

叶酸代谢途径 *folE* 基因表达载体的构建及在大豆中的转化

张原宇,王玉民,于志晶,李海云,张 玲

(吉林省农业科学院 农业生物技术研究所,吉林 长春 130033)

摘要: *folE* 基因是高叶酸调控基因,来源于细菌,已证明在西红柿等植物中,提高了叶酸含量。本试验采用农杆菌介导的大豆子叶节法,将 *folE* 基因在大豆受体材料 Williams82 中表达。共侵染了 200 个外植体,得到 34 株转化苗。通过对转化苗进行除草剂(135 mg·L⁻¹)涂沫鉴定,获得 14 株除草剂抗性转化苗。PCR 检测结果显示其中 12 株为阳性。Southern 杂交结果表明, *folE* 全长 cDNA 已成功插入到大豆基因组中,并得到 2 个单拷贝株系。

关键词: 大豆;叶酸; *folE*; 转基因

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0224

Construction of the Folate Biosynthetic Pathway *folE* Gene and Transformation in Soybean

ZHANG Yuan-yu, WANG Yu-min, YU Zhi-jing, LI Hai-yun, ZHANG Ling

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The *folE* is a key gene of folic acid pathway, which is derived from bacteria. The function of this gene in the improved folate content has been demonstrated in many plants, such as tomato. In this study, we expressed the *folE* by employing the soybean cotyledonary nodes method. We co-cultivated about 200 explants, and got 34 transgenic plants. Stock of Basta (135 mg·L⁻¹) was painted on half the upper surface of tested soybean leaves, and got 14 transgenic plants. PCR analysis showed that 12 of 14 transgenic plants were positive. Southern blot analysis of PCR-positive plants indicated the integration of the *folE* gene into the soybean genome, and we also got two transgenic lines with only one single copy.

Keywords: Soybean; Folate; *folE*; Transgenic

叶酸是一种水溶性 B 族维生素^[1-2],是人类发育过程中最为重要的营养物质之一。世界上大多数国家的人群叶酸摄入量都不理想,叶酸缺乏症会导致婴儿神经管缺陷、癌症和血管疾病等严重的健康问题^[3-4]。人类和动物不能自身合成叶酸,不得不依赖食物作为叶酸的主要来源^[5]。大豆作为一种优质的食物来源,在食品工业中占有重要地位。相对于谷类作物小麦、玉米、水稻等,豆类食品中的叶酸含量相对较高^[6],但是由于贮藏条件和蒸煮方式等因素影响,豆类食品最终供给人体营养的叶酸很少。因此能否通过提高大豆籽粒中叶酸的含量,使人们食用少量的豆类食品就能满足人体所需的叶酸含量,已经引起广大学者的关注。

研究人员已经成功利用基因工程技术,将叶酸合成相关基因在拟南芥、西红柿、水稻、玉米中表达并获得了高叶酸含量的植株^[7-8]。通过对植物叶酸合成基因和酶的充分了解,使叶酸代谢改造成为可能。最为广泛的就是 I 型三磷酸鸟苷环化水解酶(*GTPCHI*)基因和氨基脱氧分支酸合成酶 ADCS 基因。除此之外,来源于细菌的叶酸相关基因 *folE*,也是提高植物叶酸含量的主要手段之一。如 Sybesma

等^[9]在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中过表达 *folE* 基因,使叶酸含量提高了 3 倍。Dfaz 等在西红柿中过量表达了一种来源于哺乳动物的 *folE* 基因,使转基因西红柿中叶酸的含量提高了 2 倍多^[10]。

本研究将人工合成的 *folE* 基因在大豆受体品种中过表达,旨在培育出高叶酸含量的转基因大豆品种,满足特殊人群将大豆作为营养保健品的需求,对增加居民健康水平具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体材料 受体材料为大豆品种 Williams82,由农业生物技术研究所大豆课题提供。

1.1.2 菌种和质粒 大肠杆菌菌株为 *E. coli* DH5 α ,农杆菌菌株为 EHA101,植物表达载体 pTF101-35s,高叶酸调控基因 *folE* 均由农业生物技术研究所大豆课题提供。

1.1.3 试剂与酶 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄-DNA 连接酶等购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 片段回收试剂盒购自康为试剂生物公

收稿日期:2014-04-30
基金项目:国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101106-3);吉林省 2012 年度博士后科研项目(20120010407);转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08004)。
第一作者简介:张原宇(1983-),男,硕士,主要从事大豆转基因生物技术。E-mail: zyy_1983@foxmail.com。
通讯作者:张玲(1981-),女,博士,助理研究员,主要从事植物分子生物学研究。E-mail: zly_jaas@126.com。

司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体构建 根据 NCBI 上大肠杆菌 $folE$ 基因 (GenBank 登录号 AE000304) 序列,按照植物密码子偏爱性人工合成 $folE$ 基因,并分别在 $folE$ 基因上游引入内切酶 $SpeI$ 酶切位点,下游引入内切酶 $SacI$ 酶切位点。把 $folE$ 基因片段进行 $SpeI$ 和 $SacI$ 酶切后连接 pTF101-35s 载体上形成 pTF101-35s- $folE$ 。同时针对 $folE$ 基因,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 分子检测扩增特异性引物如下:
 $folE$ -F: 5'-GTTGTGATGACGCACAGCG-3'; $folE$ -R: 5'-CCATCACTCAGTAAAGAAGCGGC-3'。

1.2.2 农杆菌介导的大豆遗传转化 以农杆菌株 EHA101 为工程菌株,将 pTF101-35s- $folE$ 通过大豆子叶节方法转入受体材料 Willimas82 中。农杆菌介导大豆子叶节转化法基本流程如下:(1) 农杆菌 28℃ 培养 16 h 后收集菌体,转入 YEP 液体培养基中,直至 OD₆₀₀ 值 0.5 ~ 0.7 备用;(2) 选取大豆受体品种 Williams82 成熟种子,氯气灭菌 16 h,灭菌后种子放入 GM 萌发培养基 (培养基配方参照 Olhoft 等^[11]) 弱光萌发 16 h;(3) 切子叶节,从胚轴处将大豆种子一分为二,切时刀尖蘸工程菌液。将切开后的子叶节放入工程菌液中,轻柔晃动 30 min,转入共培养基中,避光培养 (23℃, 3 ~ 5 d);(4) 共培养后,将伸长的胚轴切去约 2/3,保留约 5 mm 的胚轴,插入加筛选剂的 SIM 伸长培养基中,诱导丛生芽生长,培养条件 25℃,光照 16 h·d⁻¹,光照强度 2 000 lx;(5) 在 SIM 培养基中培养 7 d 后,转入 SEM 筛选培养基中,间隔 15 d 继代 1 次,筛选 3 ~ 4 轮,得到分生苗;(6) 将已经伸长的分生苗从外置体上切下,转入生根培养基中生根;(7) 生根健全的转化苗,经炼苗 (3 ~ 5 d) 后移入盆中栽培。

1.2.3 转基因植株的草丁膦抗性检测 转化载体中以草丁膦作为筛选标记,因此在后代可采用草丁膦涂抹叶片的方法快速检测转基因苗。具体方法:

用棉签蘸取适量草丁膦 (135 mg·L⁻¹) 溶液,轻柔擦拭半片叶子,同叶未涂抹的叶子作为对照,在正常光照情况下 3 ~ 5 d 后观察叶片生长情况。

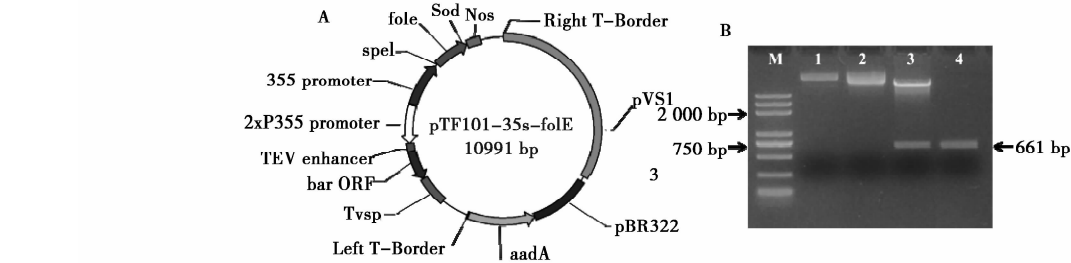
1.2.4 转基因植株的 PCR 检测 利用 $folE$ 基因引物对 T₀ 代转化植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测。使用 CTAB 法提取转化植株及对照 Willimas82 的 DNA。PCR 反应体系 (20 μL): DNA 模板 50 ng, 10 × buffer 2.0 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 1 μL, 10 μmol·L⁻¹ 引物各 0.5 μL, 5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.5 μL, 加 ddH₂O 补至 20 μL。PCR 反应程序: 95℃, 变性 5 min, 94℃, 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,电泳结果利用凝胶成像系统进行拍照和分析。

1.2.5 转基因植株的 Southern 分析 为了检测 $folE$ 基因整合到大豆基因组中的拷贝数,选取再生苗 PCR 检测呈阳性的 10 个单株,进行基因组 DNA 的 Southern blot 分析。Southern blot 分析使用的是 Roche 的地高辛试剂盒 Kit II 型,实验具体流程参照说明书。以克隆到载体上的 $folE$ 基因的全长作为 Southern 杂交探针,使用 $EcoR$ I 和 $Hind$ III 两种内切酶进行基因组 DNA 酶切。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

以人工合成的 $folE$ 基因为模板,以 $folE$ -FR 为引物,在左右引物中分别引入 $SpeI$ 和 $SacI$ 酶切位点,并加上相应的保护碱基,通过 PCR 扩增得到 $folE$ 基因全长 663 bp,然后克隆到 pTF101-35s 载体中 (图 1A),构建好的质粒经过英俊生物技术公司测序和酶切检测 (图 1B),验证正确的植物表达载体转入农杆菌 EHA101 中,用于下一步大豆遗传转化。



A 为 pTF101-35S- $folE$ 载体图谱; B 为载体酶切电泳检测结果图, 其中 M: Trans2K™ Plus DNA Marker; 1: pTF101-35S 载体; 2: 未经酶切的 pTF101-35S- $folE$ 载体; 3: 经 $SpeI$ 和 $SacI$ 双酶切的 pTF101-35S- $folE$ 载体; 4: $folE$ 编码区全长片段。
A: Map of pTF101-35s- $folE$; B: The result of electrophoresis detection; M: Trans2K™ Plus DNA Marker; 1: Plasmid pTF101-35s; 2: Plasmid pTF101-35s- $folE$; 3: Digested; 4: Full-length of $folE$ coding region.

图 1 $folE$ 基因质粒载体图谱及电泳检测结果
Fig. 1 The map of plasmids vector pTF101-35s- $folE$ and electrophoresis detection

2.2 大豆子叶节遗传转化

选择带有目的基因 *folE* 的农杆菌菌株 EHA101,利用根癌农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法对大豆受体品种 Williams82 进行遗传转化,共

切取 200 个大豆外植体,最终得到 T_0 代转基因再生植株 34 株,转化率接近 17%。这些再生植株移栽后,可以正常生长、发育、结实,且表型与对照非转基因植株相比,没有明显变化(图 2)。

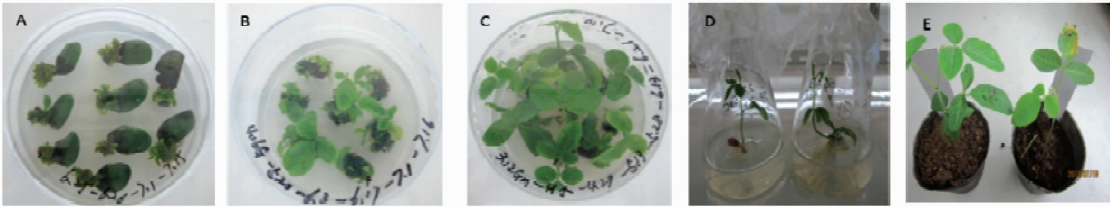


图 2 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法

Fig. 2 Agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node as explants

2.3 转基因阳性植株筛选鉴定

首先利用草丁膦 BASTA 涂抹叶片的方法快速检测,其中不抗除草剂的叶片明显变黄干枯,阳性植株叶片正常。检测 34 株转基因植株中,得到 14 株抗草丁膦的转化苗(图 3)。通过 PCR 检测目的基因 *folE*,检测出 12 株呈阳性的 T_0 代转基因植株(图 4)。通过 Southern 杂交方法对得到的 12 株 PCR 呈阳性的转基因植株进行了拷贝数的分析。Southern 杂交结果表明,在 12 个转基因植物中得到 2 个株系为 *folE* 全长 cDNA 单拷贝插入到基因组中(图 5)。另外经过内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切,转基因植株 4~11,13 号有杂交带出现,9 和 13 号转基因植株为单拷贝株系,而没有出现杂交带为非转基因植株,说明目的基因已经整合到植物基因组

中。12 号转基因植株在图 5 的 A 和 B 中均没有条带,说明是假阳性,目的基因并没有真正的整合到植物基因组中。杂交带大小有所不同,说明外源基因整合位点不同。

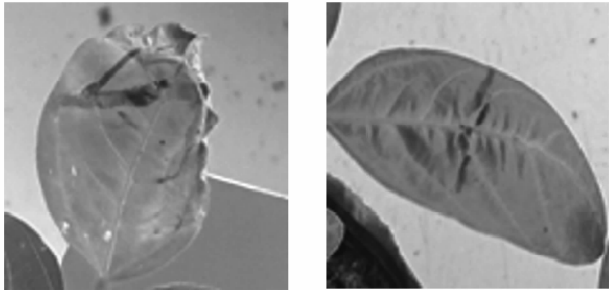
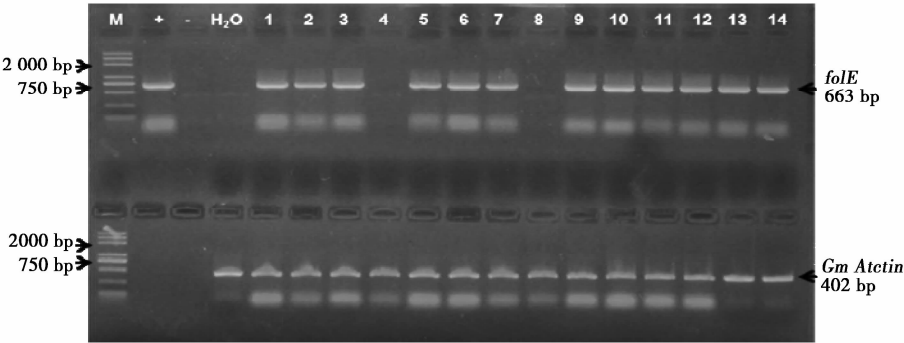


图 3 T_0 代转基因阳性植株的 BASTA 抗性分析
Fig. 3 BASTA resistance of T_0 transgenic plants



上排为目的基因检测结果,下排为相应单株 DNA 用 Actin 引物检测的结果。M: Trans2K™ Plus DNA Marker; “+” 质粒阳性对照;“-” 阴性对照;1~14 依次为经过除草剂涂抹法筛选的 T_0 代转基因材料。

Upper is for *folE*, and the other is Actin. M: DNA Marker(Trans2K™ Plus DNA Marker); “+”: Plasmid;“-”: The negative control; 1-14: The transgenic plants from T_0 lines after BASTA.

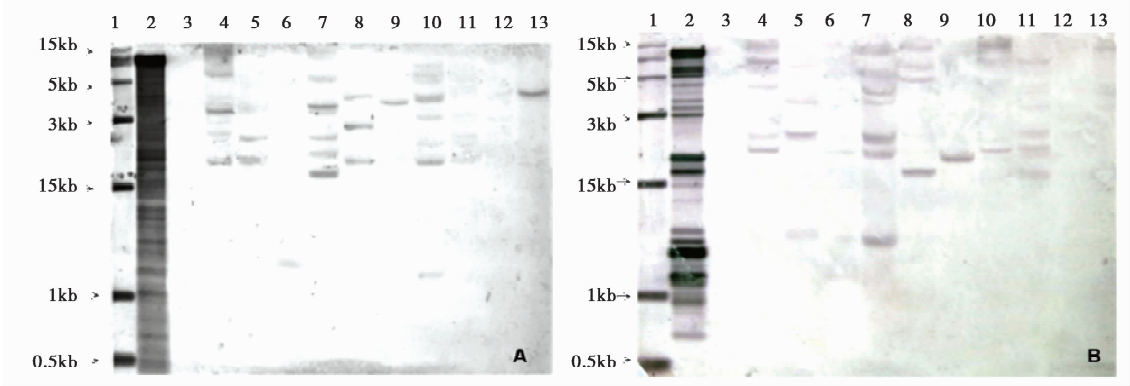
图 4 部分 T_0 代转化植株的 PCR 法鉴定转基因苗

Fig. 4 PCR analysis of the transgenic plants

3 讨论

目前美国和一些西方国家,采取在食品中添加人工合成的叶酸制剂来满足人类的需求,而这很难在食品加工业系统不健全、人口分布不平衡、经济条件有限的发展中国家实行,同时长期服用人工合

成的叶酸是否会对人体带来不良副作用也令人担忧^[12]。随着生物技术的日益发展,通过基因工程的手段改造叶酸合成代谢途径来提高食物中的叶酸含量具有重要的意义^[13]。*folE* 基因 TLP 是第 5 类病程相关蛋白,已证明在大麦^[14]、水稻^[15]、西红柿^[16]和马铃薯^[17]等多种植物中提高叶酸含量。本



A 为 *EcoR* I 酶切,B 为 *Hind* III 酶切结果。1:分子量 Marker; 2:质粒 DNA;3:阴性对照;4~13:经过 PCR 检测的转基因植株。
A is digested by *EcoR* I; B is digested by *Hind* III; 1: Marker; 2: Plasmid; 3: The negative control; 4-13: Transgenic plants from T_0 after PCR.

图 5 转基因 T_0 植株的 Southern blot 杂交

Fig. 5 Southern blot analysis of T_0 transgenic plants

研究成功地将 $folE$ 基因导入到大豆中, 并且获得了单拷贝的转基因株系, 对今后育种工作有重要意义。但是对于该基因在单拷贝家系中的整合位点尚未明确, 对转基因后代中阳性植株的叶酸含量还未进行测定, 在后期工作中将对获得的单拷贝的初世代材料加代繁殖, 逐步筛选, 测定纯合的材料中的不同组织内的叶酸含量, 以期获得具有较高安全性的、高叶酸含量的转基因大豆品种。

参考文献

[1] Hanson A D, Gregory J F. Synthesis and turnover of folates in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(3): 244-253.

[2] Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, et al. Folate fortification of rice by metabolic engineering[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1277-1286.

[3] Geisel J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy[R]. The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing, 2003, 17(4): 268-271.

[4] Choi S W, Friso S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2005, 43(10): 1151-1157.

[5] McIntosh S R, Brushett D, Henry R J. GTPcyclohydrolase I expression and folate accumulation in the developing wheat seed [J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48: 503-509.

[6] Basset G, Quinlivan E P, Ziemak M J, et al. Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(19): 12489-12594.

[7] Goyer A, Illarionova V, Roje S, et al. Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases [J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 103-111.

[8] Goyer A, Navarre D A. Determination of folate concentrations in

diverse potato germplasm using a trienzyme extraction and a microbiological assay[J]. Journal Agricultural Food Chemistry, 2007, 55(9): 3523-3528.

[9] Sybesma W, Starrenburg M, Kleerebezem M, et al. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis* [J]. Applied and Environment Microbiology, 2003, 69(6): 3069-3076.

[10] Díaz de la Garza R I, Gregory J F, Hanson A D. Folate biofortification of tomato fruit [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(10): 4218-4238.

[11] Olhoft P M, Flangel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216(5): 723-735.

[12] 许丽惠, 谢曲丽, 林丽花. 叶酸的研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(2): 34-36. (Xu L H, Xie Q L, Lin L H. Advancement of researches on folate[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 35(2): 34-36.)

[13] 常娜宁, 姜凌, 蒲训, 等. 作物叶酸检测方法的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(2): 44-49. (Chang N N, Jiang L, Pu X, et al. Research progress oil methodology for folate detection in crops[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(2): 44-49.)

[14] Basset G J, Ravel S, Quinlivan E P, et al. Folate synthesis in plants: The last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase[J]. Plant Journal, 2004, 40(4): 453-461.

[15] Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, et al. Folate biofortification in food plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(1): 28-35.

[16] Bello A R, Nare B, Freedman D, et al. PTR1: A reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(24): 11442-11446.

[17] Bermingham A, Derrick J P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery [J]. Bioessays, 2002, 24(7): 637-648.