

HSSP 基因植物表达载体构建及其对大豆的遗传转化

李兴龙,霍建玲,庞 添,柏 锡

(东北农业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150036)

摘 要:大豆中含硫氨基酸匮乏,限制了大豆的营养价值和商业价值。为了提高大豆的含硫氨基酸含量,利用人工设计合成的高含硫氨基酸贮藏蛋白基因(*HSSP*)转化大豆。以载体 pTF101.1 为骨架,构建植物表达载体 pTFGS,利用农杆菌介导法转化大豆品种东农 50,经 PCR 及试纸条检测,获得转基因大豆 16 株,基因的转化效率为 1.94%。对转基因大豆株系 GSDL5 进行组织特异性分析,结果表明,*HSSP* 基因在种子中超量表达,而在其它组织部位仅有微量表达。采用接头 PCR 方法对株系 GSDL5 基因组插入位点侧翼序列进行克隆,获得与大豆基因组序列匹配的 436 bp 侧翼序列,*HSSP* 基因插入 2 号染色体基因的非编码区。经研究,获得了遗传背景明确的,仅在大豆种子中超量表达 *HSSP* 的转基因株系 GSDL5。

关键词:大豆;含硫氨基酸;农杆菌介导遗传转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0171

High Efficient Plant Expression Vector with *HSSP* Gene and Transformation into Soybean

LI Xing-long ,HUO Jian-ling,PANG Tian,BAI Xi
(College of Life Science of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Lack of sulfur amino acids limited the nutritional value and commercial value of soybeans. In order to improve the sulfur amino acid content, increase nutritional value of soybeans, this study was designed and synthesized artificially high sulfur amino acid storage protein gene (*HSSP*) and transformed into soybeans. The plant expression vector pTFGS was constructed with efficient plant expression vector pTF101.1 skeleton, via *Agrobacterium* mediated transformation of soybean varieties Dongnong 50, detected 16 transgenic soybeans by PCR and strip, conversion efficiency was 1.94%. Transgenic lines GSDL5 were tissue-specific analysis showed that, *HSSP* gene overexpressed in seeds, while only trace expression in other tissue sites. PCR method using the connector lines GSDL5 genomic sequences flanking the insertion site for cloning, obtained with soybean genome sequence flanking sequences matching 436 bp, *HSSP* gene is inserted into a non-coding region of chromosome 2. This study got a clear genetic background, and only in soybean seeds overexpressing *HSSP* transgenic lines GSDL5.

Keywords: Soybean; Sulfur-containing amino acids; *Agrobacterium*-mediated transformation

大豆(*Glycine max* L.)是世界上重要的粮食和油料作物,其蛋白质含量通常在 40% 左右,是人类和动物重要的植物蛋白源。但由于大豆中含硫氨基酸的匮乏,会造成氨基酸的吸收失衡,从而限制了大豆的营养价值和商业价值^[1-2]。提高大豆含硫蛋白水平始终是改进大豆品质的主要方向之一。而传统育种方法在大豆的蛋氨酸改良中效果不明显,大豆含硫蛋白基因自然突变体很少,而经由人工诱变技术得到的大豆品系或因产量低,或因其他品质性状下降,或因选育周期长而没有得到广泛的接受。随着转基因技术的发展,植物基因工程成为了改良大豆含硫蛋白组分研究的有效手段^[3-5]。目前,利用基因工程改良豆科作物含硫氨基酸的手段主要有以下两个方面:调节含硫氨基酸合成及代谢途径。如 Avraham 等^[6]将拟南芥胱硫醚- γ -合成酶转入苜蓿中,使苜蓿中蛋氨酸和半胱氨酸的含量增加;导入外源高含硫氨基酸基因及人工合成的新基因。主要以 2S 清蛋白、豌豆清蛋白、巴西豆、玉米醇溶蛋白等或人工合成的序列为外源基因,导入受体,使受体表达外源基因,达到提高大豆含硫氨基

酸含量的目的。如 Randy 等^[7]将玉米 15 kDa 玉米蛋白转入大豆,使大豆含硫氨基酸含量增加。

本研究采用的 *HSSP* 基因是根据大豆密码子偏向性,利用生物信息学方法对玉米胚乳蛋白基因(*MRZP*)进行改造合成的新基因,可用于大豆的蛋氨酸改良,前期研究表明,将 *HSSP* 基因转入受体,可使蛋氨酸含量提高大约 20%。Gy2 启动子可在大豆种子发育中特异性启动贮藏蛋白基因,参与种子蛋白积累。El-Shemy 等^[4]将 Pgy2 启动子与连续编码 4 个蛋氨酸的人工合成基因连接,转化大豆,使种子贮藏蛋白含量增加。

本试验以成熟大豆子叶节为受体,将 *PGy2-HSSP-Tnos* 表达框转入大豆,以期获得高含硫氨基酸转基因大豆新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因受体大豆品种为东农 50,质粒 pBGM(携带 *Pgy2* 启动子调控的 *HSSP* 基因)、pTF101.1,农杆菌 EHA105, Genome Walker™ Universal Kit 购自

收稿日期:2015-03-22
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08004-003-002)。
第一作者简介:李兴龙(1988-),男,硕士,主要从事植物学研究。E-mail:xl_li@yeah.net。
通讯作者:柏锡(1975-),男,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:baixi@neau.edu.cn。

Clontech 公司、QuickStixTMKit for PAT/bar Cotton Leaf & Seed 购自 Envirologix 公司。

1.2 大豆遗传转化方法

采用农杆菌介导法^[8]。

1.3 转基因大豆分子生物学检测方法

取抗性植株刚刚展开的新叶,用 SDS 法提取基因组。采用 PCR 方法分别检测 *HSSP* 基因。利用试纸条检测 *bar* 基因的表达。采用 RT-PCR 方法检测 *HSSP* 基因在转基因大豆种子、茎、叶中的表达。

HSSP 基因 PCR 检测引物序列和反应条件如下:

Sense: CAGGGTCTCGCTTCAC, Anti-sense: GTCATAGCCATAGGGTTG。反应条件 94℃ 10 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 20 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

bar 基因试纸条检测参照 QuickStixTMKit for PAT/bar Cotton Leaf & Seed 说明书。

1.4 转基因大豆基因组插入位点侧翼序列分析方法

采用 SDS 法提取转基因大豆基因组 DNA,使用限制性内切酶 *Dra* I 对基因组 DNA 进行完全酶切,连接 Adpator 接头,建立基因组 DNA 文库。以 AP1/L1405 为引物,进行文库第一轮扩增。以第一轮 PCR 扩增产物为模板,AP2/L209 为引物,进行第二轮扩增。得到单一条带后,回收 PCR 产物,送测序公司测通。接头 PCR 分为两轮巢式 PCR 反应,反应体系为 20 μL,引物对 AP1 和 L1405 用于第一轮,反应条件如下:94℃ 变性 25 s,72℃ 延伸 3 min ,7 个

循环;94℃ 退火 25 s,67℃ 延伸 3 min,32 个循环;67℃ 终延伸 7 min。引物对 AP2 和 L209 用于第二轮,取稀释 50 倍的第一轮反应产物 1 μL 为模板;反应条件:94℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 3 min,5 个循环;94℃ 退火 25 s,67℃ 延伸 3 min,20 个循环;67℃ 终延伸 7 min。

表 1 巢式 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of cassette PCR

	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
通用引物	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
General primer	AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
T-DNA RB 端引物	L1405	CTGCACCATCGTCAACCACTACAT
T-DNA RB end primer	L209	AGCCTGAATGCGCAATGCTA

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 pTFGS 构建

载体 pTFGS 构建图谱见图 1。用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pBGM,回收分子量约3 000 bp 的 *Pgy2-HSSP-Tnos* 片段。用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pTF101.1,回收分子量约9 000 bp 的载体片段。连接获得重组质粒 pTFGS(图 2)。重组质粒用 *Kpn* I 单酶切鉴定,得到约 4.1 kb 片段;*Xba* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,得到约 700 bp 片段;*Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定,得到约 2 kb 片段,表明 pTFGS 构建正确(图 3)。采用冻融法将重组质粒 pTFGS 转入农杆菌 EHA105(图 4)。

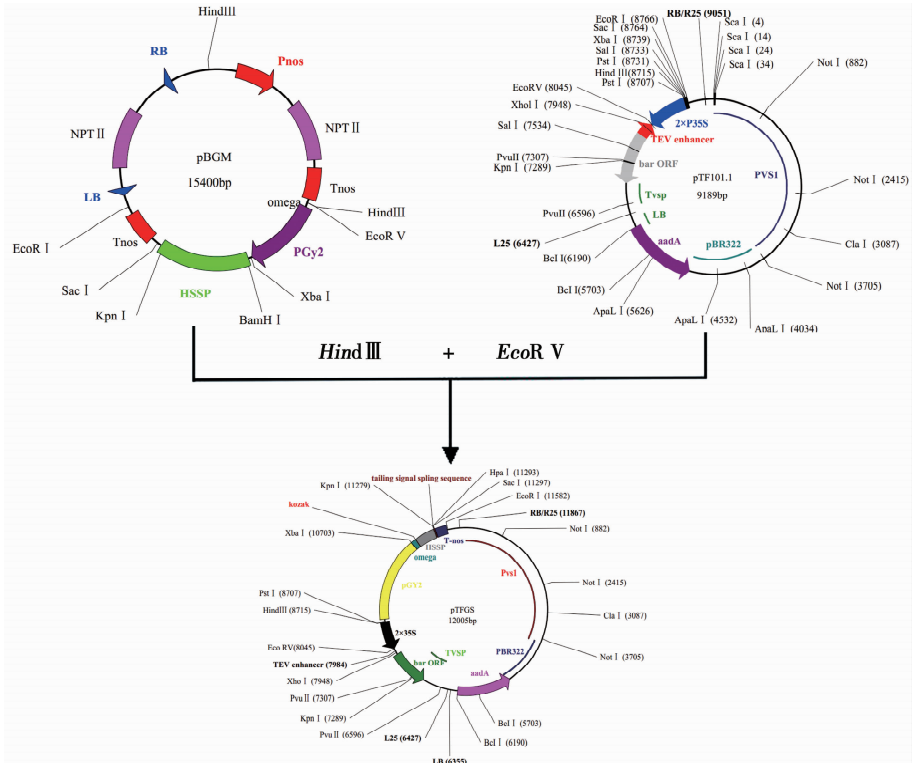
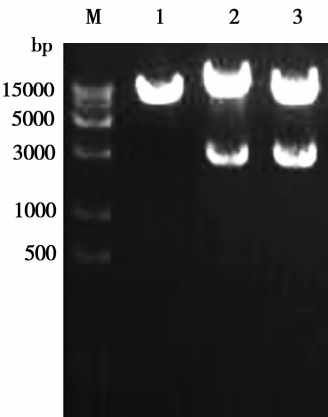


图 1 pTFGS 质粒图谱
Fig. 1 The map of pTFGS

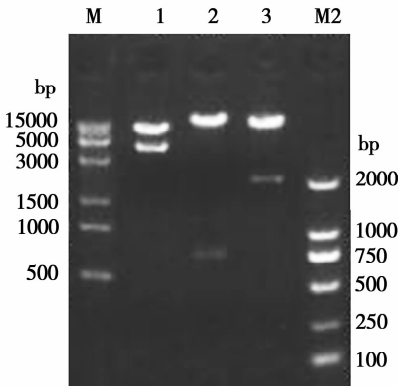


M;DL15000 Marker; 1:*Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切 pTF101.1 载体;2:*Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切 pBGM 质粒; 3:*Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切 pTFGS 载体。

M;DL15000 Marker; 1: Double digestion of pTF101.1 vector by *Hind* III and *EcoR* I ; 2: Double digestion of pBGM vector by *Hind* III and *EcoR* I ; 3: Double digestion of pTFGS vector by *Hind* III and *EcoR* I .

图 2 pTFGS 载体构建 (*Hind* III 与 *EcoR* V 双酶切)

Fig. 2 Constructing of pTFGS plasmid

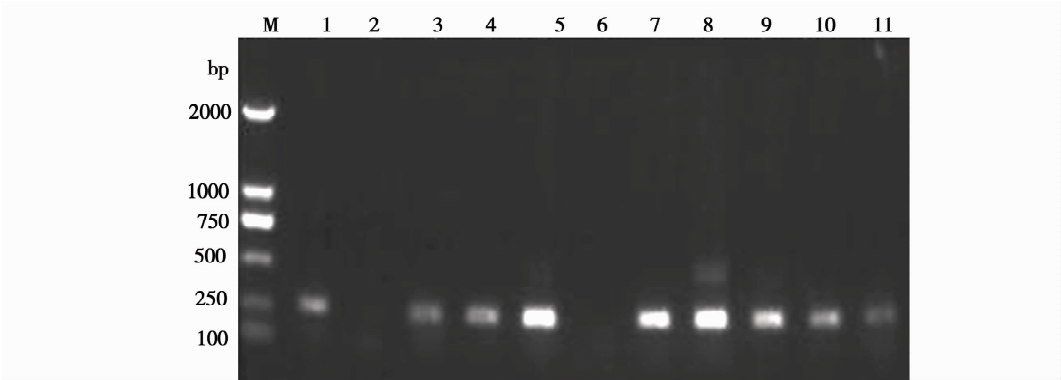


M1;DL15000 Marker;1:*Kpn* I 单酶切 pTFGS 质粒。2:*Xba* I 和 *Sac* I 双酶切 pTFGS 质粒。3:*Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 pTFGS 质粒

M1;DL15000 Marker; 1: Single digestion of pTFGS vector by *Kpn* I ;2: Double digestion of pTFGS vector by *Xba* I and *Sac* I ; 3: Double digestion of pTFGS vector by *Hind* III and *Xba* I .

图 3 pTFGS 质粒酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme digestion of pTFGS plasmid



M;2000 marker; 1: 阳性质粒; 2: 水对照; 3~11: 转化农杆菌样品。

M;DL2000 Marker; 1: positive control with pTFGS as template;2: negative control with distill deionized water as template; 3-11: the PCR amplification product of transforming *Agrobacterium* with pTFGS.

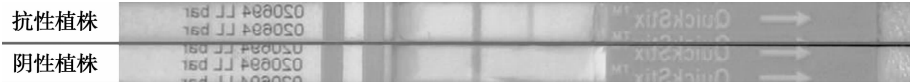
图 4 农杆菌 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of *Agrobacterium*

2.2 转 HSSP 基因大豆获得

共感染大豆东农 50 子叶节 726 个, 获得 HSSP

基因 PCR 和 *bar* 基因试纸条均呈阳性的 T₀ 代植株 16 株(图 5,6), PCR 鉴定的转化效率为 1.94%。

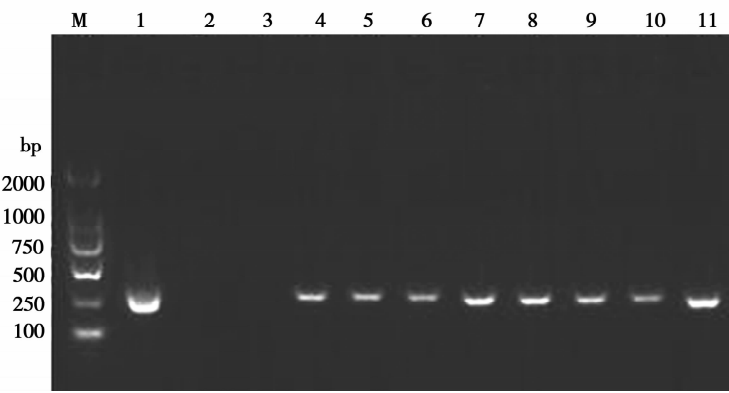


下方 DN50 为阴性植株对照;上方为抗性植株。

The test strip below is negative control plants of DN50; the test strip above is transgenic soybean.

图 5 抗性植株的 *bar* 基因试纸条检测结果

Fig. 5 The test strip results of *bar* gene



M:DL2000 Marker;1:阳性质粒对照;2:阴性植株对照;3:水对照;4~19:GSDL 1~16。
M:DL2000 Marker; 1:Positive control with pTFGS as template; 2:Negative control with Non-transgenic receptor as template;3:Negative control with distill deionized water as template; 4-19:Transgenic lines 1-16.

图6 部分抗性植株的HSSP基因PCR检测结果
Fig.6 PCR of part transgenic plants for HSSP

2.3 转基因大豆HSSP基因组织特异性表达分析

随机选取一株 RT-PCR 阳性植株 GSDL5,进行HSSP 基因组织特异性表达检测,结果显示:HSSP 基因在转基因大豆 GSDL5 的根、茎、叶、豆、荚中都有不同程度的表达,但是在种子中的表达量明显要高于其它组织(图7)。

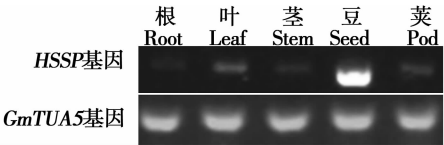
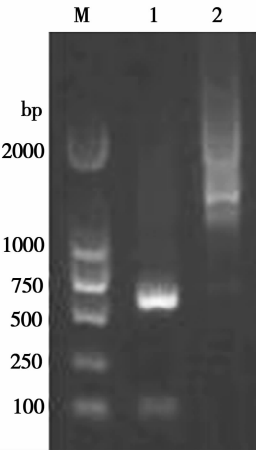


图7 转基因大豆HSSP基因组织特异性表达 RT-PCR 检测结果
Fig.7 HSSP tissue-specific gene expression by RT-PCR of transgenic plants

2.4 转HSSP基因大豆GSDL5基因组插入位点侧翼序列分析

提取转基因大豆 GSDL5 的基因组 DNA,用Dra I 进行完全酶切,连接 adaptor 成 GSDL5 基因组DNA 文库。以 AP1/L1405 为引物,进行文库第一轮扩增。以第一轮 PCR 扩增产物为模板,AP2/L209 为引物,进行第二轮扩增,得到大约 500 bp 单一条带(图9)。第二轮 PCR 产物回收,测序。测序结果得到 510 bp 序列,去除测序结果中的 T-DNA 部分序列(436 ~ 510 bp)后,提交 Phytozome 数据库,对

Glycine max Wm82. a2. v1 基因组数据进行 BLASTN 搜索。结果表明该序列与 2 号染色体 9 312 680 ~ 9 313 070 bp 匹配,匹配达到 100%,并且未落到编码基因区域,确定了 T-DNA 区插入到了大豆 2 号染色体基因组的 9 313 070 bp 处,插入位点没有已知功能基因序列。



M:DL2000 Marker; 1:二轮 PCR,引物对 AP2/L209;2:一轮 PCR,引物对 AP1/L1405。
M:DL2000 Marker; 1:Secondry PCR, primers AP2 / L209; 2:The first PCR, primers AP1 / L1405.

图8 GSDL5基因组文库巢式PCR检测结果
Fig.8 Results by nested PCR of GSDL5 genomic library

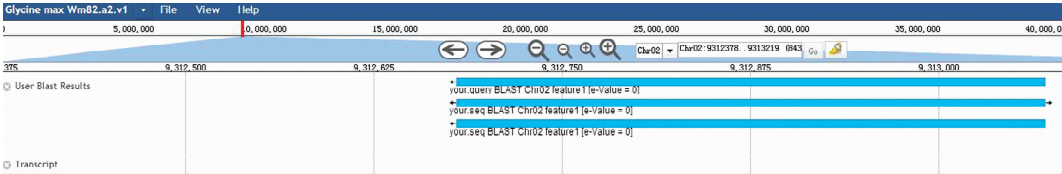


图9 35S启动子上游Blast分析结果
Fig.9 Blast analysis results of 35S promoter upstream

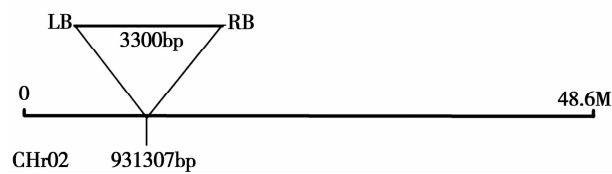


图 10 T-DNA 插入示意图

Fig. 10 Schematic of T-DNA insertion

3 结论与讨论

Gy2 是大豆种子贮藏蛋白特异性启动子,研究表明它可在大豆种子中发育中特异性启动^[9-11],将其与 HSSP 基因和 Tnos 终止子连接,成为 HSSP 基因表达框,能够在种子中特异表达 HSSP 基因。对 GSDL5 的 HSSP 基因组织表达分析结果显示,HSSP 基因在根、茎、叶、荚中仅有微量的表达,但在种子超表达 HSSP 基因。本研究结果表明 Gy2 启动子是一种十分理想的外源基因种子特异性启动子。

对 HSSP 基因 35S 启动子上游序列进行分析,显示 T-DNA 插入到二号染色体的9 313 070 bp。旁侧序列的分析对研究外源基因的插入十分重要,目前常用的方法有:基于基因组文库的染色体步移技术、基于 PCR 的染色体步移技术、tail-PCR、反向 PCR、接头 PCR 等。相对于其他方法,利用接头 PCR 来得到侧翼序列,避开了限制片段自身环化的步骤,操作简单,效率高^[12]。但是使用接头 PCR 方法对旁侧序列进行分析应注意 3 个方面:(1)应选择目的片段大小有明显差异的引物;(2)可进行多轮巢式 PCR,使结果更准确;(3)应选择条带单一且与单引物扩增条带不相同的 PCR 产物进行测序,测序引物使用特异引物。在本研究中,从构建文库开始到得到插入片段的旁侧序列,大约 5 d 时间,且结果正确,可见利用接头 PCR 法是一种快捷方便而且准确的旁侧序列分析方法。

本研究以载体 pTF 101.1 为骨架,构建植物表达载体 pTFGS,利用农杆菌介导法转化大豆品种东农 50,获得转基因大豆 16 株,基因的转化效率为 1.94%。对转基因大豆株系 GSDL5 进行组织特异性分析,结果表明,HSSP 基因在种子中超量表达,而在其它组织部位仅有微量表达。采用接头 PCR 方法对株系 GSDL5 基因组插入位点侧翼序列进行克隆,获得与大豆基因组序列匹配的 436 bp 侧翼序列,HSSP 基因插入 2 号染色体基因的非编码区。经研究,获得了遗传背景明确的,仅在大豆种子中超量表达 HSSP 的转基因株系 GSDL5。

目前为止,本研究对已转质粒 pTFGS 的抗性植株进行了 PCR、RT-PCR 检测以及 35S 启动子上游

基因组序列分析,获得了转基因植株,为了进一步确定 HSSP 基因在植物基因组中插入情况及拷贝数和基因功能,需对耐盐转基因品种进行 Southern Blot 检测及 ELISA 蛋白质定量检测。同时,要对转基因植株进行大量繁育,并对其及后代进行氨基酸含量分析,确定基因功能,并获得更多高含硫氨基酸转基因大豆新品系。

参考文献

[1] Young V R. Soya protein in relation to human protein and amino acid nutrition[J]. Journal of the American Dietetic Association, 1991,91:828-835.

[2] Torún B, Viteri F E, Young V R. Nutritional role of soya protein for humans[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1981,58 (3): 400-406.

[3] Sun Samuel S-M , Liu Q Q. Transgenic approaches to improve the nutritional quality of plant proteins[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-PlantMarch, 2004, 40(2):155-162.

[4] El-Shemy H A, Khalafalla M M, Fujita K, et al. Improvement of protein quality in transgenic soybean plants[J]. Biologia Plantarum, 2007,51(2):277-284.

[5] Rachel Amir, Han Tihanfu, Ma F M. Bioengineering approaches to improve the nutritional values of seeds by increasing their methionine content[J]. Molecular Breeding ,2012,29:915-924.

[6] Avraham T, Bhadani H, Galili S, et al. Enhanced levels of methionine and cysteinein transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants overexpressing the *Arabidopsis* cystathionine γ -synthase gene [J]. Plant Biotechnology Journal, 2005,3(1):71-79.

[7] Dinkins R, Srinivasa R M S, Meurer C A,et al. Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 kDa zein protein[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2001, 11 (37):742-747.

[8] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1999,56: 37-46.

[9] Nielsen N C, Dickinson C D, Cho T J, et al. Characterization of the glycinin gene family in soybean[J]. Plant Cell,1989,1: 313-328.

[10] Meinke D W, Chen J, Beachy R N. Expression of storage-protein genes during soybean seed development[J]. Planta,1981, 153: 130-139.

[11] Masao I, Shaikh M R, Moemen S, et al. Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation[J]. Molecular Breeding,2010, 25(2):313-326.

[12] 仇有文,高学军,张明辉,等. 抗除草剂转基因大豆插入拷贝数及其旁侧序列分析[J]. 生物技术, 2011 (21):6. (Qiu Y W,Gao X J,Zhang M H, et al. The copy number of transgenic soybean with the *EPSPS* gene and flanking sequence analysis[J]. Biotechnology, 2011 (21):6.)