

大豆 *GmSOT1* 基因克隆、载体构建及初步表达研究

谢璐遥^{1,2}, 李晓琳², 罗利³, 文涛¹, 朱木兰²

(1. 四川农业大学 农学院, 四川 成都 611130; 2. 中国科学院 上海生命科学研究院 植物生理生态研究所/国家植物基因研究中心(上海), 上海 200032; 3. 上海大学 生命科学学院/上海市能源植物育种与应用重点实验室, 上海 200444)

摘要: 磺酰基转移酶(sulphotransferase, 简称SOT)是硫代葡萄糖苷(glucosinolate, 简称硫苷)核心结构合成途径中的关键酶之一。本研究采用反向遗传学方法从大豆基因组中克隆 *GmSOT1* 基因并对其功能进行初步研究。首先采用PCR方法扩增大豆 *GmSOT1* 基因, 并将其连接到pRNAi载体上的35S(CaMV35S)启动子后面; 将35S:*GmSOT1* 基因片段从pRNAi载体上双酶切下来, 连接到植物双元表达载体pCambia2301的多克隆位点上, 且命名为pCambia2301-35S:*GmSOT1*; 采用根瘤农杆菌介导的遗传转化方法转化大豆成熟胚, 并考察其初步表达结果。结果表明: 大豆 *GmSOT1* 基因的编码区(coding sequences, 简称CDS)由1 014 bp的核苷酸组成, 编码一个长度为337个氨基酸残基的蛋白质; 35S:*GmSOT1* 被成功导入大豆胚细胞, 初步观察发现 *GmSOT1* 过量表达导致大豆胚根明显膨大弯曲。

关键词: 大豆; 磺酰基转移酶; 硫代葡萄糖苷; 基因克隆; 载体构建

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0815

Cloning, Plant Expression Vector Construction and Preliminary Study of *GmSOT1* Gene from Soybean

XIE Lu-yao^{1,2}, LI Xiao-lin², LUO Li³, WEN Tao¹, ZHU Mu-lan²

(1. Agricultural College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS, National Center for Plant Gene Research (Shanghai), Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Key Lab of Bioenergy Plant, School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: Sulfotransferase (SOT) is one of the most important key enzymes involved in the biosynthesis of the core structure of glucosinolate. Here *GmSOT1* was cloned from the soybean genome using reverse genetics to investigate its preliminary functions. An ORF (open reading frame) DNA of *GmSOT1* was amplified by PCR and ligated into a pRNAi vector under control of the 35S (CaMV35S) promoter. The 35S:*GmSOT1* DNA fragment was excised from the pRNAi vector and ligated into the multiple cloning sites of pCambia2301, named as pCambia2301-35S:*GmSOT1*. The 35S:*GmSOT1* construct was introduced into mature embryo cells of soybean through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. The transformed soybean embryos were used for preliminary phenotype analysis. Our results showed that the cloned *GmSOT1* gene (CDS) consisted of 1 014 bp nucleotide acids and encoded a 337 amino-acid protein. The construct of 35S:*GmSOT1* was successfully introduced into soybean embryo cells. The transformed radicles appear enlarged and curved. The results provide a new cue to further study on the function of *GmSOT1*.

Key words: Soybean; Sulfotransferase (SOT); Glucosinolate; Gene cloning; Vector construction

硫代葡萄糖苷(Glucosinolate, 简称硫苷)是一种存在于十字花科植物中含硫和氮的次生物质, 其水解产物具有抑制细菌、真菌增殖和抗虫等功能^[1-6]。当植物受到病虫侵袭时, 芥子酶与其底物硫苷结合, 释放有毒的水解产物形成植物重要的化学防御系统^[7-8]。磺酰基转移酶(sulphotransferase, SOT)广泛存在于动植物体中, SOT催化硫酸基团从3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate, PAPS)上转移给各种受体分子上, 是硫苷核心结构合成途径的一种关键酶^[1, 9-10]。

20世纪90年代初, 黄酮醇3-4'-磺酰基转移酶(flavonol 3-and 4'-SOTs)的cDNA全长从菊属植物

Flaveria chloraefolia 中首先克隆出来^[1, 11], 芸苔属(*Brassica*)、补血草属(*Limonium*)、含羞草属(*Mimosa*)等物种的SOT基因也被相继克隆^[1, 12]。随着基因组科学的快速发展, 多种植物基因组DNA序列被解析, 应用生物信息学方法(如同源序列比对)发掘植物基因组中磺酰基转移酶基因家族成员成为可能。自从第一次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆出了SOT基因(RaR047, At2g03760)后, 迄今为止科学家们已在该物种中发现了18种SOT基因^[1-2]。通过同源序列比对, 在大豆基因组中发现了SOT同源基因, 且在大豆固氮根瘤中特异表达。大豆和根瘤菌所形成的共生固氮体系, 使大豆成为

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863计划”(2013AA102704)。

第一作者简介: 谢璐遥(1989-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆基因克隆、载体构建和遗传转化研究。E-mail: shieluyau@yeah.net。

通讯作者: 朱木兰(1968-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: mlzhu@sibs.ac.cn。

具有天然固氮能力的植物^[13]。因此,增加大豆根系中磺酰基转移酶的表达量有可能改良其抗病性和共生结瘤固氮属性。然而,有关大豆磺酰基转移酶基因(*GmSOT*)功能的研究鲜有报道。为此,本研究从大豆基因组中克隆 *GmSOT*,构建其过表达载体,旨在初步考察其在大豆组织器官中过量表达的效果,为该基因的生物学功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为大豆 k06-82;质粒为 pRNAi 载体、pCambia2301 双元载体;菌株为大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 EHA105。

主要试剂有:Prime Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、TransZol Plant 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)、Gel Extraction System 试剂盒(北京博大泰克生物技术公司);限制性内切酶(上海皓嘉科技发展有限公司)、T-easy 载体、T4 连接酶和 PCR 试剂盒(大连宝生物公司);100 bp、1 kb ladder plus marker(上海生物工程有限公司);KOD plus NEO 高保真聚合酶(东洋纺生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 *GmSOT1* 的生物信息学分析 通过同源序列比对,找到了大豆中与 *AtSOT* 同源的基因序列 Glyma13g26080.1。根据 cDNA 序列,用生物软件 Primer 5.0 设计 *GmSOT1* 的 CDS 序列扩增引物。引物序列分别为:*GmSOT1*mRNA-F: AATCAGCACGC-CAACCACTA; *GmSOT1*mRNA-R: CAACTTGCGATC-CTGTTGATTC。

1.2.2 总 RNA 的提取和逆转录 用 Trozol 试剂盒(北京全式金生物公司)提取总 RNA。取大豆根系组织,液氮研磨,每 100 mg 组织加入 1 mL TPI 溶液。经过涡旋后 12 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 5 min。吸取上清分至 2 个 1.5 mL RNAase-free 离心管中。向上清液里加入等体积的 TPII 溶液,颠倒混匀并加入 1/4 上清体积的氯仿,再次颠倒混匀,室温孵育 5 min。12 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 5 min,吸取上清无色层溶液置于新的 1.5 mL RNAase-free 离心管中。加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温孵育 10 min。12 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 10 min,弃上清,并加入 1 mL 75% 乙醇。剧烈漩涡后 10 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 5 min,弃上清,室温晾干沉淀。加入 30 μ L RNA 溶解液溶解沉淀, -70℃ 长期保存。

用 Prime Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录合成 cDNA。基因组 DNA 的除去反应:向

1.5 mL 离心管里加入依次 2 μ L 5 \times gDNA Eraser Buffer, 1 μ L gDNA Eraser, 1 μ g RNA, 加至 10 μ L RNase Free dH₂O, 42℃ 2 min。冰上进行反转录反应:依次向反应管中加入 2 μ L 45 \times PrimerScript Buffer, 1 μ L PrimerScript RT Enzyme Mix I, 1 μ L RT Primer Mix, 加入 10 μ L 上述去除反应液,加至 20 μ L RNase Free dH₂O。37℃、15 min, 85℃、5 s, -20℃ 保存。

1.2.3 基因的克隆 以 cDNA 为模板,用东洋纺的 KOD plus NEO 高保真聚合酶,通过 PCR 获得 *GmSOT1* 的 cDNA 片段产物,PCR 反应的条件:94℃ 变性 15 s; 55℃ 退火 30 s; 68℃ 延伸 1 min; 30 个循环。利用 TA 克隆载体,将其连到 T-easy 载体上。

1.2.4 *GmSOT1* 基因过量表达载体的构建 将 T-easy-*GmSOT1* 从超低温冰箱中取出用提取质粒 DNA 和载体 pRNAi 质粒 DNA。用生物软件 Primer 5.0 设计 *GmSOT1* 引物 primer1: CGCGGCGCGCCAAT-CAGCACGCCAACCCTA 和 primer2: CGGGATCCT-CAACTTGCGATCCTGTTGATTC 以上面得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增得到含有 *Asc* I 和 *Bam* H I 识别位点的全长 cDNA 片段,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,用 Gel 试剂盒回收目的片段。用限制性内切酶 *Asc* I 和 *Bam* H I 在 37℃ 条件下对目的片段和 pRNAi 载体进行双酶切。使用 Gel 试剂盒回收 *GmSOT1* 和 pRNAi 质粒片段。用 T4 连接酶将 *GmSOT1* 连接到 pRNAi 载体上,将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过菌落 PCR 及酶切验证得到 pRNAi-*GmSOT1* 的阳性克隆。再用限制性内切酶 *Pst* I 单酶切质粒 pRNAi-*GmSOT1* 和 pCambia2301 质粒 DNA,用 Gel 试剂盒凝胶回收目的片段。用 T4 连接酶将基因片段连接到双元表达载体 pCambia2301 上。将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在 LB 平板上筛选卡那霉素抗性的菌落,挑取单克隆进行 PCR 鉴定,阳性克隆进行酶切鉴定和测序以确定 *GmSOT1* 基因片段是否插入目标位置。提取阳性菌落中的质粒,转入农杆菌 (*Agrobacterium*) EHA105 感受态细胞用于进行大豆基因转化操作。

1.2.5 大豆遗传转化及初步表达 构建好的植物表达载体转入农杆菌 EHA105 感受态细胞,用 25 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素在 YEP 培养基上筛选。挑取单克隆进行 PCR 鉴定。将阳性单菌落接入含有 25 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 YEP 液体培养基中,28℃、200 r·min⁻¹ 震荡培养直到 OD₆₀₀ = 1.0。在 4℃、4 500 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min,去掉上清液,用 MSB5 液体培养基

(MSB5 + 3 mg · L⁻¹ 6-BA + 200 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮, pH5.4) 重悬备用。

选用成熟、粒大、饱满的 K06-82 大豆种子, 用 75% 酒精、0.1% 升汞和 10% NaClO 对大豆种子表面进行消毒。剥出大豆胚尖在 MSB5 培养基 (MSB5 + 3 mg · L⁻¹ 6-BA) 上预培养 2 d 后, 在农杆菌重悬液中 28℃ 温度下浸染 30 min。将浸染后的胚尖转入 MSB5 固体培养基 (MSB5 + 3 mg · L⁻¹ 6-BA + 200 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮, pH5.4) 暗中共培养 2 d 后, 观察表型。



图1 *GmSOT1* 与 3 个拟南芥 SOT 基因蛋白质序列的比对分析

Fig.1 Sequences alignment of *GmSOT1* and three SOT proteins of *Arabidopsis*

2.2 *GmSOT1* 基因的克隆

用 Trozol 试剂盒提取鲜嫩的大豆根系组织获得总 RNA (图 2), 并逆转录合成 cDNA, 再将其作为模板, 用 *GmSOT1* 基因编码区特异性引物进行 PCR 扩增得到目的基因片段 (图 3)。将扩增后的基因送交华大基因公司进行测序, 测序结果表明已经获得完

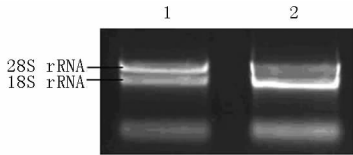


图2 总 RNA 电泳图谱

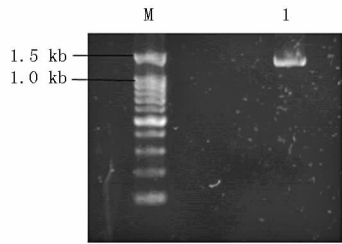
Fig.2 Electrophoresis patterns of total RNA

2 结果与分析

2.1 *GmSOT1* 与拟南芥 SOT 基因同源序列比对

根据生物信息学方法分析, 通过 *GmSOT1* 与 NCBI 数据库中注册的拟南芥 SOT 蛋白质进行同源序列比对分析, 发现 *GmSOT1* 与拟南芥 SOT2A (NP568177. 1)、SOT-like (BAB1159. 1) 和 SOT2B (NP196317. 2) 的序列相似性分别为 53%、53%、52% (图 1)。

整的 *GmSOT1* 基因的 cDNA 序列。 *GmSOT1* 的基因编码区 (coding sequences, 简称 CDS) 全长为 1 014 bp,



M: DNA 分子量标准 (100 bp); 1: *GmSOT1* PCR 产物。

M: DNA marker (100 bp); 1: *GmSOT1* PCR product.

图3 *GmSOT1* PCR 产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis patterns of *GmSOT1* PCR product

编码 337 个氨基酸序列,含有 1 个外显子。

2.3 *GmSOT1* 基因过量表达载体的构建

将 PCR 扩增后的 *GmSOT1* 基因片段用 *Asc* I 和 *Bam*H I 内切酶从 T-easy 载体上切下来连接到 pRNAi 载体的 35S 启动子。将携带 35S 启动子的 *GmSOT1* 基因片段连接到双元载体 pCAMBIA2301 上(图 4)。pCAMBIA2301 双元载体上的 LB 到 RB

区域上含有组成型表达的 *GUS* 基因,筛选基因为卡那霉素(kanamycin),方便转化大豆植株的快速筛选与鉴定。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,并进行 PCR 检测和质粒酶切鉴定(图 5),证明已经获得阳性重组克隆,*GmSOT1* 过量表达载体构建成功。

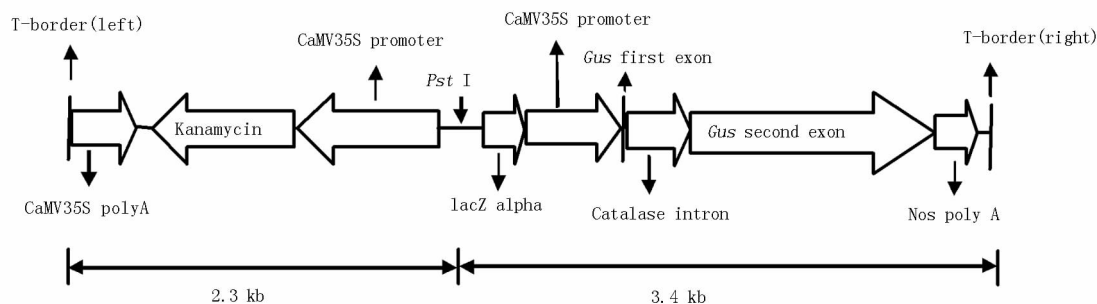
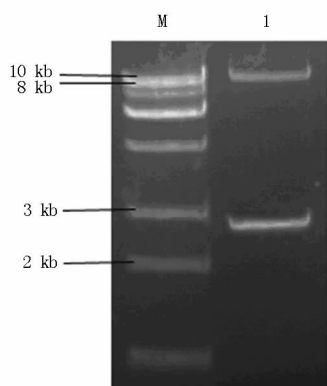


图 4 pCAMBIA2301 载体图

Fig.4 The map of vector pCAMBIA2301

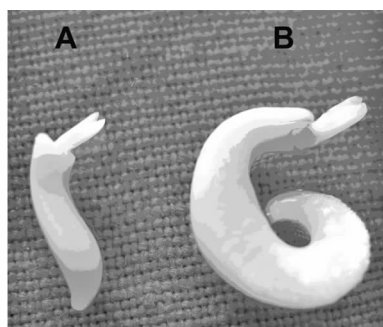


M:DNA 分子量标准(1 kb);1:*Pst* I 酶切(11 621 bp,2 713 bp)。

M:DNA marker(1 kb);1:*Pst* I digestion(11 621 bp,2 713 bp)。

图 5 35S:*GmSOT1* 插入 pCAMBIA2301 酶切鉴定

Fig.5 Enzyme digestion patterns for insertion of 35S:*GmSOT1* fragment into vector pCAMBIA2301



A:空载体对照;B:转化子。

A:Empty Gsensor of soybean;B:Transformant of soybean.

图 6 农杆菌介导大豆遗传转化

Fig.6 Soybean transformation mediated by *Agrobacterium*

2.4 大豆的遗传转化

从图 6 可看出,通过农杆菌介导遗传转化方法将目的基因 *GmSOT1* 转入大豆 K06-82 受体品种共培养后,大豆胚尖外植体的根部(图 6B)比同样条件下空载体转化后的大豆胚根部分(图 6A)膨大且弯曲。

3 讨论

大豆作为重要的经济和粮食作物,为人类提供大量植物蛋白质,也为工业生产提供重要的原材料^[14-16]。自 20 世纪 80 年代大豆首次成功实现外源基因导入以来,通过分子生物学手段快速而高效地改造大豆种质越来越被现代农业所接受^[14],进而使得基因工程成为大豆遗传改良的重要技术平台。目前为止,硫代葡萄糖苷在十字花科植物中的化学合成途径及其抗病虫害功能已得到较为充分的解析^[6-8],本研究结果表明大豆根系中也存在硫苷化合物及其相关产物(数据待发表),这为着力探索大豆根瘤硫苷代谢途径的生物学意义提供了原动力。磺酰基转移酶(SOT)以其重要作用(硫代葡萄糖苷核心结构合成途径中的关键酶)而成为研究的首选目标。本研究第一次在大豆根系中克隆了 *GmSOT1* 基因(图 2,图 3),并完成了 pCAMBIA2301-35S:*GmSOT1* 植物表达载体的构建(图 4,图 5)。

土壤中含有大量的根瘤菌群,大豆根系与其形成根瘤固氮共生体系^[13]。在大豆根系中克隆 *GmSOT1* 基因并对其进行功能研究不仅有望提高大豆抗病虫害的能力,而且有助于深入理解大豆固氮机制,对充分利用大气中氮素、减少农业生产投入有着重要的意义。

遗传转化操作中,以抗生素为主的筛选标记是不可或缺的。通常用于植物遗传转化的抗生素为

卡那霉素、潮霉素和除草剂等^[17]。然而,大豆胚尖对潮霉素和除草剂十分敏感,致使转化效率极为低下,给大豆基因功能的研究造成很大的缺陷或盲区。本研究旨在构建探索 *GmSOT1* 基因的功能,为了获得更多的阳性植株,故而选择致死剂量较大的卡那霉素作为 pCambia2301 植物双元载体上的筛选标记(图 4)。

该植物表达载体通过农杆菌介导遗传转化方法,有效驱动目的基因在大豆根瘤中过量表达(数据待发表)。经过共培养后,在大豆胚根部分观察到该基因转化子比空载体对照明显膨大且弯曲(图 6)。*GmSOT1* 基因在大豆中的深入研究,不仅有助于了解磺酸基转移酶在大豆硫苷合成中的分子机制和生理功能,还有望创制抗病性和固氮能力双增的大豆新种质。

参考文献

- [1] Marion K, Jutta P. The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55: 1809-1820.
- [2] Lacomme C, Roby D. Molecular cloning of a sulphotransferase in *Arabidopsis thaliana* and regulation during development and in response to infection with pathogenic bacteria[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30: 995-1008.
- [3] Marsolais F, Gidda S K, Boyd J, et al. Plant soluble sulphotransferases: Structural and functional similarity with mammalian enzymes [J]. Recent Advances in Phytochemistry, 2000, 34: 433-456.
- [4] Jed W F, Amy T Z, Paul T. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants[J]. Phytochemistry, 2001, 56: 5-51.
- [5] Mithen R. Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity[J]. Plant Growth Regulation, 2001, 34, 91-103.
- [6] Mikkelsen M D, Petersen B L, Olsen C E, et al. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates [J]. Amino Acids, 2002, 22: 279-295.
- [7] 陈新娟, 朱祝军, 钱琼秋, 等. 硫代葡萄糖苷的提取、分离和鉴定[J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 43-47. (Chen X J, Zhu Z J, Qian Q Q, et al. Extraction, separation and identification of glucosinolates [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(3): 43-47.)
- [8] 李晨, 薛峰, 缪文华, 等. 硫代葡萄糖苷降解研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 313-316. (Li C, Xue F, Miao W H, et al. Research progress in the degradation of glucosinolates [J]. Food Science, 2010, 31(9): 313-316.)
- [9] Priscilla P, Jiraporn S, Jian L, et al. Recent advances in sulphotransferase enzyme activity assays [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 403: 1491-1500.
- [10] Melissa R M, Thomas A K, Charles N F. Regulation of the cytosolic sulphotransferases by nuclear receptors [J]. Drug Metabolism Reviews, 2013, 45(1): 15-33.
- [11] Varin L, DeLuca V, Ibrahim R K, et al. Molecular characterization of two plant flavonol sulphotransferases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89: 1286-1290.
- [12] Rivoal J, Hanson A D. Choline-O-Sulphate biosynthesis in plants (identification and partial characterization of a salinityinducible choline sulphotransferase from species of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) [J]. Plant Physiology, 1994, 106: 1187-1193.
- [13] 严君, 韩晓增, 王守宇, 等. 不同形态氮对大豆根瘤生长及固氮的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 674-677. (Yan J, Han X Z, Wang S Y, et al. Effect of different forms nitrogen on nodule growth and nitrogen fixation in soybean [J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 674-677.)
- [14] Mariashibu T S, Anbazhagan V R, Jiang S Y, et al. *In vitro* regeneration and genetic transformation of soybean: Current status and future prospects [J]. Agricultural and Biological Sciences, 2013, 20: 413-446.
- [15] Liu H K, Chao Y, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system [J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.
- [16] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 489-498.
- [17] 侯爱菊, 朱延明, 张晶, 等. 转基因植物中筛选标记基因の利用及消除[J]. 遗传, 2003, 25(4): 466-470. (Hou A J, Zhu Y M, Zhang J, et al. Using of selective marker gene in transgenic plants and its removal [J]. Hereditas, 2003, 25(4): 466-470.)

《种业导刊》

种业学术的交流平台 种业产业的信息媒介
种业企业的展现舞台 种业文化的靓丽风景

《种业导刊》创刊于 1981 年,由河南省农业科学院主管,河南省农业科学院农业经济与信息研究所主办。刊号:ISSN1003-4749, CN41-1392/S。河南省一级期刊。

《种业导刊》立足于宣传农业、宣传种业、宣传企业、宣传品种,竭诚为广大种业界同仁提供最佳、最前瞻的服务和宣传。《种业导刊》集知识性、权威性、前瞻性、实用性于一体,突出市场经济和信息时代的特点,是各级农业行政领导、农业科研与推广人员、农业院校师生、种业经营者和农业生产资料经营者的良师益友。

《种业导刊》主要栏目有政策法规、专家论坛、市场预测、特别关注、种业管理、名企专访、栽培技术、繁育制种与引种、蔬菜园艺、植物保护、问题与探讨、国外农业、工作研究、品种审定等。

《种业导刊》全年 12 期,每月 10 日出版,国内邮发代号:36-119,每期定价 8.00 元,全年 96.00 元,全国各地邮局均可订阅。

敬请赐稿! 欢迎订阅!

地址:郑州市花园路 116 号

河南省农业科学院《种业导刊》编辑部 邮编:450002

电话:0371-87000220 65727121 65719198

QQ:1661317955

邮箱:zydaokan@126.com

网址:种业在线(www.seedsee.com)