外谷物分析仪测定转基因植株蛋白质与脂肪含量。

结果如图 5 所示,转基因植株的蛋白质含量均有所降低,脂肪含量均有所上升。转基因植株蛋白质平均含量 36.07%,平均降低 1.43 个百分点(非转基因对照为 37.50%),最大降低 2.05 个百分点,降至 35.45%;转基因大豆脂肪的含量有所提高,脂肪平均含量 21.28%,平均提高 0.76 个百分点(非转基因对照为 20.52%),最大提高 1.45 个百分点达到 21.97%。

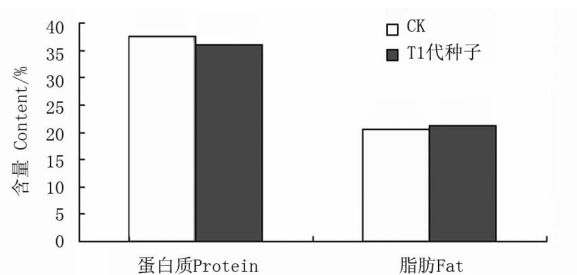


图 5 转基因植株蛋白质和脂肪含量测定

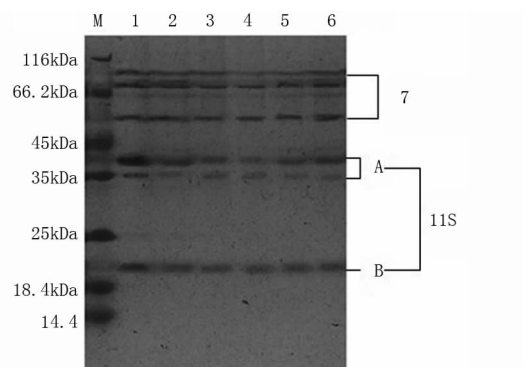
Fig. 5 The protein contents and fat contents of transgenic plants

## 2.6 SDS-PAGE 分析

通过 SDS-PAGE 鉴定分析转基因植株蛋白组分表达量。电泳结果如图 6,转基因大豆在 35 kDa ~ 45 kDa 处条带较非转基因植株明显减弱,表明 *GY1* 基因的表达量有所减弱, RNA 干扰效果明显。

## 3 讨论

用常规育种方法来提高大豆脂肪含量,不但时



M:Marker;1:未转化植株;2~6:转基因植株

M:Marker;1:Non-transformed plant;2-6:Transgenic plants

图 6 转基因植株 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of transgenic plants

间长,而且受到种质资源的限制,改良空间有限。已有一些研究利用 RNA 干扰来改良作物品质,马建等<sup>[10]</sup>利用 RNA 干扰技术,通过花粉管通道法将具有 hpRNA 和 ihpRNA 结构的大豆脂肪氧化酶基因 RNAi 表达载体导入大豆,成功抑制了大豆脂肪氧化酶基因的表达,使得转基因植株脂肪含量提高。郭志鸿等<sup>[11]</sup>采用 RNA 干扰技术通过沉默内源 *Sbe 1* 和 *Sbe 2*,获得高直链淀粉含量的马铃薯。因此,利用 RNA 干扰技术,使得大豆球蛋白 *GY1* 基因的表达受到抑制,以此降低大豆蛋白质含量,进而提高大豆的脂肪含量,达到培育高脂肪含量大豆的最终目的。实验结果表明,利用 RNA 干扰技术改良的大豆总蛋白含量对比非转基因植株有所降低,脂肪含量有所提高。即大豆中蛋白质含量的降低,会导致脂肪含量的相应增加。这为培育高油大豆提供了一条新途径,通过 RNA 干扰定向敲减大豆蛋白质表达基因,随着蛋白质表达基因信号的减弱,大豆蛋白含量减少,大豆油份含量相应增加。

## 4 结论

利用农杆菌介导的大豆子叶节转化法将大豆 11S 贮藏蛋白 *GY1* 基因 RNA 干扰表达载体转入大豆品种“吉农 28”。PCR 和 Southern 杂交检测表明, RNAi 植物表达载体 p3301-Gyl 已成功插入到转基因大豆植株的基因组 DNA 中。RT-PCR 检测分析表明 RNA 干扰在转录后水平发挥了作用,对 11S 球蛋白 *GY1* 基因在 mRNA 水平上的有明显的干扰效果。SDS-PAGE 检测结果表明 11S 球蛋白表达含量降低。对转基因大豆蛋白质和脂肪含量的测定结果表明,转基因大豆总蛋白含量比非转基因植株有所降低,平均降低 1.35 个百分点,而脂肪的含量有所提高,平均提高 0.81 个百分点。

## 参考文献

- [1] 杨辉霞,王芳,单雷,等.大豆贮藏蛋白基因及其表达调控研究进展[J].大豆科学,2003,22(4):296-300. (Yang H X, Wang F, Shan L, et al. The progress of the studies on soybean seeds protein genes and the regulation of their expression[J]. Soybean Science, 2003, 22(4): 296-300. )
- [2] Wang T L, Domoney C, Hedley C L, et al. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 886-891.
- [3] Ereken-Tumer N, Richter J D, Nielsen N C. Structural characterization of the glycinin precursors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257: 4016-4018.
- [4] Beilinson V, Chen Z, Shoemaker R C, et al. Genomic organization of glycinin genes in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104: 1132-1140.
- [5] Nielsen N C. The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1985, 62: 1680-1686.
- [6] 王恩慧. 中国大豆消费现状与展望[J]. 农业展望, 2010, 6(5): 33-36. (Wang N H. Consumption status and prospects of Chinese soybean[J]. Agricultural Outlook, 2010, 6(5): 33-36. )
- [7] 王永刚. 中国油脂油料供求、贸易、政策的现状与前景[J]. 粮食科技与经济, 2009, 34(6): 11-13. (Wang Y G. Status and prospects of the Chinese fuel oil supply and demand, trade policy [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2009, 34(6): 11-13. )
- [8] 赵力超, 陈永泉, 金越. 我国大豆加工利用研究的综合分析[J]. 现代食品科技, 2005, 27(1): 157-159. (Zhao L C, Chen Y Q, Jin Y. Analysis of Chinese soybean processing and utilization [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 27(1): 157-159. )
- [9] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 941-944.
- [10] 马建. 大豆脂肪氧化酶基因 RNAi 表达载体的构建及表达调控的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008. (Ma J. Construction the soybean fat oxidase RNAi gene expression vector and regulation the expression of the soybean fat oxidase[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2008. )
- [11] 郭志鸿, 张金文, 王蒂, 等. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 494-501. (Guo Z H, Zhang J W, Wang D, et al. Using RNAi technology to produce high-amylose potato plants[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(2): 494-501. )

## 欢迎订阅 2013 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》为月刊,2013 年定价 50 元/册,全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话:010-82108548;传真:010-82105793

网址: <http://www.chinacrops.org/zwxp/>

E-mail: zwxp301@mail.caas.net.cn; xbw@chinajournal.net.cn