

# 大豆生长素响应因子 *GmARF16* 器官表达特征及抗降解表达载体的构建

李小平, 曾庆发, 赵娟

(淮北师范大学 生命科学院/安徽省资源植物重点实验室, 安徽 淮北 235000)

**摘要:**通过挖掘大豆基因组信息并参考拟南芥同源基因序列, 分析了大豆 (*Glycine max*) 的生长素响应因子 *GmARF16* 和 *Gm-miR160* 作用位点, 设计出 *mGmARF16* 序列并成功构建了 *pGmARF16::mGmARF16* 二元表达载体。此外, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析了 *GmARF16* 表达模式, 发现该基因在大豆根、茎、叶、花、果荚和种子中均有一定的表达, 其中花中表达最强, 茎中表达最弱; 复叶中表达量高于子叶和第一对真叶。

**关键词:**生长素响应因子; 构建; MicroRNA; 表达分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0661

## Expression Pattern of *GmARF16* in Different Soybean Organs and Construction of Resistant Version Vector for *GmARF16*

LI Xiao-ping, ZEN Qing-fa, ZHAO Juan

(College of Life Sciences, Huaibei Normal University/Anhui Plant Resource Key Lab, Huaibei, 235000, China)

**Abstract:** By mining soybean and *Arabidopsis* genome data, we analyzed the interaction between auxin response factor *GmARF16* and *Gm-miR160*, a kind of the microRNA and generated resistant version fragment *mGmARF16*. To looking for function of *GmARF16*, a binary vector *pGmARF16::mGmARF16* was constructed using *mGmARF16* through Topo cloning and LR reaction. Moreover, real-time quantity PCR was used to investigate expression pattern of *GmARF16* throughout the life span of soybean. *GmARF16* was found to be expressed at high levels in flowers and at low levels in stem. Interestingly, its transcriptional level was found higher in trifoliolate than either in cotyledons or in unifoliolate.

**Key words:** Auxin response factors; Construction; MicroRNA; Expression analysis

植物体内生长素合成部位和功能部位是不完全重合的, 其功能的发挥需要长和/或短距离的极性运输<sup>[1-2]</sup>。当生长素运输到功能部位, 还需通过一系列细胞信号转导事件来完成其生理调控。生长素受体 TIR1、Aux/IAA 转录因子、生长素响应因子 (ARFs) 和具有生长素响应元件 (AuxREs, TGTC-NC) 的下游靶基因等是组成生长素细胞信号转导的主要组分<sup>[3]</sup>。当生长素含量很低时, Aux/IAA 蛋白与 ARFs 结合, 阻遏了下游靶基因的转录; 当生长素的含量增多时, 生长素就会起到分子胶的作用, 使 Aux/IAA 蛋白与 TIR1 结合在一起, 形成 SCF<sup>TIR1</sup>-生长素-Aux/IAA 复合体; 之后 Aux/IAA 蛋白被降解, 促使 ARFs 脱离 Aux/IAA 的抑制并与下游 AuxRE 结合, 从而完成生长素的信号转导进程<sup>[4-8]</sup>。

ARFs 除了受 Aux/IAA 蛋白的调节外, 还受到转录后水平的调控即 miRNA 基因的调控。MicroRNAs (miRNA) 是一些基因转录后调控的主要作用方式, 主要通过负调控来抑制靶基因表达, 即在转录后水平上介导靶基因 mRNA 的裂解或抑制翻译来

调节植物基因的表达<sup>[9]</sup>。拟南芥基因组中有 3 个 *miR160* 基因 (*At-MIR160a, b, c*), 它们的靶基因有 3 个, 分别为: *AtARF10*, *AtARF16* 和 *AtARF17*。*miR160* 对 *ARF10* 和 *ARF16* 的调控参与根冠的形成和发育<sup>[10]</sup>。表达 *mARF10* (Resistant version) 和 *mARF16* 的植株, 其种子萌发、叶片发育和生殖生长都受到一定程度的影响<sup>[11]</sup>。表达 *mARF17* 的植株可增加其 mRNA 水平, 改变可受生长素诱导的 *YDK1/GH 3.2*、*GH 3.3*、*GH 3.5* 和 *DFL 1/GH 3.6* 的水平, *mARF17* 转基因植株的幼苗呈现较少的侧根<sup>[12]</sup>。

大豆基因组具有 6 个 *Gm-miR 160* 基因 (*Gm-MIR160a~f*), 它们编码的小 RNA 可以识别并调控 12 个靶基因的转录活性。*GmARF16* 基因 (*Glyma 13g 20370.1*, 以下统一称为 *GmARF16*) 是 *Gm-miR 160* 的靶基因。为了进一步研究该基因功能, 现对该基因的时空表达模式进行了分析, 并构建了抑制靶基因降解的植物二元载体, 以期为基础。

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 国家自然科学基金 (30970245)。

第一作者简介: 李小平 (1972-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 1244232074@qq.com。

通讯作者: 赵娟 (1978-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: 1540912306@qq.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种 *E. coli* DH5a; 农杆菌 LB4404; 植物表达载体 pGWB433-M1, 由本实验室提供。

1.1.2 试剂与酶 一般 PCR 试剂和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; DNA 标准分子量购自全式金公司; 长片段高保真 KOD 酶购自上海东洋坊公司; TA-Topo cloning 和 LR 重组反应试剂盒购自 Invitrogen 公司; Real-time PCR 试剂盒购自 BIO-RAD。高纯质粒小量提取试剂盒, 购自威格拉斯生物技术公司, 其他试剂均为上海生工产品。

1.1.3 培养基 大肠杆菌培养: LB 培养基; 农杆菌培养: YEP 培养基。

1.1.4 引物 根据 <http://diana.imis.athena-innovation.gr/> 提供 *GmARF16* 序列并结合 NCBI 数据库相应 EST, 利用 Oligo6.0 设计 4 个引物 F1, R1, mF2 和 mR2。序列标有下划线的为 *Gm-miR160* 靶序列。F1 引物中 CACC 是用于 Topo 克隆。

F1: 5'-caccCTGTAACCTGCTGAGGCCAG-3'

R1: 5'-TTCAATGCAAGATTAAATTGTAATAGCAAATA-3'

mF2: 5'-GCTGGTGGTATGCAGGGA~~GcCcGGCATGCTCATTATG~~GT-3'

mR2: 5'-TCATGCCG~~GgCtCCCTGCATaCCACCGCAGGAGTACTT~~-3'

### 1.2 方法

1.2.1 克隆和测序 按照 Invitrogen 公司的 Topo cloning 方法进行, 切胶回收相应片段与 Topo 载体按 3:1 混合 (10  $\mu$ L), 用拓扑异构酶在 22 $^{\circ}$ C 反应 5~10 min, 取反应产物 1~2  $\mu$ L (pCR2.1-mGmARF16) 用电击转化法转化感受态细胞 *E. coli* DH5a (Bio-Rad, 2.5  $\text{kV} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ )。转化得到的阳性克隆 (卡那霉素抗性, Kan<sup>R</sup>), 经 PCR 和酶切鉴定后, 送上海生工测序, 测序正确的克隆用于下游 LR 反应。

1.2.2 LR 反应 按照 Gateway<sup>®</sup> LR 重组 (Invitrogen) 方法进行, 具体如下: 1~5  $\mu$ L (100 ng) pCR2.1-mGmARF16, 1  $\mu$ L (100 ng) 目标载体 pGWB433-M1, 2  $\mu$ L LR 反应缓冲液, 2  $\mu$ L LR 重组酶, 用 TE (pH 8.0) 调整体积达 10  $\mu$ L, 室温反应 1 h (20~23 $^{\circ}$ C)。取反应产物 1~2  $\mu$ L (pGmARF16::mGmARF16) 用电击转化法转化大肠杆菌感受态细胞 DH5a (Bio-Rad, 2.5  $\text{kV} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ )。转化后的大肠杆菌重悬于 1 mL LB 培养基中, 以 37 $^{\circ}$ C/100  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 1

h, 然后取 50~100  $\mu$ L 涂在具有卡那霉素和潮霉素 (Hyg<sup>R</sup>) 双抗 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 h。挑选已分散开的单克隆, 经 PCR 和酶切鉴定稳定表达的阳性克隆, 用于农杆菌的转化。

1.2.3 农杆菌转化 取鉴定成功的质粒 1~2  $\mu$ L (pGmARF16::mGmARF16) 用电击转化法转化农杆菌感受态细胞 LB 4404 (Bio-Rad, 2.5  $\text{kV} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ )。转化的农杆菌重悬于 1 mL YEP 培养基中, 以 28 $^{\circ}$ C/200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 2~3 h, 然后取 50~100  $\mu$ L 涂在具有卡那霉素和潮霉素 (Hyg<sup>R</sup>) 双抗 YEP 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~3 d。挑选已分散开的单克隆, 经菌裂解 PCR 鉴定稳定表达的阳性克隆, 用于大豆子叶节转化。

1.2.4 荧光定量 PCR RNA 提取和反转录按文献<sup>[12]</sup>进行, 反转录产物通过 Bio-rad 定量 PCR 仪 (MiniOpticon<sup>™</sup>) 进行定量。定量引物为 qF1 (5'-CTTGCTTTTATGTATTCACCT-3') 和 qR1 (5'-TTCAATGCAAGATTAAATTGTA-3'), 扩增片段大小为 180 bp 左右, 引物扩增片段对应 *GmARF16* 3'UTR 部分, 是对应该基因的特定序列。内标用大豆 ACT2/7 基因。引物序列分别为 5'-CTTCCCTCAGCACCTTCAA-3' 和 5'-GGTCCAGCTTTCACACTCCAT-3', 扩增片段大小为 119 bp。定量 PCR 所用的材料分别为: 营养生长期 (VE), 完全破土的子叶; 营养生长期 (VC), 完全展开的对称第一对真叶; 营养生长期 (VC), 小苗的全根; 营养生长期 (VC), 小苗的全茎; 营养生长期 (V1), 最先出现的完全展开第一复叶; 营养生长期 (V2), 完全展开的第二复叶; 营养生长期 (V3), 完全展开的第三复叶; 生殖生长期 (R1), 首次开放的花; 生殖生长期 (R3), 最顶端长度 5 mm 左右的幼嫩果荚; 生殖生长期 (R5), 主茎顶端果荚中 3 mm 长的大豆种子。

1.2.5 序列分析 GmARF16 与 AtARF16 的蛋白质序列比对是用 CUSTAL 在线分析 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)。GmARF16 的结构预测是基于 NCBI BLAST 的在线分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GmARF16 结构分析

大豆 GmARF16 与 AtARF16 序列相似程度较高 (图 1 和图 2), 具有与 DNA 结合, 激活或抑制靶基因的转录结构域 (B3\_DNA)、生长素响应转录因子保守结构域 (AUXIN\_RESP) 和生长素快速诱导转录结构域 (AUX\_IAA)。这种结构上类似暗示它们将在生长素信号转导中发挥相似的功能。

AtARF16	MINVNMFMKG--GTEKGLDPQLWHACAGGMVMPMNSKVYFFPQGHAENAYDCVDGFNGL	58
GmARF16	MITFMDTKEKLKEVERCLDPLQWACAGGMVQMPTVTNKVVYFFPQGHAEHACGPFVNFKTC	60
	*.:.*.: : .*: *****:*.:*.:*****:*. *.: *	
AtARF16	F-IPPMVLRCRVLAIKYMADAESDEVFAKLRLIPLKDDEYVDHEYGDGEDSNGFESNSEKT	117
GmARF16	KVPFPFVPCRVVAVKYMADEFETDEVYAKLKLVLPLNAN-DVDYDH----DVIGAETR-DKP	114
	*.:*.:* ****:*.:*****:*.:*****: : *.:** : * *.:*.:*	
	B3_DNA	
AtARF16	PSFAKTLTQSDANNGGGFSVPFYCAETIFPRLDYNAPFPVQTILAKDVHGDVVKFRHIYR	177
GmARF16	ASFAKTLTQSDANNGGGFSVPFYCAETIFPRLDYSADPPVQNILAKDVHGETWKFRHIYR	174
	.*****:*****:*.:*****:*****:*****:	
	B3_DNA	
AtARF16	GTPRRHLLTTGWSNFVNQKKLVAGDSIVFMRAENGDLVCVGIRRAKRGGIGNGFEYSAGWN	237
GmARF16	GTPRRHLLTTGWSTFVNHHKLAVAGDSIVFLRAENGDLVCVGIRRAKKG-IGGGLTSSGWN	233
	*****:*.:*****:*.:*****:*****:*****:*****:	
	AUXIN_RESP	
AtARF16	PIGG-----SCGYSSLREDESNSLRNSCNSLAD-----RKGVTAESVIEAATLAISG	286
GmARF16	PAGGNFMPYPYSGFSFPLREDNRILLRNNGNSNLNPVSMMGKGKVRPEAI IEAANLAANK	293
	* ** .*:.*.:*****:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.	
	AUXIN_RESP	
AtARF16	RPFEVYYYPRASTSEFCVKALDARAAMRIPWCSGMRFKMAFETEDSSRISWFMTGSVAVN	346
GmARF16	KPFEVYYYPRASTEFCVKASLVEAAMQTRWYSGIRFKMAFETEDSSRISWFMTGISVQ	353
	:*****:***** ..*.:* *:*****:*****:*****:*****:*****:	
	AUXIN_RESP	
AtARF16	VSDPIRWPNFSPWRLLQVAWDEPDLLQNVKRVNFWLVELVSNVHPILTSFSPPRRKKMLRP	406
GmARF16	VADPLNWPNFSPWRLLQVTWDEPDLLQNVRRVSWLVELVSNMFAIHFSFSPPRKKMLRP	413
	*.:*.:*****:*****:*****:*****:*. *.:*.:*****:***	
AtARF16	QHPDYNNLINSIFVPSFSPNPLIR--SSPLSSVLDNVFVGLQGARGNAHQYYGLSSSDLH	464
GmARF16	QHPDFP-LDGQIPLPTLPNNLLGPNNNTNQFGCLLESTPAGMQGARH---AHYGLSLSDLH	469
	****: * ..*:.*.:* * ..:..:~*.:***** :**** *	
AtARF16	HYYLNRPFFFFFFSSSLQLSPLSLGRNIDTKNEKGFCFLTGMTTPCNDTKSKKSHIVLF GK	524
GmARF16	LSKLQSGLSAGFPFLDHAATP-MKVSNNRHCK--SLASICPSSSVDTLSP-----	517
	*: ... ..*:.: : : : : : : * : : : : . . * *	
AtARF16	LILPEEQ LSEKGSTDTANIEKTQISSG-GSNQNGVAGREFSSSDEGPSCKKHVDASG-L	582
GmARF16	-----VLTRNCSTDGNVNKVNTNFDGFGSALHQQLHEHSSCERFQWCKDNHQEIEANM	571
	*.: : *** : : : . * * * : . :*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.	
	AUX_IAA	
AtARF16	ETGHCKVFMESEDVGRITLDSLVLGSYEELSRKLSDMFGIKKSEM LSSVLYRDASGAIKYA	642
GmARF16	ETGHCKVFMESEDVGRITMDSLRSYDELHRKLADMFGIEKSEM LSRVLYCDSVGAIKHI	631
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
	AUX_IAA	
AtARF16	GNPFSEFLKTARRLTILTQGSSESVV 670	
GmARF16	GDEPFSDFTRTAKRLTILMDSGSNNVG 659	
	*.:*****: *.:***** :*.:* * *	

图 1 大豆和拟南芥 ARF16 序列比较

**Fig. 1** Sequences alignment for ARF16 in *Arabidopsis* and *Glycine max*



图 2 GmARF16 结构分析

**Fig. 2 Predicted protein structure for GmARF16**

## 2.2 *mGmARF16* 的扩增

由于大豆染色体为古多倍体 (Palaeopolyploid), 基因组较大, 基因结构和基因组成与拟南芥和水稻有一定的区别, 所以用基因缺失突变方式研究大豆 *GmARF16* 的功能较为困难。而通过修饰 *Gma-mirR160* 的配对位点, 构建 *mGmARF16* 转基因植株, 可以从获得性功能角度来研究 *GmARF16* 的功能。

人工修饰靶基因的识别位点可以抑制靶基因 mRNA 的降解 (Resistant version), 由于改变突变位点, 所以在基因前面加上小写字母 m, 如 *mAtARF10*, 表示 *AtARF10* 的靶位点已被修饰。在拟南芥中, *mAtARF10* 和 *mAtARF16* 转基因植物呈现出营养生长和生殖生长的缺陷<sup>[11]</sup>, 表明维持正常的靶基因的 mRNA 水平对植物生长发育的重要性。

大豆 *GmARF16* 的基因长为 6 870 bp, 包括 5'端和 3'非翻译区, CDS 长度为 1 980 bp, *Gma-miR160* 识别位点在 *GmARF16* 的 CDS 区(图 3), *GmARF16* 与 *Gma-miR160* 识别区只有一对碱基不配对。构建 *pGmARF16::mGmARF16* 双元表达载体, 首先需要获得 *mGmARF16* 模板。根据遗传密码子的简并性, 把不配对碱基对数提高到 4 对, 但保持编码蛋白质序列不发生改变(图 3)。结合 *GmARF16* 基因组序列, 设计了 2 对引物(图 4), 在引物 mF2, mR2 中引入不配对的碱基, 然后通过重叠 PCR 方法获得 *mGmARF16*。用通过 CTAB 法获得大豆(科丰 34)基因组为模板, 加入引物 F1、mR2 通过 KOD 酶进行

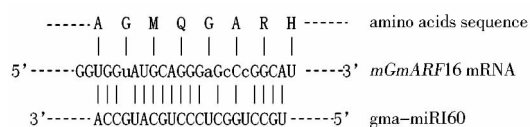


图 3 *mGmARF16* mRNA 与 *Gm-miR160* 配对示意图

Fig. 3 Schematic diagram of matching strategy between *mGmARF16* and *Gm-miR160*

扩增, 切胶回收扩增片段 A(图 5A); 同理, 用 mF2 和 R2 进行扩增, 得到片段 B(图 5B)。混合片段 A 和 B 形成重叠 PCR 模板, 用引物 F1、R1 和 KOD 酶, 进行第三次 PCR (Overlapping PCR), 得到 *mGmARF16*(图 5C)。

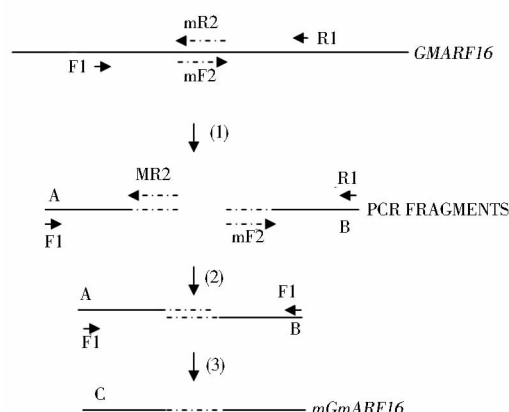
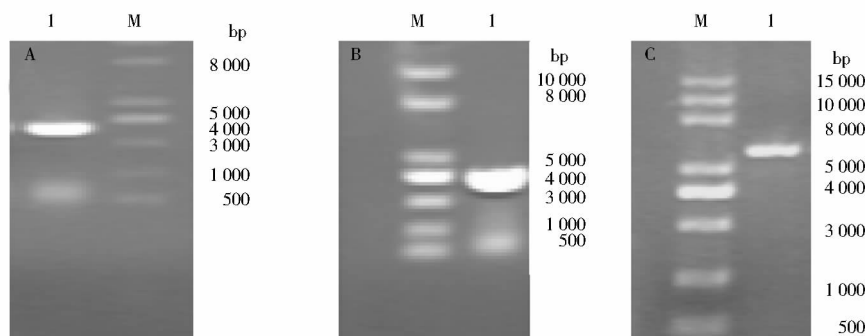


图 4 重叠 PCR 合成 *mGmARF16*

Fig. 4 Synthesis of *mGmARF16* using overlapping PCR



A: 大豆基因组为模板, 引物 F1 + mR2 PCR 产物; B: 大豆基因组为模板, 引物 mF2 + R1 PCR 产物; C: 回收 A 和 B 的产物为模板, 以引物 F1 + R1 PCR 结果。

A: Electrophoresis of PCR products using primers (F1 and mR2) and template (soybean genome); B: Electrophoresis of PCR products using primers (mF2 and R1) and template (soybean genome); C: Electrophoresis of PCR products using primers (F1 and R2) and template (purified fragments from A and B).

图 5 *mGmARF16* 电泳分析

Fig. 5 Electrophoresis analysis of *mGmARF16*

### 2.3 抗降解表达载体 *pGmARF16::mGmARF16* 的构建

由于 *mGmARF16* 序列较长, 内有多数内切酶位点, 直接用酶切连接进行构建比较困难, 所以在引物 F1 的 5'端引入 CACC, 切胶纯化后的 *mGmARF16* 通过 Topo 克隆到 pENTRY 载体上并送上海生工进行测序, 序列完全正确的用于下游重组反应 (LR 反应)。pENTRY 载体和植物双元载体 pGWB433-M1 具有进行重组反应的侧翼序列 (att L 和 att R), 在重

组酶的存在下可以进行体外 LR 反应, 这样就很容易构建表达 *mGmARF16* 的双元载体。为了使 *mGmARF16* 表达时空性与 *GmARF16* 相似, 双元载体 (*pGmARF16::mGmARF16*) 中包括 *GmARF16* 的 5'和 3'端调控序列(图 6)。LR 反应结束后转化大肠杆菌并涂布在具有双抗(卡那霉素和潮霉素, Kan<sup>R</sup>/Hyg<sup>R</sup>) LB 平板上进行培养, 挑选生长健旺的克隆, 提取质粒并酶切鉴定(图 7)。

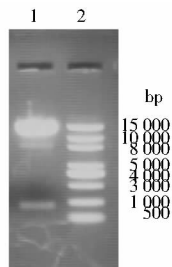


P5'-GmARF16: *GmARF16* 基因的启动子; *mGmARF16*: *GmARF16* 基因的抗降解序列; 3'-GmARF16: *GmARF16* 基因 3' 调控区; 35S: 花椰菜病毒 35S; NPTII: 新霉素磷酸转移酶基因; BAR: 抗除草剂 PPT 基因; LB: 左边界; RB: 右边界。

P5'-GmARF16: Promoter of *GmARF16* gene; *mGmARF16*: Resistant version of *GmARF16*; 3'-GmARF16: 3' UTR; 35S: Cauliflower mosaic virus; NPTII: The neomycin phosphotransferase gene; BAR: Gene providing resistance to the herbicide phosphinothricin (PPT); LB: left border; RB: right border.

图 6 *pGmARF16::mGmARF16* 双元表达载体 T-DNA 结构

Fig. 6 T-DNA structure of *pGmARF16::mGmARF16* binary vector



1: 用限制性内切酶 *HindIII* 酶切双元表达载体的结果;  
2: DNA 分子量标准。

1: Digestion of binary vector *pGmARF16::mGmARF16* with restriction enzyme *HindIII* for 2h at 37°C; 2: DNA marker.

图 7 *pGmARF16::mGmARF16*

双元表达载体的酶切鉴定

Fig. 7 Identification of plant binary vector

*pGmARF16::mGmARF16* with restriction enzyme

## 2.4 转化农杆菌

利用 BIO-RAD 电转仪, 把构建好的表达载体 *pGmARF16::mGmARF16* 导入到农杆菌 LB4404 中, 通过抗性筛选, 挑选具有抗性单克隆进行菌裂解 PCR 鉴定。鉴定正确的克隆直接用于大豆子叶节转化或于 30% 甘油管中 -80°C 保存。

## 2.5 *GmARF16* 器官表达特征

研究 *GmARF16* 功能, 首先需要了解该基因的时空表达模式。因此, 在 *GmARF16* 的 3'UTR 设计 1

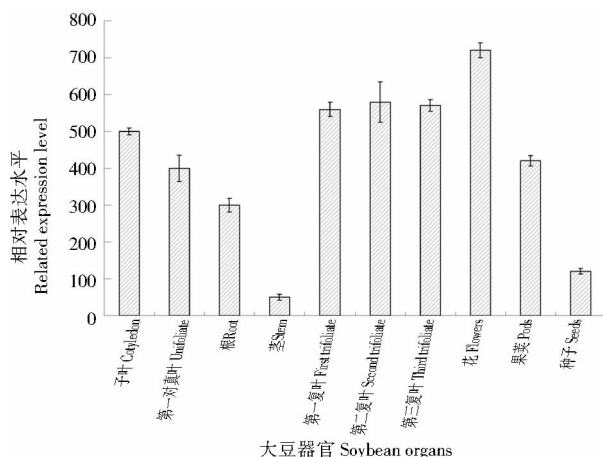


图 8 *GmARF16* 在大豆各器官中的表达

Fig. 8 *GmARF16* expression level in different organs

对引物进行定量 PCR 分析。为了全方位了解研究基因的表达谱, 按大豆生育时期顺序, 从每个时期分别取样, 3 次重复, 液氮快速保存并进行统一提取总 RNA, 初步定量后进行反转录, 用 BIO-RAD 定量 PCR 仪进行定量 PCR。结果显示 *GmARF16* 在大豆不同时期各器官中皆有一定程度的表达, 其中花中表达最强, 而在茎中表达最弱, 复叶中表达量高于真叶和子叶 (图 8)。

## 3 讨论

目前, 科学家已经用鸟枪法对大豆进行全基因组测序<sup>[13]</sup>, 这为反向遗传学方法研究大豆基因功能提供坚实的数据平台。生长素参与大豆多个器官的发育包括根、茎、叶、花和果实生长和发育等一系列过程。研究大豆生长素细胞信号机制为进一步分子遗传育种和基因工程提供重要的参考。本研究分析比较了生长素响应因子 *GmARF16* 和 *AtARF16* 的结构特征 (图 1 和图 2), 研究了 *GmARF16* 和 *Gm-miR160* 相互作用模式 (图 3), 成功构建了抗降解表达双元载体 *pGmARF16::mGmARF16*。

*pGWB433-M1* 骨架具有 3 个细菌抗性基因, 分别为氯霉素、卡那霉素和潮霉素抗性基因, 氯霉素抗性基因是负筛选基因, 可以去除 LR 反应中过剩的 *pGWB433-M1*, 而卡那霉素和潮霉素抗性基因是正筛选基因, 可以去除 LR 反应中过剩的 *Topo* 载体。另外, 为了使下游转基因筛选过程易于操作, 对双元表达载体进行简单改造, 增加除草剂抗性基因标记, 可以对将来转基因大豆进行田间复筛。

*GmARF16* 器官表达分析表明该基因在多个器官中表达, 但表达量在各器官间有较大差异 (图 8)。如果用强组成型表达启动子 (烟草花椰菜病毒, 35S) 来驱动 *mGmARF16* 的表达, *GmARF16* 在某些器官组织中大量积累且抑制其生长, 这样就有可能得不到转基因植株。在筛选拟南芥 35S: *mAtARF16* 转基因植株时, 发现在筛选培养基中出现有少量抗性苗, 移栽到正常培养基或土壤中却不能成活, 而用 *AtARF16* 本身的启动子驱动, 可以得到大量转基因植株, 说明应用 35S 强启动子不适合驱动 *mGmARF16* 的表达。

通过整合 Topo 载体和 LR 反应来构建双元载体 pGmARF16::mGmARF16, 主要是因为 GmARF16 基因组序列较长, 用限制性内切酶酶切连接很难获得目标载体。Topo 载体很方便进行 PCR 片段克隆, 只要在 PCR 正向引物 5' 端引入 CACC 就可以把片段克隆进去。pGWB433-M1 是专门开发出来并用 LR 重组反应来完成双元表达载体的构建, 此外, pGWB 系列载体具有多个表达元件组合, 为载体构建提供多种选择。

随着对大豆研究的深入进行, 大豆的遗传转化效率有了显著提供, 如子叶节法转化大豆最高可以达到 10% 左右, 这为大豆的基因工程改良提供又一重要平台<sup>[14-15]</sup>。目前, 我们已通过农杆菌介导的子叶节法将该构建转化大豆, 获得了抗卡那霉素的再生绿苗, 进一步的试验正在进行之中。

## 参考文献

- [1] Leyser O. Dynamic integration of auxin transport and signaling[J]. Current Biology, 2006, 16:424-433.
- [2] Dharmasiri N, Estelle M. Auxin signaling and regulated protein degradation[J]. Trends Plant Science, 2004, 9:302-308.
- [3] Tiwari S B, Wang X J, Hagen G, et al. Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin[J]. Plant Cell, 2001, 13:2809-2822.
- [4] Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435(7041):446-451.
- [5] Yang X Q, Lee S, So J H, et al. The IAA1 protein encoded by AXRS and is substrate of SCFTR1[J]. Plant Journal, 2004, 40:772-782.
- [6] Liacum E, Reed J W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(3-4):387-400.
- [7] Tan X, Caideron-Villalobos L I, Sharon M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase[J]. Nature, 2007, 446:640-645.
- [8] Reed J W. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Science, 2001, 6:420-425.
- [9] Nodine M D, Bartel D P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis[J]. Genes & Development, 2010, 24(23):2678-2692.
- [10] Wang J W, Wang L J, Man Y B, et al. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2005, 17:2204-2216.
- [11] Liu P P, Montgomery T A, Fahlgren, et al. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages[J]. Plant Journal, 2007, 52(1):133-146.
- [12] Mallory A C, Barrel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes[J]. Plant Cell, 2005, 17:1360-1375.
- [13] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463:178-183.
- [14] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136:167-179.
- [15] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Plant Cell Report, 2006, 25:206-213.
- [16] Letunic I, Copley R R, Pils B, et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34:257-260.
- [17] Yang S H, Zhang X H, Yue J X, et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(3):187-198.
- [18] 郭安源, 朱其惠, 陈新, 等. GSDS: 基因结构显示系统[J]. 遗传, 2007, 29(8):1023-1026. (Guo A Y, Zhu Q H, Chen X, et al. GSDS: a gene structure display server [J]. Hereditas, 2007, 29(8):1023-1026.)
- [19] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传, 2003, 25(3):317-321. (Liu R H, Meng J L. MapDraw: a microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data[J]. Hereditas, 2003, 25(3):317-321.)
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [21] Jiang M F, Li S W, Chen M, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor from upland cotton[J]. Journal of Plant Biology, 2009, 52(5):426-432.
- [22] Mukherjee K, Brocchieri L, Burglin T R. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(12):2775-2794.
- [23] Hay A, Tsiantis M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity [J]. Development, 2010, 137(19):3153-3165.
- [24] Blanc G, Barakat A, Guyot R, et al. Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome[J]. Plant Cell, 2000, 12(7):1093-1101.
- [25] Wang X Y, Shi X L, Hao B L, et al. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: implications for diploidization[J]. New Phytologist, 2005, 165(3):937-946.
- [26] Schlueter J A, Dixon P, Granger C, et al. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species [J]. Genome, 2004, 47(5):868-876.
- [27] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463:178-183.
- [28] Severin A J, Cannon S B, Graham M M, et al. Changes in twelve homeologous genomic regions in soybean following three rounds of polyploidy[J]. Plant Cell, 2011, 23(9):3129-3136.
- [29] Zhaxybayeva O, Gogarten J P. Spliceosomal introns: New insights into their evolution[J]. Current Biology, 2003, 13(19):764-766.
- [30] Heeg C, Kruse C, Jost R, et al. Analysis of the *Arabidopsis* O-acetylserine( thiol) lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis[J]. Plant Cell, 2008, 20(1):168-185.

(上接第 660 页)