

大豆凝集素 *le2* 基因 RNA 干扰表达载体构建及转化的研究

魏 强,李鲁华,王春艳,付永平,马 建,曲 静,王丕武

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

摘 要:以构建 RNA 干扰表达体系,探索改良大豆品质方法为目的,根据 GenBank 中已知的大豆凝集素 *le2* 基因核酸保守序列 (AY342212),设计相应引物,克隆 *le2* 基因核心保守序列,测序并与原序列比对同源性为 99.77%。以质粒 p3301-PFNZ- α' 作为基础载体,通过亚克隆构建含有 RNA 干扰元件和 *bar* 基因的表达载体 pCambia3301-*le2*RNAi。通过农杆菌转化法将 RNA 干扰表达载体导入受体大豆吉农 28,获得 PCR 阳性 T_1 代植株 5 株,种子 23 粒。研究结果为大豆品质改良奠定了基础。

关键词:RNA 干扰;大豆凝集素;载体构建;遗传转化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)03-0306-04

Construction of RNAi Expressed Vector of Soybean Agglutinin *le2* Gene and Transform Research

WEI Qiang, LI Lu-hua, WANG Chun-yan, FU Yong-ping, MA Jian, QU Jing, WANG Pi-wu

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

Abstract: For the purpose of constructing RNAi expressed vector, and discussing the method to improve soybean quality, according to known conserved sequence (AY342212) of soybean agglutinin *le2* gene in GenBank, right primer was designed and the conserved sequence was cloned. And the homology was 99.77% contrast to the original sequence. Herein, using P3301-PFNZ- α' as the basic vector, the expression vector pCambia3301-*le2*RNAi was constructed which contained RNA interference vector and *bar* gene through subclone. The RNA interference expression vector was then transformed into cotyledon nodes of soybean Jinong 28 by *Agrobacterium*-mediated method. 5 positive transgenic plants in T_1 generation were confirmed by PCR detection and 23 seeds were harvested from T_1 transgenic plants. The results provided a basis for soybean quality improvement.

Key words: RNAi; Soybean agglutinin; Construction of vector; Transform

大豆是重要的经济作物,蛋白质含量在 33% ~ 50%^[1],且易被人和动物吸收,但其含有的大豆凝集素 (soybean agglutinin, SBA) 是重要的抗营养因子之一,在成熟种子中的含量高达蛋白质总量的 10% 左右,喂食后对动物的代谢产生一定的干扰^[2-3]。因此,降低大豆中凝集素的含量对改良大豆的品质有重要意义。大豆凝集素是指对 N-乙酰基 D-半乳糖胺\ D-半乳糖有结合特异性、分子量约 120 kDa-类糖蛋白^[4],具有典型豆类凝集素四级结构,由等量的 2 种略有不同的 4 个亚基组成,每个亚基分子量约 30 kDa^[5-6]。大豆凝集素基因共有 3 类, *le1*、*le2* 和 *le3*,具有较高的同源性,其中 *le2* 由 1 010 个碱基组成。

应用传统育种方法改良大豆品质,通常通过发掘天然的突变种、诱变育种、分子标记选育品种等方法,再经杂交、回交得到新品系。George 等^[7]利用 γ 射线辐照育成大豆凝集素含量低的品种。杨

明亮等^[8]通过改良血凝法筛选出 5 份低凝集素含量的大豆品种。传统育种有资源和年限的局限性,新兴的 RNA 干扰技术能够定向地在转录后水平上敲减 mRNA,达到转录后基因沉默的效果。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象^[9]。目前, RNAi 在改良大豆品质中已有应用,马建^[10]应用 RNAi 技术成功降低了大豆脂肪氧化酶的表达,付永平^[11]通过 RNAi 技术抑制了胰蛋白酶抑制剂表达。

本研究利用转基因方法,根据在 GenBank 中已知的大豆凝集素基因序列 (AY342212),克隆了大豆凝集素 *le2* 基因核酸保守序列,将 *le2* 基因核酸保守序列基因片段与 p3301-PFNZ- α' 载体酶切连接,获得携带 RNA 干扰片段和 *bar* 基因的大豆凝集素 *le2* 基因 RNAi 表达载体 pCambia3301-*le2*RNAi,通过农杆菌介导法转化植株,为改良大豆品质奠定基础。

收稿日期:2012-12-18

第一作者简介:魏强 (1987-),男,在读硕士,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail:wq.19871113@163.com。

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

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆品种 吉农 28, 由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.2 质粒与菌种 质粒 p3301-PFNZ- α' (实验室已构建好的带有种子特异性启动子和内含子间隔序列的质粒) 和菌种 *E. coli* DHS5 α 均由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.3 试剂 Tag DNA Polymerase、PCR 体系反应试剂、限制性内切酶、pMD18-T Simple Vector、培养基、DNA Marker DL2 000 分子量标准购自 TaKaRa 公司, PCR 产物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。

1.2 方法

1.2.1 *le2* 基因核心保守序列获得 根据 GenBank 中已注册序列 (AY342212), 查得 *le2* 基因序列, 通过引物设计软件 Primer5.0 设计出相应引物为 Le2S: 5'-ATGGCTACCTCCAAGTTCCAT-3', Le2AS: 5'-CTAGATAAAGATTGCAAAATGCG-3'。

采用 CTAB 法^[12] 从新鲜叶片中提取大豆全基因组 DNA, PCR 反应体系 (25 μ L): 模板 1 μ L、引物各 1 μ L、dNTP 0.8 μ L、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、Mg²⁺ 2.5 μ L、Tag DNA polymerase 0.2 μ L、ddH₂O 16 μ L。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 50 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 50 s, 后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 反应 35 个循环。经过 PCR 反应获得 *le2* 基因核心序列片段, 将所得扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒回收片段并测序。

1.2.2 *le2* 基因克隆载体构建 将 *le2* 基因核心序列片段和 pMD18-T 载体在 T4 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 获得 *le2* 克隆载体 pMD18-T-*le2*, 将其导入 *E. coli* DHS5 α 感受态细胞中进行转化, 转化后的大肠杆菌细胞在含有 *kan* 抗性的菌板中培养, 并对单克隆进行测序。

1.2.3 *le2* 基因 RNAi 正、反义片段的获得及表达载体的构建 借助 Primer5.0 软件, 人工设计带有酶切位点的寡核苷酸引物:

P1 5' TTT\CTGCAG\TGGGACAAGTTCGTGCC
3' Pst I

P2 5' GGG\TCTAGA\TATCCTCACCCACTCGG
3' Xba I

P3 5' TTT\GGTGACC\TATCCTCACCCACTCGG
3' BstE II

P4 5' GGG\AAGCTT\TGGGACAAGTTCGTGCC
3' Hind III

其中, P1 和 P2 为正义链引物, P3 和 P4 为反义链引物。利用 P1, P2 为引物, 以 *le2* 克隆载体为模

板, 经 PCR (反应体系与反应条件同 1.2.1) 得到 *le2* 基因 RNAi 正义片段, 用 Pst I 和 Xba I 分别对正义片段和 p3301-PFNZ- α' 质粒进行双酶切, 回收酶切后的正义片段和载体的大片段在 T4 连接酶的作用下相连接, 转化大肠杆菌, 获得带有正义链的表达载体 p3301-*le2*RNAiS。同样, 利用 P3 和 P4 引物获得反义片段, 用 BstE II 和 Hind III 对 p3301-*le2*RNAiS 表达载体和反义片段进行酶切, 酶切反义片段与质粒大片段连接获得表达载体 p3301-*le2*RNAi (图 1), 将其转化大肠杆菌, 在含有 *kan* 抗性的 LB 培养基中培养, 挑取单菌落摇菌过夜, 利用质粒提取试剂盒提取所摇菌液中的质粒, 而后用双酶切酶切所提质粒载体 p3301-*le2*RNAi, 琼脂糖凝胶电泳进行验证。

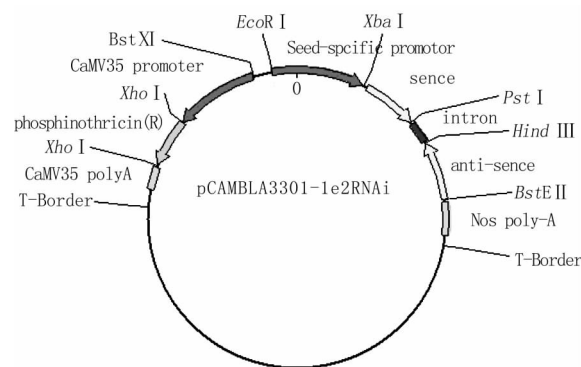


图 1 表达载体 p3301-*le2*RNAi

Fig. 1 Expression vector p3301-*le2*RNAi

1.2.4 大豆遗传转化 通过冻融法^[13] 将植物表达载体 pCAMBLA3301-*le2*RNAi 转化大肠杆菌感受态细胞, 然后将农杆菌单菌落分别接种于含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ *kan* 的 5 mL YEP 液体培养基^[14] 中, 于 28 $^{\circ}$ C、210 r \cdot min⁻¹ 振荡培养过夜。次日, 将其转入 50 mL YEP 液体培养基^[14] 中, 于 28 $^{\circ}$ C、210 r \cdot min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值在 0.6 ~ 1.0 时, 收集菌体, 用 MS 液体培养基^[14] 悬浮, 待用。用解剖刀在前期制备好大豆子叶节外植体的胚轴和子叶节的连接部位轻轻造成划痕, 然后在制备好的农杆菌工程菌液中浸泡 20 min, 转入共培养基中 25 $^{\circ}$ C 暗培养 3 d。而后转入筛选培养基^[14] 中, 在 25 $^{\circ}$ C 光照 16 h/黑暗 8 h 培养, 光照强度为 2 000 lx 的条件下诱导产生丛生芽。每隔 15 d 继代 1 次, 待抗性芽长至 1 ~ 2 cm 时, 将芽切下转到伸长培养基中, 当茎长至 3 ~ 5 cm 时, 转到生根培养基中生根, 待根系发育健全后炼苗移栽。

1.2.5 再生植株 PCR 检测 取转基因植株新鲜叶片 0.1 g, 用 CTAB 法提取大豆全基因组 DNA, 对 35S 启动子进行 PCR 检测, 选取上、下游引物如下:

35S-S 5' GCTCCTACAAATGCCATCATTGC 3'

35S-AS 5' GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC 3'

利用 PCR 反应体系 (25 μ L): 模板 1 μ L、引物各

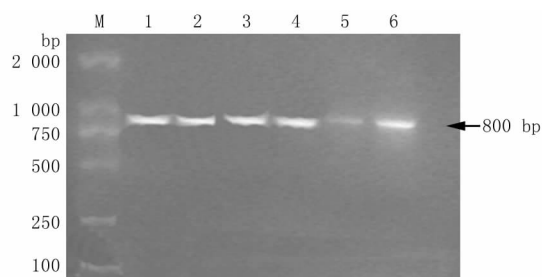
1 μL 、dNTP 0.8 μL 、10 \times PCR buffer 2.5 μL 、 Mg^{2+} 2.5 μL 、Tag DNA polymerase 0.2 μL 、dd H_2O 16 μL 。

PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,反应 40 个循环。将所得 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。

2 结果与分析

2.1 *le2* 基因保守核心序列 PCR 检测及测序比对

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示待检测植株条带与目的条带一致(图 2)。将条带回收经三博远志公司测序,用 DNAMAN 软件与已知 *le2* 基因核酸序列比对,同源率为 99.77%。证明克隆基因片段即为 *le2* 基因保守核心序列。



M: DNAMarker DL-2000; 1~6: *le2* 基因核心序列

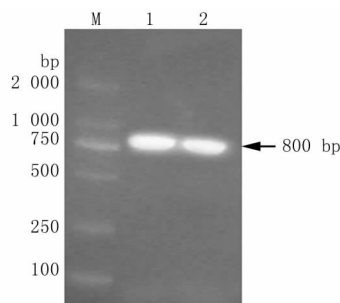
M: DNAMarker DL-2000; 1-6: Core sequence of *le2* gene

图 2 *le2* 核心序列片段 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of *le2* core gene sequence

2.2 *le2* 克隆载体的验证

在含有 *kan* 的 LB 培养基中,未被转化的大肠杆菌 DH5 α 未长菌落,转化后大肠杆菌 DH5 α 长出单菌落,证明克隆载体成功转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒作为模板,PCR 扩增 *le2* 基因片段,电泳检测结果与预期的 800 bp 目的条带相一致(图 3),说明 *le2* 克隆载体连接成功。



M: DNA marker DL-2 000; 1~2 克隆载体 PCR 产物

M: DNA marker DL-2 000; 1-2 PCR product of cloning vector

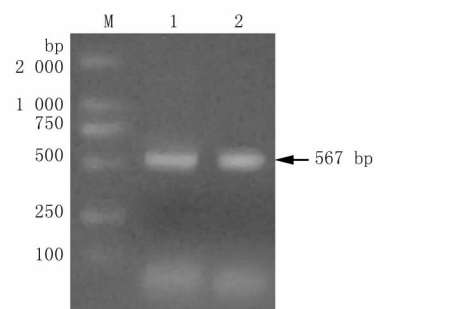
图 3 *le2* 克隆载体的 PCR 验证

Fig. 3 PCR detection of *le2* cloning vector

2.3 *le2* 基因正、反义片段的验证

1% 琼脂糖凝胶电泳初步检测证明正、反义条带大小与预期 567 bp 相一致(图 4),后经测序显示与原序列同源率高达 100%,证明 *le2* 正、反义片段已

成功获得。



M: DNA marker DL-2000; 1. 正义片段; 2. 反义片段

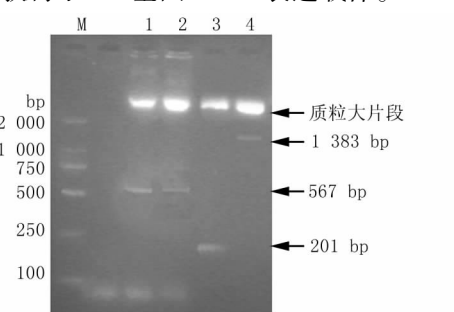
M: DNA marker DL-2000; 1. Sense; 2. Anti-sense

图 4 正、反义片段 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of sense and anti-sense fragment

2.4 *le2* 基因 RNAi 表达载体的酶切验证

如图 5 所示,所切割的片段大小与预期结果相符合,成功获得了 *le2* 基因 RNAi 表达载体。



M: DNA marker DL-2 000; 1: 正义片段; 2: 反义片段;

3: 功能性间隔序列; 4: 种子特异性启动子

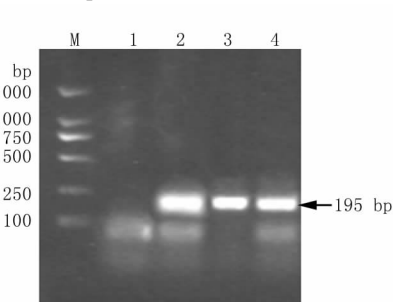
M: DNA marker DL-2 000; 1: Sense; 2: Anti-sense; 3: Intron-SSR; 4: Seed-specific promoter

图 5 *le2* 基因 RNA 干扰表达载体酶切检测

Fig. 5 Restriction enzyme detection of RNAi expression vector of *le2* gene

2.5 转基因植株 PCR 验证

通过农杆菌侵染大豆子叶节法获得转基因 T₁ 代植株 5 株,提取叶片总 DNA 进行 PCR 检测,电泳结果与预期 195 bp 相一致(图 6)。



M: DNA marker DL-2000; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~4: 待检测植株

M: DNA marker DL-2000; 1: Non-transgenic plant; 2: Positive control; 3-4: Transgenic plants

图 6 转基因植株 PCR 检测

Fig. 6 PCR detection of transgenic plants

3 结论与讨论

本研究通过 DNA 体外扩增克隆了 *le2* 基因核酸保守序列,利用亚克隆方法成功构建含有 RNA 干扰片段结构和 *bar* 基因为筛选标记的表达载体 pCambia3301-*le2*RNAi,经农杆菌介导法将载体导入大豆吉农 28 植株,得到 T₁ 代转化植株 5 个,种子 23 粒。

传统育种对大豆的抗营养因子进行改良,通常通过杂交、回交的方式,受到种质资源和年限上的制约,分子育种则可从表型到分子等多个层次进行遗传操作,能够高效、定向地实现大豆的遗传改良^[15],弥补了传统育种的不足。新兴的 RNAi 技术从分子层面上改良品种,已成功应用到水稻^[16]、小麦^[17]、马铃薯^[18]等农作物。本研究成功构建了 *le2* 基因 RNAi 表达载体,经遗传转化,PCR 验证得到阳性植株,试验采用农杆菌介导法转化大豆植株,较花粉管通道法遗传稳定性更高,但其后代的遗传稳定性仍然有待进一步观察;研究采用种子特异性启动子,使得目标基因的表达调控只在特定部位进行,不影响植株其他组织成分含量,这弥补了传统育种使得大豆凝集素含量降低的同时造成植株抗虫性下降的不足;同时,转入植株的目标基因为大豆本身的内源基因,使得转基因大豆的安全性得到保障。

参考文献

- [1] 石慧,张俊红. 大豆抗营养因子的研究进展[J]. 孝感学院学报,2006,26(3):18-21. (Shi H, Zhang J H. Advances in soybean anti-nutritional factors[J]. Journal of Xiaogan University, 2006, 26(3):18-21.)
- [2] 王利民,秦贵信,吴海霞,等. 大豆凝集素的分子结构及其抗营养作用研究进展[J]. 吉林农业科学,2006,31(6):44-47. (Wang L M, Qin G X, Wu H X, et al. Advances of researches on molecular structure and its anti-nutritional effect of soybean agglutinin[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2006, 31(6):44-47.)
- [3] 李德发. 大豆抗营养因子[M]. 北京:中国科学技术出版社,2003:20-23. (Li D F. Soybean anti-nutritional factor[M]. Beijing:China Science and Technology Press, 2003:20-23.)
- [4] Pusztai A, Willam B W, Stewart J C. A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds[J]. Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(5):862-866.
- [5] Etzler M E. Plant lectins; molecular and biological aspects[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1985, 36:209-234.
- [6] van Driessche E. Structure and function of leguminous lectins[J]. Adv Lectin Res, 1988, 1:73-134.

- [7] George M A, Bhide S V, Thengane R J, et al. Identification of low lectin mutants in soybean[J]. Plant Breeding, 2008, 127:150-153.
- [8] 杨明亮,宋雯雯,康明,等. 大豆凝集素含量测定方法的改进与种质资源分析[J]. 大豆科学,2008,27(2):310-314. (Yang M L, Song W W, Kang M, et al. An improved method for determining SBA content and screening for soybean germ plasms[J]. Soybean Science, 2008, 27(2):310-314.)
- [9] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391:806-811.
- [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,2008:10-106. (Ma J. Construction of RNAi expression vector of soybean Lipoygenase gene and studies on the expression and regulation[D]. Changchun:Jilin Agricultural University, 2008:10-106.)
- [11] 付永平. 大豆胰蛋白酶抑制剂基因 RNAi 表达载体的构建及功能评价[D]. 长春:吉林农业大学,2010:89-96. (Fu Y P. Construction of RNAi expression vector of Kunitz trypsin inhibitor gene and function evaluation[D]. Changchun:Jilin Agricultural University, 2010:89-96.)
- [12] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2002:742-744. (Wang G L, Fang H J. Principle and Technology of plant gene engineering[M]. Beijing: Science Press, 2002:742-744.)
- [13] 杨金慧,王丕武,曲静,等. BADH/pepB 双价基因无选择标记表达载体转化苜蓿的初步研究[J]. 中国草地学报,2009,31(4):20-23. (Yang J H, Wang P W, Qu J, et al. Research on transforming BADH and pepB bivalent gene with marker free expression vector into alfalfa[J]. Chinese Journal of Grassland, 2009, 31(4):20-23.)
- [14] 张云月,付永平,王丕武,等. 转 *hvpZpsta* 抗病基因大豆的研究[J]. 西北农林科技大学学报,2011,39(9):87-92. (Zhang Y Y, Fu Y P, Wang P W, et al. Study on transforming *hvpZpsta* gene into soybean[J]. Journal of Northwest A&F University, 2011, 39(9):87-92.)
- [15] 邱丽娟,王昌陵,周国安,等. 大豆分子育种研究进展[J]. 中国农业科学,2007,40(11):2418-2436. (Qiu L J, Wang C L, Zhou G A, et al. Soybean molecular breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11):2418-2436.)
- [16] 李加瑞,赵伟,李全梓,等. *Waxy* 基因的 RNA 沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降[J]. 遗传学报,2005,32(8):846-854. (Li J R, Zhao W, Li Q X, et al. RNA silencing of *waxy* gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat[J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(8):846-854.)
- [17] Pinto Y M, Kok R A, Baulcombe D C. Resistance to rice yellow-mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17:702-707.
- [18] 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.)