

大豆 *fad3c* 基因沉默载体的构建

杜景红^{1,2}, 刘丽君¹

(1. 黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江大学 农业资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 构建大豆 *fad3c* 基因的沉默载体, 旨在为培育生物安全的高油酸低亚麻酸转基因大豆奠定基础。从高蛋白大豆黑农 35 中克隆大豆种子特异表达启动子 GY1; 从高油大豆黑农 37 中克隆 *fad2-1b* 基因内含子 1; 从 5 个转基因受体大豆中克隆 *fad3c* 基因片段, 作为正向臂和反向臂。构建筛选标记基因为 *bar*, 启动子为 GY1, 内含子为 *fad2-1b* 基因内含子 1 的双 T-DNA 载体。将双 T-DNA 载体转化大肠杆菌 DH5 α , 酶切和序列分析鉴定表明扩增得到的重组质粒正确, 命名为 pDT-GFAD3I。

关键词: 大豆; *fad2-1b*; *fad3c*; RNAi; 载体构建

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)01-0028-05

Construction of *fad3c* Gene Silencing Vector in Soybean

DU Jing-hong^{1,2}, LIU Li-jun¹

(1. Postdoctoral Research Station, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; 2. College of Agricultural and Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang, China)

Abstract: Soybean *fad3c* gene silencing vector was constructed for breeding high oleic acid and low linolenic transgenic soybeans with biosafety. Seed-specific promoter GY1 of soybean was amplified from high protein soybean 'Heinong 35'; *fad2-1b* gene intron 1 was amplified from high oil soybean 'Heinong 37'; *fad3c* gene fragment was amplified from five transgenic acceptors of soybean, which was used as forward arm and reverse arms. These target fragments were cloned into the TA cloning vector with selection marker *bar* gene, promoter GY1 and *fad2-1b* gene intron 1. Then the recombination plasmid was introduced into *E. coli* DH5 α , and the plasmid was verified by enzymes digestion and sequence analysis. The recombination plasmid was named pDT-GFAD3I.

Key words: Soybean; *fad2-1b*; *fad3c*; RNAi; Vector construction

大豆油在贮存过程中极易氧化, 严重影响了大豆油的贮存稳定性。提高油酸含量且降低亚油酸和亚麻酸含量可以提高大豆油的抗氧化能力。大豆亚油酸主要的合成途径是在大豆内源基因 *fad2* 调控下由油酸生成亚油酸, 并在内源基因 *fad3* 作用下, 亚油酸又部分转化成为亚麻酸, 在亚油酸和亚麻酸的合成过程中, FAD2 和 FAD3 酶的活性尤其重要, 大豆种子的亚麻酸含量在常见的油料作物中最高, 占总脂肪酸的 8.98%^[1-3]。提高大豆油酸含量的育种技术有杂交育种、诱变育种和转基因育种等, 其中采用转基因技术抑制或降低 FAD2 和 FAD3 酶的基因表达技术是提高大豆种子中油酸含量的有效技术之一^[4-5]。本研究构建了大豆 *fad3* 基因的沉默载体, 目的是沉默 *fad3* 基因, 并在转基因大豆后代中消除筛选标记 *bar* 基因, 为培育生物安全的高油酸低亚麻酸的转基因大豆新材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 高蛋白大豆品种黑农 35 (蛋白

质含量 45.2%) 和 5 个转基因受体大豆品种黑农 37、黑农 38、黑农 44、黑农 46、黑农 56 由黑龙江省农业科学院大豆研究所提供。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌菌株为 DH5 α ; 侵染所用的根癌农杆菌菌株为 LBA4404 (pAL4404); 质粒由东北农业大学生命科学学院构建保存。

1.1.3 酶类及试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶等购自大连宝生物公司; DNA 片段回收试剂盒购自百泰克生物公司。卡那霉素、氨苄青霉素等均为国产针剂, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 检索到的相关序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增特异性引物如下:

GY1 启动子特异引物:

GY1-SNECE: 5' AAGCTTGAAGTAAATCATGAG-CTTTTCCAAC 3'

GY1-ANTISENSE: 5' CCATGCTGATGACTGATG-AGTGTTTAAGGACC 3'

收稿日期: 2012-09-18

基金项目: 黑龙江省农业科学院博士后科研启动经费。

第一作者简介: 杜景红 (1968-), 女, 副教授, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究和水稻抗逆性研究。E-mail: aimi933@163.com。

通讯作者: 刘丽君 (1958-), 女, 研究员, 主要从事大豆栽培育种研究。E-mail: nkyssbd@126.com。

fad2-1b 内含子 1 特异引物序列:

fad2-IN SENCE: 5' GGATCCCCACTAGGCATGG-TATGATGCTAA 3'

fad2-IN ANTISENCE: 5' CTGCAGTGTTTCCTT-TGCTAGACCCTGTG 3'

fad3c 基因特异引物序列:

正向臂引物: *fad3*-Z SENCE: 5' CCATGGTCT-CATTTCAACCCTTACAGCAAC 3'

fad3-Z ANTISENCE(NEW): 5' GGATCCCAAAT-AGGGAACCCCATAGAGC 3'

反向臂引物: *fad3*-F SENCE: 5' GAGCTCTCT-CATTTCAACCCTTACAGCAAC 3'

fad3-F ANTISENCE(NEW): 5' CTGCAGCAAAT-AGGGAACCCCATAGAGC 3'

1.2.2 *fad3c* 基因沉默载体的构建步骤 GY1 启动子扩增: 以高蛋白大豆品种黑农 35 基因组 DNA 为模板, 用 GY1 启动子特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物克隆至 T 载体。将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序。

fad2-1b 内含子 1 的扩增: 以黑农 37 基因组 DNA 为模板, 用 *fad2-1b* 内含子 1 特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物克隆至 T 载体。将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序。

fad3c 基因扩增: 以黑农 37、黑农 38、黑农 44、黑农 46、黑农 56 基因组 DNA 为模板, 用 *fad3c* 基因特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物克隆至 T 载体。将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序。

fad3c 基因沉默载体的构建: 筛选标记为 *bar* 基因, 启动子为 GY1, 内含子为 *fad2-1b* 基因内含子 1 的双 T-DNA 载体。

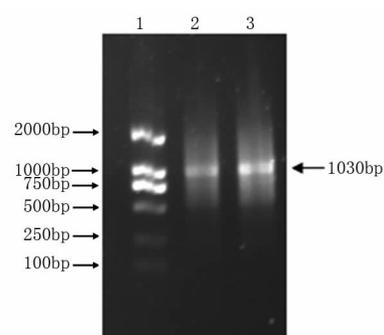
2 结果与分析

2.1 GY1 启动子的序列克隆

以高蛋白大豆品种黑农 35 基因组 DNA 为模板, 用 GY1 启动子特异引物进行 PCR 扩增, 获得与预期片段(1 031 bp)大小一致的产物(图 1, 图 2)。扩增产物克隆至 T 载体, 将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序。启动子元件测序分析发现, 克隆的黑农 35 GY1 启动子片段含有 TATA 盒、CAAT 盒等启动子特征元件, 同时含有 RY 重复序列元件、Legumin 盒、SEF4 基元、E 盒、CACA 元件等种子特异表达所需的顺式作用元件。说明该启动子具备种子特异表达启动子的特征, 可用于目标载体构建。

2.2 *fad2-1b* 内含子 1 的扩增

以黑农 37 基因组 DNA 为模板, 用 *fad2-1b* 内含子 1 特异引物进行 PCR 扩增, 得到与预期片段大小

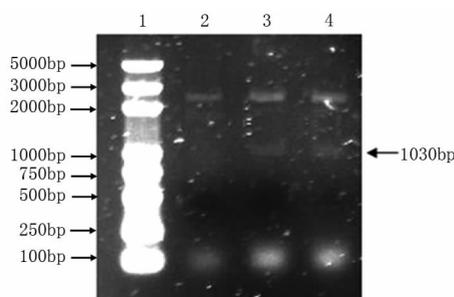


1: DL2000 Marker 2, 3 GY1 启动子 PCR 扩增结果

1: DL2000 Marker 2, 3: PCR of GY1 promoter

图 1 GY1 启动子 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR of GY1 promoter



1: DL5000 Marker 2: pMD18/*Hind* III + *Nco*I 3, 4: pT-GY1/*Hind* III + *Nco*I

1: DL5000 Marker 2: pMD18/*Hind* III + *Nco*I 3, 4: pT-GY1/*Hind* III + *Nco*I

图 2 GY1 启动子克隆鉴定

Fig. 2 Identification of GY1 promoter cloning

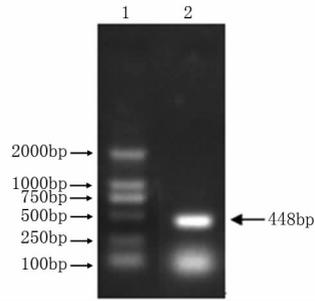
一致的产物(图 3), 扩增产物克隆至 T 载体。将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序, 测序结果表明, 克隆的黑农 37 *fad2-1b* 内含子 1 序列与 GenBank 上的 *fad-1b* 内含子 1 序列只有 1 个碱基的差异, 并且不在剪接位点和分支位点, 具备内含子功能, 可用于后续的目标载体构建实验。

2.3 *fad3c* 基因的扩增

以黑农 37、黑农 38、黑农 44、黑农 46、黑农 56 基因组 DNA 为模板, 用 *fad3c* 基因特异引物进行 PCR 扩增, 获得与目标片段一致的产物(图 4)。扩增产物克隆至 T 载体, 将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序。测序分析结果表明, 克隆的黑农 37 *fad3c* 基因外显子正向臂与黑农 56 的 *fad3c* 基因外显子反向臂可构成 *fad3c* 外显子的正反臂, 用于构建 RNAi 载体。

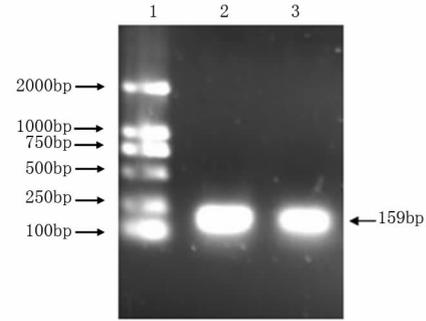
2.4 *fad3c* 沉默载体的构建

fad3c 基因沉默载体的构建过程如图 5 所示。BamHI、*Sac*I 双酶切质粒 pT-FAD3Z, 回收约 2 900 bp 的载体片段; BamHI、*Pst*I 双酶切质粒 pT-FAD2IN, 回收约 450 bp 的 FAD2I 片段; *Pst*I、*Sac*I 双酶切质粒 pT-FAD3F, 回收约 160 bp 的 FAD3F 片段;



1:DL2000 Marker;2:*fad2-1b* 内含子 1 PCR 扩增结果
1:DL2000 Marker;2:PCR of *fad2-1b* introns

图3 *fad2-1b* 内含子 1 PCR 扩增结果
Fig. 3 PCR of *fad2-1b* introns



1:DL2000 Marker;2,3:*fad3c* 外显子 PCR 扩增结果
1:DL2000 Marker;2,3:PCR of *fad3c* exons

图4 *fad3c* 外显子 PCR 扩增结果
Fig. 4 PCR of *fad3c* exons

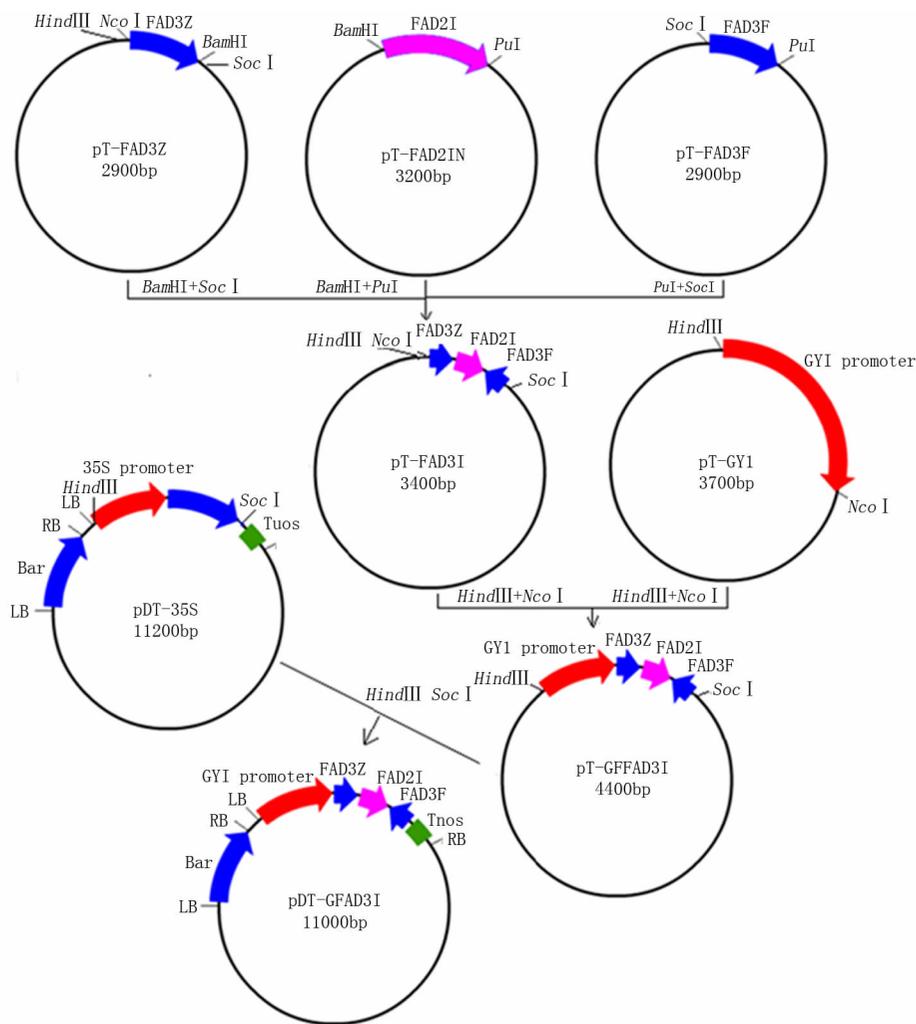


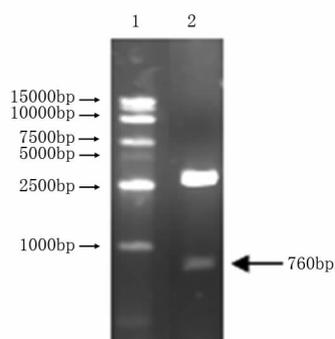
图5 pDT-GFAD3I 载体构建示意图

Fig. 5 Construct process of pDT-GFAD3I silencing vector

将这 3 个片段连接, 构建质粒 pT-FAD3I。HindIII、NcoI 双酶切质粒 pT-FAD3I, 回收约 3 400 bp 的载体片段; HindIII、NcoI 双酶切质粒 pT-GY1, 回收约 1 000 bp 的 GY1 启动子片段; 将这 2 个片段连接, 构建质粒 pT-GFAD3I。HindIII、SacI 双酶切质粒 pDT-35S, 回收约 9 200 bp 的载体片段 HindIII、SacI 双酶切质粒 pT-GFAD3I, 回收约 1 800 bp 的片段; 将这 2

个片段连接, 构建质粒 pDT-GFAD3I。

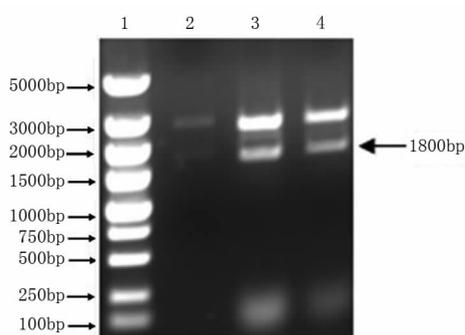
质粒 pT-FAD3I 经 NcoI、SacI 双酶切(图 6) 可获得约 2 600 bp 载体和 760 bp 目的片段(正向臂、反向臂各 160 bp, 内含子 440 bp)。将质粒 pT-FAD3I 送交测序, 将测序结果做 Blastn 比对, 发现序列两端为目的基因 *fad3c* 外显子序列, 中间为目的基因 *fad-1b* 内含子序列(图 9), 说明质粒 pT-FAD3I 构建正确。



1: DL 15 000 Marker
2: pT-FAD3I/*NcoI* + *SacI*

图 6 质粒 pT-FAD3I 酶切鉴定结果

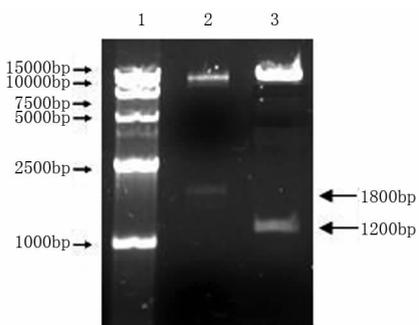
Fig. 6 Enzymes digest Ton of pT-FAD3I



1: DL5000 Marker
2, 3, 4: pT-GFAD3I/*HindIII* + *SacI*

图 7 质粒 pT-GFAD3I 酶切鉴定结果

Fig. 7 Enzymes digestion of pT-GFAD3I



1: DL 15 000 Marker 2: pDT-GFAD3I/*HindIII* + *SacI*
3: pDT-GFAD3I/*HindIII* + *BamHI*

图 8 质粒 pDT-GFAD3I 酶切鉴定结果

Fig. 8 Enzymes digestion of pDT-GFAD3I

质粒 pT-GFAD3I 经 *HindIII*、*SacI* 双酶切(图 7)可获得约 2 600 bp 载体和 1 800 bp 目的片段(GY1 启动子 1 031 bp, 正向臂、反向臂各 160 bp, 内含子 440 bp)。

质粒 pDT-GFAD3I 经 *HindIII*、*SacI* 双酶切(图 8)可获得约 10 000 bp 载体和 1 800 bp 目的片段(GY1 启动子 1 031 bp, 正向臂、反向臂各 160 bp, 内含子 440 bp)。经 *HindIII*、*BamHI* 双酶切(图 8)可获得约 10 600 bp 载体和 1 200 bp 目的片段(GY1

启动子 1 031 bp, 正向臂 160 bp)。

将 T 载体上切下的目的基因片段与 pDT-35S 载体酶切产物片段(含筛选标记基因 *bar*)连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 经酶切及测序鉴定, 重组质粒命名为 pDT-GFAD3I。

3 讨论

脂肪酸是油料作物贮藏油脂的主要成分, 也是生物膜的重要组成部分, 脂肪酸代谢是植物基本的生命活动之一。研究表明, 大豆亚麻酸 *fad3c* 基因的表达量与品种产生的低亚麻酸有关。进行脂肪酸成分的遗传改良, 在提高油酸含量的同时, 也会产生一些不利的农艺学性状如营养体生长变缓、结实率下降、耐冷性降低等^[6]。本研究采用高蛋白大豆 GY1 启动子进行大豆 *fad3c* 基因沉默载体的驱动, 旨在限制 *fad3c* 的 RNA 干扰仅在大豆种子中表达, 减少该基因对大豆正常生长发育的影响。

转基因植物的生物安全性一直是人们关注的焦点, 转基因植物必须通过严格的安全性评价才能进行环境释放和生产性试验。创造不产生新的非目的蛋白的转基因植物, 无疑将大大减少安全性评价工作量。消除筛选标记基因是提高转基因植物生物安全性的有效方法之一, 目前比较常用的标记基因消除方法有共转化法、转座子转座和位点特异性重组系统等^[7-8]。高效的农杆菌转化系统的建立和完善是构建转基因大豆群体的主要方法之一, 该系统具有遗传稳定和 T-DNA 插入片段拷贝数低的特性。本研究中, 植物表达载体中含有双右边界 T-DNA 区, 能够使目的基因与标记基因作为两个独立的元件插入基因组中, 从而通过后代分离, 只保留含目的基因而不含有标记基因的转基因材料。

利用 RNAi 技术对特定基因的抑制作用的研究已经在植物中得到验证。同其他几种用于进行功能缺失或者下调表达突变的技术相比, RNAi 技术更容易达到功能缺失和下调表达的目标, 而且转基因在受体中表达不会产生新的蛋白, 因而具有较高的生物安全性。目前, RNAi 技术已经渗透到遗传学研究的各个领域, 诸如抗病因子、反向筛选标记基因、农艺品质改良、次生代谢途径的调控等研究^[9-12]。本研究根据 GenBank 检索到的相关基因序列, 设计出 4 对有效的特异表达引物, 用 PCR 方法从大豆基因组中分离克隆了 GY1 启动子(1 031 bp)、*fad2-1b* 内含子(448 bp)和 *fad3c* 基因片段(正向臂、反向臂各 160 bp), 成功构建了 *fad3c* 基因沉默载体, 重组质粒命名为 pDT-GFAD3I。

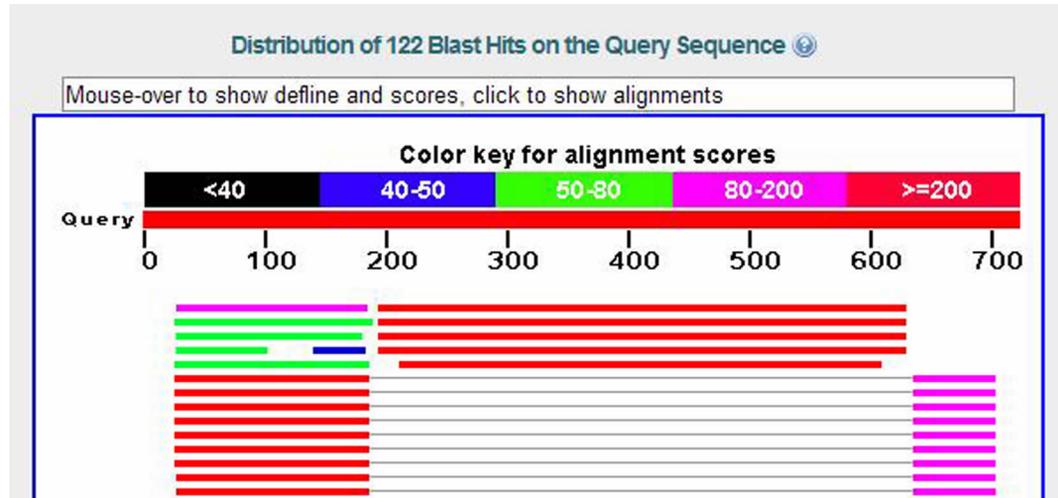


图9 质粒 pT-GFAD3I 测序结果的 blastn 分析结果

Fig.9 Blastn analysis of pT-GFAD3I sequence

参考文献

- [1] 卢定强,陈庶来,陈钧. 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的代谢和生理机能[J]. 江苏理工大学学报,1998,19(3):29-36. (Lu D Q,Chen Z L,Chen J. Metabolism and physiological function of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 1998, 19(3): 29-36.)
- [2] 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.)
- [3] 李丽丽,张雷,刘丽君,等. 大豆内源基因调控与籽粒不饱和脂肪酸的形成[J]. 大豆科学,2008,27(6):929-932. (Li L L,Zhang L,Liu L J,et al. Endogenous gene regulate the formation of unsaturated fatty acid of soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(6):929-932.)
- [4] 李海燕. 大豆转基因的研究进展[J]. 生物技术,2007,17(6):83-86. (Li H Y. Research progress on transgenic soybean[J]. Biotechnology,2007,17(6):83-86.)
- [5] 陈伟. 应用基因沉默技术调节大豆脂肪酸代谢进而选育高油和高油酸大豆新材料[D]. 长春:东北师范大学,2011. (Chen W. Regulation of fatty acid metabolism in seeds of soybean with gene silencing to get high oil and high oleic acid materials[D]. Changchun:Northeast Normal University,2011.)
- [6] 陈苇,李劲峰,董云松,等. 甘蓝型油菜 *Fad2* 基因的 RNA 干扰及无筛选标记高油酸含量转基因油菜新种质的获得[J]. 植物生理与分子生物学学报,2006,32(6):665-671. (Chen W, Li J F, Dong Y S, et al. Obtaining new germplasm of *Brassica napus* with high oleic acid content by RNA interference and marker-free transformation of *fad2* gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2006,32(6):665-671.)
- [7] 陈松彪,李旭刚,王锋,等. 无选择标记转基因植物的培育[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(2):1-7. (Chen S B,Li X G,Wang F,et al. Culturing marker-free transgenic plant[J]. China Biotechnology,2005,25(2):1-7.)
- [8] Wang Y, Chen B, Hu Y, et al. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the cre/lox sitespecific recombination system [J]. Transgenic Research, 2005, 14(5): 605-614.
- [9] 黄冰艳,李忠谊,吉万全,等. 利用 RNA 干扰技术抑制水稻淀粉极限糊精酶基因表达[J]. 农业生物技术学报,2007,15(1):71-75. (Huang B Y,Li Z Y, Ji W Q, et al. Down-regulation of rice pullulanase gene expression by RNA interference[J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2007,15(1):71-75.)
- [10] 陈占宽,张新友,苗利娟,等. 花生 Δ^{12} -脂肪酸去饱和酶基因 RNAi 表达载体的构建[J]. 华北农学报,2006,21(4):9-12. (Chen Z K,Zhang X Y, Miao L J, et al. RNAi plasmid construction of delta-12-fatty acid desaturase gene from peanut[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2006,21(4):9-12.)
- [11] 彭琦,张源,双桑,等. 甘蓝型油菜 *Fad2* 与 *Fae1* 基因双干扰 RNAi 载体的构建[J]. 生物技术通报,2007(5):163-166. (Peng Q,Zhang Y, Shuang S, et al. RNAi vector construction of the *Fad2* and *Fae1* genes of rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Biotechnology Bulletin,2007(5):163-166.)
- [12] 梁会娟,苗利娟,曹刚桥,等. 甘蓝型油菜 Δ^{12} -油酸去饱和酶基因 RNAi 载体的构建[J]. 河南农业科学,2006(6):36-46. (Liang H J, Miao L J, Cao G Q, et al. Construction of RNAi expression vector targeting gene *fad2* in rapeseeds[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2006(6):36-46.)