

大豆 7S 蛋白 β 亚基基因 RNAi 表达载体构建

戴嘉乐, 马建, 付永平, 曲静, 王丕武

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以大豆 7S 蛋白 β 亚基基因为靶基因(基因编号:AB030840),利用 RT-PCR 克隆得到大豆 7S 蛋白 β 亚基基因核心序列 398 bp,构建了以抗除草剂基因 *BAR* 为筛选标记的安全植物 RNAi 表达载体 BAR-7 α p- β 。分子生物学检测表明 7S 蛋白 β 亚基基因的表达式构建成功。研究结果为应用 RNA 干扰技术降低大豆过敏原,提高大豆蛋白品质奠定了基础。

关键词:RNA 干扰;7S 蛋白 β 亚基;表达载体

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)06-1021-03

Construction of the RNAi Expression Vector of Soybean 7S Protein β -subunit Gene

DAI Jia-le, MA Jian, FU Yong-ping, QU Jing, WANG Pi-wu

(Agronomy College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: In this study we used β -subunit gene of 7S protein as the target genes (Gene number: AB030840), then obtained 398 bp core sequence of β -subunit gene by RT-PCR and constructed RNAi expression safe plant vector BAR-7 α p- β , with a herbicide resistant *BAR* gene as selection marker. The result of PCR, molecular biology detection demonstrated that gene expression vector of 7S protein β -subunit was successfully constructed. This study provided foundation for the application of RNA interference technology to reduce soybean allergens and improve quality of soybean proteins.

Key words: RNA interference; 7S protein β -subunit; Expression vector

大豆的总蛋白含量约占其总质量的 40%,是富含人体必需氨基酸的优质植物蛋白^[1]。但是,大豆蛋白也是一种抗原性极强的植物蛋白,其 7S 蛋白中的 β -伴大豆球蛋白在大豆总蛋白中占的比例较小,却是主要过敏原之一,可以引起婴儿及幼龄动物的消化道过敏反应^[2-5]。 β -伴大豆球蛋白是由 α 、 α' 和 β 亚基按照不同的组合构成的,其中 β 亚基分子量为 52 kD,由 416 个氨基酸组成^[6]。经研究证明 β 亚基也同样具有免疫活性^[7]。

培育相关蛋白亚基缺失品种是清除大豆蛋白致敏作用的有效措施。日本学者用 Co^{60} 照射得到了 β 亚基单亚基缺失的品种^[8]。同时也在自然界中发现 β 亚基缺失的大豆品种^[9]。

RNA 干扰(RNA 干涉)是由与靶基因同源的双链 RNA 诱导的转录后基因沉默现象,可以用于植物抗病性和抗菌性实验,也可以用于植物品质性状的改良。本研究根据 7S 蛋白 β 亚基基因 AB030840 的核心序列,通过 RT-PCR 和基因重组技术构建了以 *BAR* 基因为筛选标记的安全植物 RNAi 表达载体,以期应用 RNA 干扰技术降低大豆过敏原,提高大豆蛋白品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株, BAR-7 α p-NHZ-3301 基础表达载体由吉林农业大学生物技术中心提供,引物由北京三博远志生物公司合成, DNA 提取试剂盒购自康为世纪公司, RNA 提取试剂盒, pMD18-T Simple Vector、Taq DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自 Ax-ygen 公司。

1.2 方法

1.2.1 7S 蛋白 β 亚基核心序列的克隆 以大豆 7S 蛋白 β 亚基基因(基因编号:AB030840)为靶基因,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,通过 DNAMAN 进行酶切位点分析,选择适用的酶切位点加入引物序列(下划线所示为酶切位点序列)。

β 亚基基因正义片段引物:

P1: 5'GGGAAGCTTATTCAAAGGCCATAGTG 3',

酶切位点为 *Hind* III;

P2: 5'TTGCGTTACCCCTTCTTCCCTTACTCC 3',

酶切位点为 *Bst* II;

β 亚基基因反义片段引物:

收稿日期:2012-03-09

第一作者简介:戴嘉乐(1985-),男,在读硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:dale8520@163.com。

通讯作者:王丕武(1958-),教授,博士生导师,主要从事农业生物技术和作物遗传育种研究。E-mail:peiww@yaho.com.cn。

P3: 5' TTTCTGCAGATTCAAAGGCCATAGTG 3', 酶切位点为 *Pst* I;

P4: 5' GGGTCTAGACTTTCTTCCCTTACTCC 3', 酶切位点为 *Xba* I。

提取鼓粒 30 d 的大豆籽粒的总 RNA^[12], 反转录成 cDNA, 具体步骤参见 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒。以 cDNA 为模板, 用上述设计好的特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 48℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸

60 s, 31 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增得到 7S 蛋白 β 亚基基因的核心序列, 回收目的基因片段, 并连入克隆载体 PMD-18T。

1.2.2 RNAi 表达载体的构建 将获得的目的基因片段以反向和正向形式, 经限制性内切酶酶切分别连入基础表达载体的种子特异性启动子与内含子、内含子与 NOS 终止子之间, 载体臂内结构如图 1 所示。

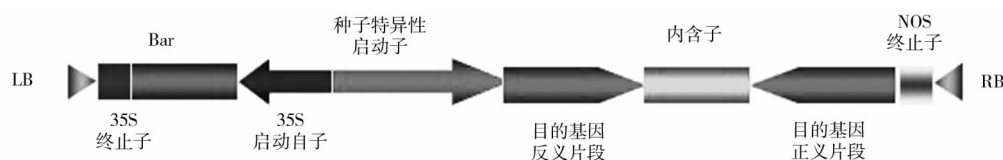


图 1 β -BAR-RNAi 表达载体臂内结构

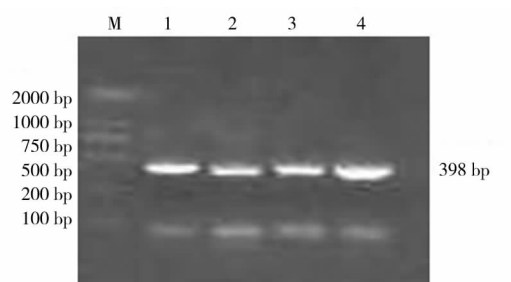
Fig. 1 β -BAR-RNAi expression carrier arm structure

2 结果与分析

2.1 7S 蛋白 β 亚基基因核心序列的克隆

用 RNA 提取试剂盒提取的鼓粒 30 d 的大豆籽粒总 RNA, 反转录为 cDNA, 并用特异性引物进行 PCR 扩增, 其琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。

由图 2 可以看出 PCR 扩增的片段长度约为 398 bp, 将 1~4 泳道的目的条带回收, 连接 PMD-18T 克隆载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 测序结果与 β 亚基基因核心序列同源性达 100%, 表明 β 亚基基因目的片段克隆成功, 可以构建表达载体。



M: Marker; 1~4: 7S 蛋白 β 亚基基因核心序列

M: Marker; 1-4: Core sequence of 7S protein β -subunit gene

图 2 7S 蛋白 β 亚基基因的核心序列 PCR 结果

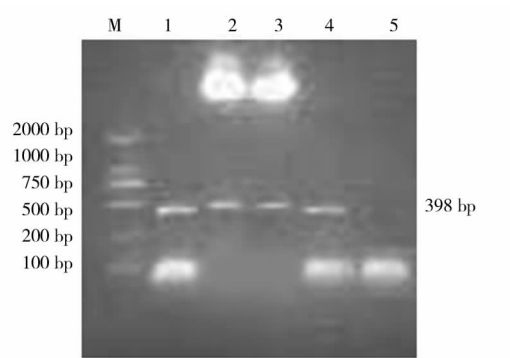
Fig. 2 PCR results of 7S protein beta-subunit gene core sequence

2.2 7S 蛋白 β 亚基基因表达载体的构建

将目的基因反义片段和基础表达载体分别用 *Xba* I 和 *Pst* I 进行双酶切, 并用 T_4 连接酶连接。得到 BAR-7 α p-f 中间载体, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 涂于含有卡那抗性的 LB 固体培养基上, 培养 16 h, 挑取单菌落碱裂解法提取质粒 DNA, 然后将正义片段与上述中间表达载体用 *Hind* III 和 *Bst* II

进行双酶切, 经 T_4 连接酶连接后转入大肠杆菌感受态中, 涂于含有卡那抗性的 LB 固体培养基上。待长出单菌落后, 挑取单菌落于含卡那抗性的液体 LB 培养基中扩繁。将扩繁得到的菌液用碱裂解法提取质粒 DNA, 并对得到的质粒进行 PCR 和酶切验证, 其琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。

从图 3 可以看出, 表达载体的 PCR 结果和酶切结果电泳条带都与阳性对照相同, 表明 RNAi 表达载体构建成功, 可以用于大豆的遗传转化。



M: Marker; 1: 表达载体的 PCR 检测结果; 2、3: 表达载体的酶切验证结果; 4: 克隆载体的 PCR 阳性对照; 5: BAR-7 α p-3301 基础表达载体阴性对照。

M: Marker; 1: PCR results of expression vector; 2, 3: Enzyme digestion results of expression vector; 4: PCR results of clone vector; 5: BAR-7 α p-3301 negative control based expression vector.

图 3 表达载体 PCR、酶切验证

Fig. 3 PCR and enzyme digestion results of the expression vector

3 结论

采用 RT-PCR 方法克隆了 β -伴大豆球蛋白的 β 亚基基因 AB030840 的核心序列, 构建了以抗除草

剂基因 *BAR* 为筛选标记的安全植物 RNAi 表达载体 *BAR-7 α p- β* 。研究结果为应用 RNA 干扰技术降低大豆过敏原,提高大豆蛋白品质奠定了基础。

参考文献

- [1] 孟祥勋. 大豆种子贮藏蛋白的研究[J]. 东北农业大学学报, 1997, 28(2): 201-207. (Meng X X. Studies on storage protein soybean seeds[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1997, 28(2): 201-207.)
- [2] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient sensitivity to soybean meal in the early weaned pig[J]. Journal of Animal Science, 1990, 68: 1790-1799.
- [3] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Measuring suitability of soybean products for early weaned pigs with immunological criteria[J]. Journal of Animal Science, 1991, 69: 3299-3307.
- [4] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. α -subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(5): 831-833.
- [5] Sissons J W, Smith R H. The effect of different diets, including those containing soybean products, on digesta movement and water and nitrogen absorption in the small intestine of the preruminant calf[J]. British Journal of Nutrition, 1976, 36: 421-426.
- [6] 刘珊珊, 武小霞, 姜振峰, 等. 大豆 7S 球蛋白 β -伴大豆球蛋白的研究现状[J]. 大豆科学, 2007, 26(3): 417-422. (Liu S S, Wu X X, Jiang Z F, et al. Advance in soybean 7S Globulin β -Conglycinin[J]. Soybean Science, 2007, 26(3): 417-422.)
- [7] 郑树贵, 曹松屹, 孙泽威, 等. β -伴大豆球蛋白 β 亚基的纯化及免疫活性鉴定[J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 301-304. (Zheng S G, Cao S Q, Sun Z W, et al. Purification of β -subunit from β -conglycinin and identification of immunological activity of the prepared subunit[J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 301-304.)
- [8] Hirata Y, Liu S S, Thanh V G, et al. 7S new subunit characterization for protein improvement and regulation[C]. Abstracts of Contributed Papers. Brazil: VII. World Soybean Research Conference & IV. International Soybean Processing and Utilization Conference, 2004, 2: 61.
- [9] 郭顺堂, 孟岩, 张雪梅, 等. 中国大豆蛋白亚基构成分析与缺失部分亚基的特异大豆品种的筛选[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1130-1134. (Guo S T, Meng Y, Zhang X M, et al. Analysis of protein subunit composition of Chinese soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] cultivars and screening of soybean cultivars lacking some subunits[J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(8): 1130-1134.)
- (上接第 1020 页)
- [23] Magee P J, McGlynn H, Rowland I R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro[J]. Cancer Letters, 2004, 208: 35-41.
- [24] Lee E J, Kim S Y, Hyun J W, et al. Glycitein inhibits glioma cell invasion through down-regulation of *MMP-3* and *MMP-9* gene expression[J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 185: 18-24.
- [25] Chen X, Tang L J, Sun Y N, et al. Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2010, 104: 379-384.
- [26] 吴婷婷, 崔桂友, 颜云莽, 等. 8-羟基大豆苷元的生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 141-146. (Wu T T, Cui G Y, Yan Y Q, et al. The research review of the bioactivity of 8-hydroxydaidzein[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(2): 141-146.)
- [27] 冉昇, 崔桂友, 吴婷婷, 等. 8-羟基大豆苷元的生物来源研究综述[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 141-146. (Ran S, Cui G Y, Wu T T, et al. Review of the studies on natural bio-source of 8-Hydroxydaidzein[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(4): 141-146.)
- [28] Tang L J, Chen X, Sun Y N, et al. Synthesis and biological studies of 4', 7, 8-trihydroxy-isoflavone metal complexes[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2011, 105: 1623-1629.
- [29] Liao S Y, Chen J C, Qian L, et al. QSAR, action mechanism and molecular design of flavone and isoflavone derivatives with cytotoxicity against Hela[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43: 2159-2170.
- [30] Ndejoung Tchize B Le S, Sattler I, Dahse H M, et al. Isoflavones with unusually modified B-rings and their evaluation as antiproliferative agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19: 6473-6476.