

# 大豆翻译延伸因子 *GmeEF1A* 干扰载体的构建及大豆遗传转化

廖文林, 栾鹤翔, 高 乐, 丁雪妮, 宋英培, 殷金龙, 牛浩鹏, 智海剑

(南京农业大学 国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:**研究发现 *GmeEF1A* 与大豆花叶病毒的 P3 蛋白存在互作关系, 并且参与 SMV 在大豆体内的繁殖。通过大豆 *GmeEF1A* 基因 5 个拷贝的核苷酸和氨基酸序列比对, 确定其保守区间, 克隆得到 180 bp 的干扰片段 *GmeEF1Ai*。利用 GATEWAY 技术构建 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)表达载体 pB7GWIWG2(II)-*eEF1Ai*, 并通过农杆菌介导的子叶节转化法导入到受体大豆品种天隆 1 号中。测序结果显示重组质粒中插入的干扰片段 *GmeEF1Ai* 与目标序列完全符合, 通过 PCR 和酶切验证表明 *GmeEF1Ai* 是以反向重复形式插入到表达载体中。经转化获得组培苗 8 株, PCR、除草剂涂抹和 PAT/bar 试纸条多重检测确认 7 株为阳性。绝对荧光定量结果显示, 阳性苗中 4 株为单拷贝。 *GmeEF1A* 基因表达量分析结果显示 *GmeEF1Ai* 载体对 *GmeEF1A* 的 5 个拷贝基因有不同程度的阻抑。这不仅为验证 *GmeEF1A* 基因在大豆受 SMV 侵染时的功能提供试验材料, 也为大豆抗病育种提供新的种质。

**关键词:**大豆花叶病毒; *GmeEF1A* 基因; RNAi; GATEWAY 技术; 农杆菌介导大豆遗传转化

**中图分类号:** Q782      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.0902

## Interference Vector Construction of Soybean Translation Elongation Factor *GmeEF1A* and Soybean Transformation

LIAO Wen - lin , LUAN He - xiang , GAO Le , DING Xue - ni , SONG Ying - pei , YIN Jin - long , NIU Hao - peng , ZHI Hai - jian

(National Center for Soybean Improvement of Nanjing Agricultural University/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Previous research indicated the interaction between *GmeEF1A* and P3 protein of soybean mosaic virus, and it is related to SMV replication in soybean. In order to determine the conserved interval of soybean *GmeEF1A*, we made the nucleotide sequence and amino acid sequence alignment from 5 isoforms of *GmeEF1A*, cloned the 180 bp interference fragment named *GmeEF1Ai*. The RNAi vector pB7GWIWG2(II)-*eEF1Ai* was constructed by GATEWAY technology, and transferred into soybean genotype Tianlong 1 through *Agrobacterium*-mediated system. The sequencing result of *GmeEF1Ai* fragment in vector matched with the expected sequence completely, and the insert direction was conversed identified by PCR amplification and restriction digestion. We obtained eight transgenic seedlings, seven plants of them were positive detected by PCR, herbicide painting and Liberty Link strip. The data of the fluorescence quantitative PCR showed 4 seedlings contained one copy of *bar* gene. The results of expression levels of *GmeEF1A* indicated *GmeEF1Ai* vector could inhibit the expression of 5 isoforms in different extent. The results of this study provided a material to verify the function of *GmeEF1A* in SMV resistance and new germplasm resource in soybean mosaic virus resistance breeding.

**Keywords:** Soybean mosaic virus; *GmeEF1A* gene; RNAi; GATEWAY technology; *Agrobacterium*-mediated soybean transformation

大豆(*Glycine max* L.)原产于中国,是重要的粮食和油料作物,也是人类主要的植物蛋白来源。大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*),是造成大豆病害的主要病原体之一,在全球大豆产区广泛分布。大豆感染 SMV 后会出现花叶、坏死及顶枯等症状<sup>[1]</sup>, 受到 SMV 感染的大豆产量和品质都会下降<sup>[2]</sup>。

1998 年 Fire 等<sup>[3]</sup>首次发现双链 RNA 介导诱发高效特异性降解同源 mRNA 的现象, 并称之为 RNA

干扰(RNA interference, RNAi)。该技术目前已广泛应用于抗黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV)<sup>[4]</sup>、马铃薯 X 病毒(*potato virus X*, PVX)<sup>[5]</sup>、水稻黄斑驳病毒(*rice yellow mottel virus*, RYMV)<sup>[6]</sup>等多种作物的抗病毒研究。Gao 等<sup>[7-8]</sup>利用 GATEWAY 技术构建了包含 SMV-*HC-pro* 干扰片段和 SMV-*Cp* 干扰片段的表达载体, 并通过农杆菌介导的子叶节转化法成功导入到大豆基因组中, 在后代中获得抗性转基因材料。

收稿日期: 2016-07-03  
基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-004); 国家自然科学基金(31371646, 31571690); 国家现代农业产业技术体系(CARS-004); 江苏省现代作物生产协同创新中心(JCIC-MCP)。  
第一作者简介: 廖文林(1991-), 男, 硕士, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: 423806063@qq.com。  
通讯作者: 智海剑(1957-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

真核翻译延伸因子(eukaryotic translation elongation factor)能促进氨酰基-tRNA 与核糖体 A 位点结合,在蛋白质合成的肽链延伸过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。研究表明,*GmeEF1A* 属于真核延伸因子,它与细胞凋亡、信号转导等一系列生理病理过程有关<sup>[10]</sup>。Costa 等<sup>[11]</sup>发现 *GmeEF1A* 的 3 个亚型 *EF1A1a1*, *EF1A2a*, *EF1A2b* 在抗大豆紫斑病菌时具有关键作用。Luan 等<sup>[12]</sup>在酵母双杂试验中发现 *GmeEF1A* 与 SMV 的效应子 P3 蛋白存在互作关系,并且参与 SMV 的繁殖。随后的病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)实验发现,干扰 *GmeEF1A* 的功能可提高大豆对 SMV 的抗性。但未见将 *GmeEF1A* 转化大豆验证其在大豆花叶病毒病侵染时作用的报道。

本研究对大豆 *GmeEF1A* 全部 5 个拷贝的核苷酸和氨基酸序列进行比对,确定 *GmeEF1A* 的功能保守区域,应用 GATEWAY 技术构建 RNAi 载体 pB7GWIWG2(II)-*eEF1Ai* 并用农杆菌介导的大豆子叶节转化法将其整合到大豆基因组中,以验证 *GmeEF1A* 的功能并期望获得抗 SMV 新种质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 转化受体品种天隆一号由国家大豆改良中心提供大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、GATEWAY 入门载体 pDONR221、干扰表达载体 pB7GWIWG2(II)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由本实验室保存。

1.1.2 试剂 GATEWAY 反应所需试剂购自 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国 AXYGEn 公司;反转录试剂购自大连宝生物公司;KOD FX 高保真聚合酶购自日本 TOYOBO 公司;DNA Marker、2 × *Taq* mix 聚合酶购自中国北京 TIANGEN 公司;*Hind* III、*Xba*I、*Eco*R I 等限制性内切酶购自美国 Thermo 公司;转化阶使用的各种培养基基质、植物激素、抗生素、植物组培添加剂等均购自美国 Sigma 和 Phyto Tech 公司;其它试剂均为国产分析纯或超纯;测序及特异引物的合成均交付上海华大基因公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 *GmeEF1A* 基因保守序列的克隆及 PCR 扩增 提取大豆品种 1138-2 第二对三出复叶展开时的叶片 RNA,反转录得 cDNA,根据 Willams 的基因组序列,同源扩增 *GmeEF1A* 的 CDS 序列。从 <http://www.soybase.org> 获取 *GmeEF1A* 5 个拷贝的序列,用

Lasergene 软件进行比对,选取目标基因的特异区段。用 Primer Premier 5.0 软件设计分别含有 attb1 接头和 attb2 接头的上、下游引物。

上游引物:attb1-*eEF1Ai*-F( + ):GGGGACAAG-TTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTTAAGGCTGAGC-GTGAAG

下游引物:attb2-*eEF1Ai*-R( - ):GGGGACCAC-TTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCACCAGTGGTCG-AATCAA

以 *GmeEF1A* 的 CDS 为模板在 KOD FX 高保真酶和上述引物的作用下进行 PCR 反应,反应体系 50 μL:Buffer 25 μL,超纯水 10 μL,dNTPs 10 μL,上、下游引物各 1.5 μL,质粒 1 μL,KOD FX 酶 1 μL。反应体系:94℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,58℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 15 s,32 个循环;最后 72℃ 延伸 2 min。对 PCR 产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,随后用 AXYGEn 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收目标条带产物,并送交上海华大公司进行测序分析。

1.2.2 利用 GATEWAY 体系构建 RNAi 载体 GATEWAY 体系包括 BP 反应和 LR 反应两部分,通过 BP 反应构建中间载体,再通过 LR 反应构建表达载体。体系中用到的入门载体 pDONR221 和表达载体 pB7GWIWG2(II)都保存在大肠杆菌 DH5α 菌液中。试验前先从扩繁后的菌液中提取质粒,-20℃ 中保存备用。

BP 反应选择 10 μL 反应体系(均在冰浴条件下,1.5 mL 灭菌离心管内进行):attB-*eEF1Ai* 4 μL、pDONR221 vector 1 μL、TE Buffer 3 μL、BP Clonase II enzyme mix 2 μL。将离心管轻微涡旋混匀后,置于 25℃ 水浴加热 4 h 或者过夜,随后加入 1 μL Proteinase K solution,37℃ 加热 10 min。取 10 μL 反应产物用冻融法转化 DH5α 感受态细胞,涂布于含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 LB 平板培养基上,37℃ 倒置过夜培养。挑取单克隆扩繁后进行 PCR 反应,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 呈阳性的单克隆菌液送交华大公司测序,并提取质粒 pDONR221-*eEF1Ai* 用于下一步反应。LR 反应体系 10 μL:pDONR221-*eEF1Ai* 4 μL、pB7GWIWG2(II) vector 1 μL、TE Buffer 3 μL、LR Clonase II enzyme mix 2 μL。反应条件和过程和 BP 反应相同。用冻融法将所有反应产物转化进 DH5α 感受态细胞,涂布于含有 100 mg·L<sup>-1</sup> 壮观霉素的 LB 平板培养基上过夜培养。次日挑取单克隆扩大培养后进行 PCR 检测,鉴定为阳性的单克隆提取质粒并送交华大公司测序。

1.2.3 *GmeEF1A* 基因 RNAi 载体的鉴定及工程菌获得 对测序正确的重组质粒进行酶切反应和 PCR 的鉴定,验证 *GmeEF1Ai* 是否插入到目标位点中且形成了反向重复结构。

酶切反应鉴定插入位点:对 pB7GWIWG2 (II)-*eEF1Ai* 进行 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切验证,反应体系为:pB7GWIWG2 (II)-*eEF1Ai* 5 μL, *EcoR* I 1 μL, *Hind* III 1 μL, Buffer 5 μL, 无菌超纯水 8 μL。整个反应体系在 37℃ 金属浴中保温 30 min, 然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 鉴定插入方向:用 Primer Premier 5.0 软件分别设计终端载体启动子和终止子的引物 35S-P: 5'-GACGCACAATCCCCTATCC-3' 和 35S-T: 5'-GCTCAACACATGAGCGAAAC-3', 分别和干扰片段的下游引物 attb2-eEF1Ai-R, 以含有干扰载体的菌液为模板进行 PCR 扩增,反应体系 25 μL: 2 × *Taq* mix 聚合酶 12.5 μL, 超纯水 9.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 阳性单克隆菌液 1 μL。反应程序同 GATEWAY 方法所述。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对反应产物进行检测,鉴定干扰片段的插入方向是否正确。

将测序、PCR 和酶切反应检测正确的单克隆提取质粒,用电击法将其转入农杆菌 EHA105 感受态细胞中,涂布于含有 25 mg·L<sup>-1</sup> 利福平和 100 mg·L<sup>-1</sup> 壮观霉素的 YEB 平板上培养 48 h。挑取单克隆用 *GmeEF1Ai* 的上、下游引物进行 PCR 反应,检测为阳性的单克隆送交华大公司测序,加入 50% 甘油保存于 -80℃ 冰箱中。

1.2.4 利用农杆菌介导法对受体品种进行遗传转化 挑取种皮无裂痕和病斑的饱满种子平铺于空培养皿内,置于密闭的干燥器用氯气消毒 8 h。将消毒后种子放进无菌超净台内过夜吹风清除残留氯气,接种于萌发培养基中 (germination medium, GM) 过夜萌发。将先前在 -80℃ 保存的农杆菌菌液在 200 mL YEB 液体培养基中过夜扩大培养,培养温度 28℃,摇床转速 200 r·min<sup>-1</sup>。待菌液 OD<sub>600</sub> 升至 1.0 ~ 1.2 时,将其分装于无菌离心管内,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。弃上清,加入少许液体共培养基 (liquid co-cultivation medium, LCCM) 将菌落打散,再加入适量 LCCM 使菌落重悬至 OD<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8。

次日,切除已萌发种子的顶芽及侧芽,保留下胚轴 3 ~ 5 mm。将子叶和胚轴对半切开,在子叶节处制造 5 ~ 7 处与胚轴平行的划痕。把划伤的外植体浸泡在上述悬浮液中,30 min 后捞出外植体并用滤纸吸干,切面朝上平铺在垫有滤纸的共培养基上 (co-cultivation medium, CCM),暗培养 5 d。随后将外植体转入芽诱导培养基 (shoot induction medium,

SIM),每 14 d 继代 1 次,共选择培养 28 d。切除未被筛除外植体的子叶,将诱导出的丛生芽转移到芽伸长培养基 (shoot elongation medium, SEM),每 14 d 继代 1 次,共继代 5 ~ 6 次。丛生芽伸长到大于 4 cm 时,将其切下并插入生根培养基 (rooting medium, RM) 进行生根,约 14 d 根系健壮后打开瓶盖移到炼苗室炼苗 3 d,最后移栽到营养土中驯化 7 ~ 14 d,待幼苗成活后移入人工气候室并进行鉴定。本试验中所用到的培养基配方见表 1。

1.2.5 T<sub>0</sub>代转基因植株阳性苗检测 PCR 法:采用 TIANGEN 快捷型 DNA 提取试剂盒提取待测植株的总 DNA,分别用 attb1-eEF1Ai-F 和 attb2-eEF1Ai-R、35S-P 和 attb2-eEF1Ai-R, bar-F: 5'-CGAGACAAG-CACGGTCAACTT-3' 和 bar-R: 5'-AAACCCACGT-CATGCCAGTTC-3' 3 对引物以 T<sub>0</sub>植株 DNA 为模板进行扩增,检测 attB-eEF1Ai、35S 启动子以及 bar 基因是否插入到植株基因组中。PCR 结果采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,3 对引物均有条带则确认为阳性。

除草剂法:用纯净水和 Basta 原液调配浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup> 的检测剂,并加入 0.1% 的 Tween-20。选取植株中上部较嫩的叶片以主叶脉为分隔线,把检测剂均匀涂抹在半片叶子上,另一半用记号笔标记作为空白对照,7 d 后观察叶片症状。

PAT/bar 转基因检测试纸条法:取适量嫩叶片组织放入 1.5 mL 离心管中,用研棒将叶片充分碾碎后加入 0.5 mL 抽提缓冲液,搅拌离心管使样品和缓冲液充分混合。按照试纸条上箭头标明的方向将其插入离心管中,10 min 之后观察检测结果。若未出现控制线 (control line),说明试纸条失效需重做;同时出现控制线和检测线 (test line),认定为阳性;只出现控制线,认定为阴性。

1.2.6 T<sub>0</sub>代转基因植株目标基因拷贝数分析 通过绝对荧光定量法对 T<sub>0</sub>代植株 *GmeEF1Ai* 拷贝数进行初步分析。选取 *VATPase* 基因为内源参照基因,阳性质粒上的 *Bar* 基因为外源基因,分别建立标准曲线。提取 7 株转基因植株的总 DNA,以其为模板设置 20 μL 的荧光定量反应体系 (SYBR Green PCR Master Mix),并设置空白对照和阴性对照。反应程序:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 10 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,40 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。根据反应得到的 Ct 值绘制标准曲线并计算出 Ct 值与标准品起始模板数的线性回归方程。分别将内参基因和外源基因的 Ct 值代入方程,就可分别得到样品的起始模板数。通过模板数的比较能计算出 *GmeEF1Ai* 的相对含量,即为拷贝数。

表 1 大豆转化所用培养基配方

Table 1 Components of the medium used for soybean transformation

成份 Component	GM	LCCM	CCM	SIM	SEM	RM
B5 盐 B5 salts	1 ×	1/10 ×	1/10 ×	1 ×	—	—
MS 盐 MS salts	—	—	—	—	1 ×	1/2 ×
MS 铁盐 MS iron stock	1 ×	1/10 ×	1/10 ×	1 ×	1 ×	1/2 ×
B <sub>5</sub> 有机物 B <sub>5</sub> organics	1 ×	1 ×	1 ×	1 ×	1 ×	1/2 ×
吗啉乙磺酸 MES/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup>	3	20	20	3	3	3
蔗糖 Sucrose/%	2	3	3	3	3	2
琼脂 Agar/%	0.8	—	0.5	0.8	0.8	0.8
pH	5.8	5.4	5.4	5.7	5.7	5.6
6-苄基腺嘌呤 6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	—	1.67	1.67	—	—	—
赤霉素 GA <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	—	0.25	0.25	—	0.5	—
乙酰丁香酮 AS/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup>	—	0.2	0.2	—	—	—
半胱氨酸 L-cys /mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup>	—	—	3.3	—	—	—
二硫苏糖醇 DTT /mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup>	—	—	1	—	—	—
草丁膦 Glufosinate/mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	5	5	—
特美汀 Timentin /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	250	250	—
头孢霉素 Cefotaxime /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	100	100	100
天冬酰胺 Asparagine /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	—	50	—
谷氨酰胺 Glutamine /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	—	50	—
吲哚乙酸 IAA /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	—	0.1	—
玉米素 Zeatin-riboside /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	—	1	—
吲哚丁酸 IBA /mg·L <sup>-1</sup>	—	—	—	—	—	1

1.2.7 T<sub>0</sub>代转基因植株目标基因表达分析 提取4株单拷贝阳性转基因植株的总RNA,反转录得到cDNA。用Primer Premier 5.0软件设计*GmeEF1A*各自拷贝的特异性引物,进行实时荧光定量PCR分析,检测目的基因的沉默效率。

*GmeEF1A* 5个拷贝的引物和内参基因Tubulin的引物:

EF1A-1qRT Fwd:AGATGCACTTGACCAGATCTC  
EF1A-1qRT Rev:GAATCCAACATTATCACCG  
EF1A-2qRT Fwd:ATCGGACAAGCCTCTCCGATT  
EF1A-2qRT Rev:GTGATCCTTTAGAGTTAGAC  
EF1A-3qRT Fwd:GACCCTCAGACAAGCCTTTG  
EF1A-3qRT Rev:GTCACCTGGAAGGGCCTCCTG  
EF1A-4qRT Fwd:GACAGGCGATCCGGCAAA  
EF1A-4qRT Rev:GTCCCTAACAGCAAACCT  
EF1A-5qRT Fwd:AAGCCACTCAGGCTTCCATTG  
EF1A-5qRT Rev:CATTCTTCACATTAAAGCCA

Tubulin Fwd:GGAGTTCACAGAGGCA GAG  
Tubulin Rev:CACTTACGCATCACATAGCA  
反应体系和反应程序见1.2.6。

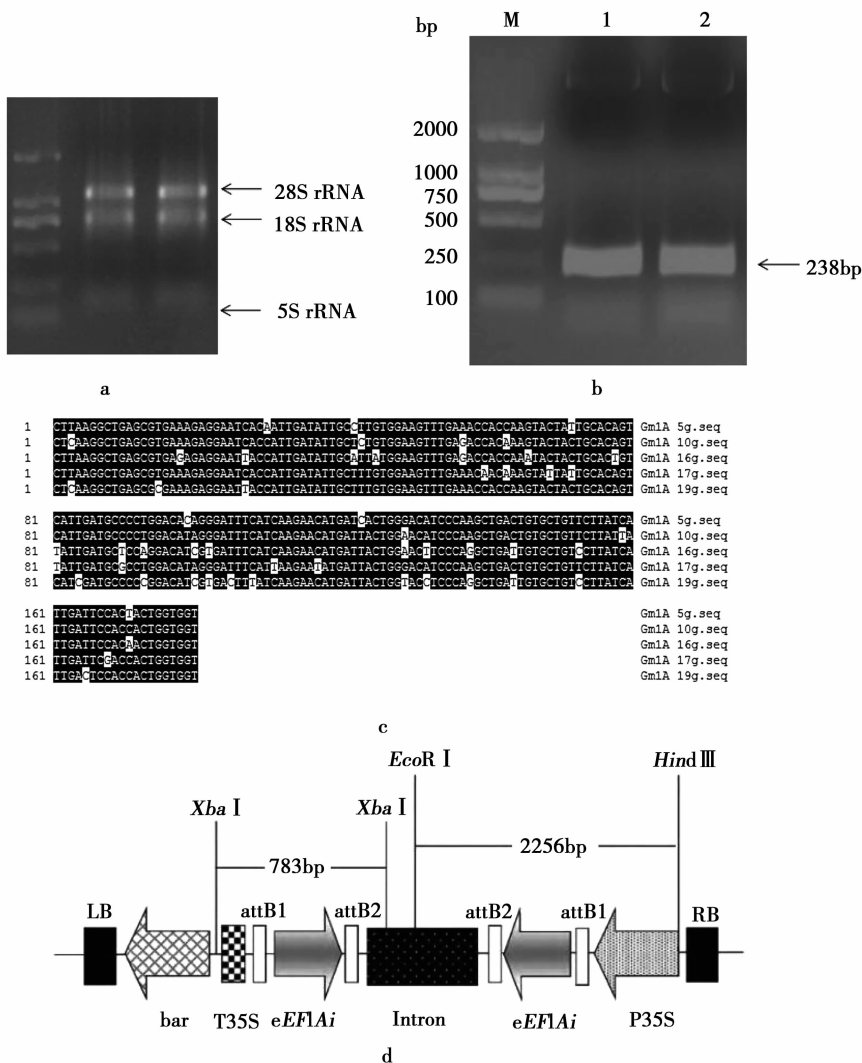
1.3 数据分析

采用2<sup>-△△Ct</sup>算法处理实时荧光定量数据,用Excel 2010绘制柱状图和计算标准曲线。

2 结果与分析

2.1 *GmeEF1A* 基因RNAi载体的鉴定

根据Lasergene软件比对结果,*GmeEF1A*基因保守区段为180 bp,提取大豆的总RNA(图1a),用全长*GmeEF1A*为模板扩增沉默片段(图1b),对*GmeEF1A*基因5个拷贝的保守区间序列比对(图1c),PCR产物纯化后利用GATEWAY体系将*GmeEF1Ai*插入到pB7GWIWG2(II)(图1d)。保守序列的扩增,以及BP反应和LR反应得到的产物都进行测序匹配。



a:大豆叶片总 RNA 提取;b:attB-*eEF1Ai* PCR 扩增;M:D2000 分子量标准;1~2:attb-*eEF1Ai* 干扰片段;c:*GmeEF1A* 基因 5 个拷贝序列比对;d:重组质粒 pB7GWIWG2(II)-*eEF1Ai* 结构图。

a: Total RNAs extraction of SMV soybean; b: Nucleotide sequence alignment of attB-*eEF1Ai*; M: Molecular marker of D2000; 1-4: Interference fragment of attb-*eEF1Ai*; c: Nucleotide sequence alignment of *GmeEF1A* genes 5 isoforms; d: Construct map of recombinant plasmid pB7GWIWG2(II)-*eEF1Ai*.

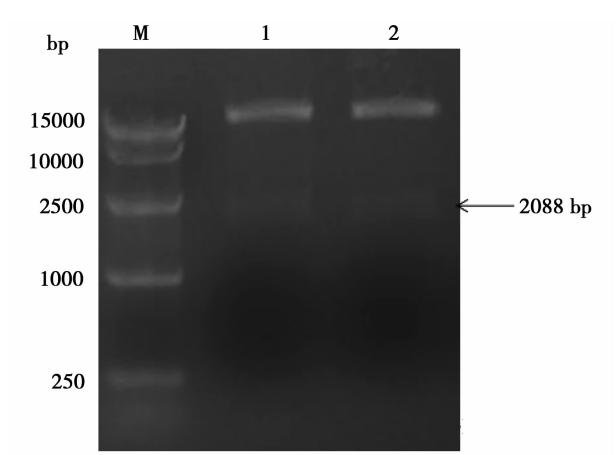
图 1 *GmeEF1A* 基因 RNAi 载体构建

Fig. 1 RNA interference vector construction of *GmeEF1A*

结果显示得到含有 attb 接头的 238 bp 干扰片段,大小与预期结果相吻合。测序所得序列进行 BLAST 比对,与 *GmeEF1A* 的保守区间序列匹配度为 100%。对重组质粒进行酶切反应得到 2 088 和 9 178 bp 两个片段(图 2),符合预期结果,证明 *GmeEF1Ai* 干扰片段均插入到了重组质粒的两个位点间。用 *GmeEF1A* 下游引物 attb2-eEF1Ai-R 分别和 35S 启动子引物 P35S、T35S 组合进行 PCR 扩增,分别得到 306 bp 和 292 bp 两条带(图 3),表明在重组质粒中插入的干扰片段 *GmeEF1Ai* 形成了反向重复结构。综上试验表明干扰片段 *GmeEF1Ai* 以反向重复形式正确插入到干扰表达载体 pB7GWIWG2(II)中且未变异,RNAi 载体构建成功。

2.2 T<sub>0</sub>代转基因植株的获得

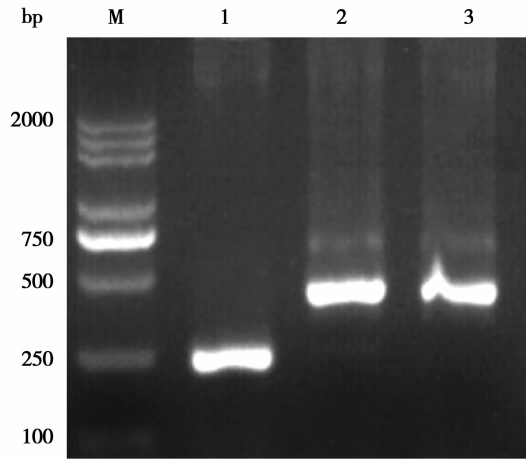
切除种子萌发后伸长的侧根,留下未展开的子叶用于农杆菌转化(图 4a,图 4b)。侵染后将子叶剖面向上平铺在垫有滤纸的 CCM 中按培养 5 d(图 4c)。将外植体移入 SIM 筛选培养(含 5 mg·L<sup>-1</sup>草丁腈),28 d 后可在子叶节节点部位观察到密集的丛生芽(图 4d),淘汰未诱导出丛生芽的外植体。切下丛生芽移到 SEM 中培养,每 14 d 继代一次,继代时小心切除因草丁腈而褐化坏死的丛生芽,保留能伸长的幼芽(图 4e)。待芽长到 4 cm 时将其插入 RM 中,10 d 后可观察到根系(图 4f)。待根系发达后将幼苗移入土培,炼苗驯化 3 d(图 4g),成活后进行阳性苗的检测。



M: D15000 分子量标准;1~2: *EcoR* I、*Hind* III 双酶切。  
M: Marker D15000;1-2: Restriction enzyme digestion of *EcoR* I and *Hind* III.

图 2 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vector by restriction enzyme digestion

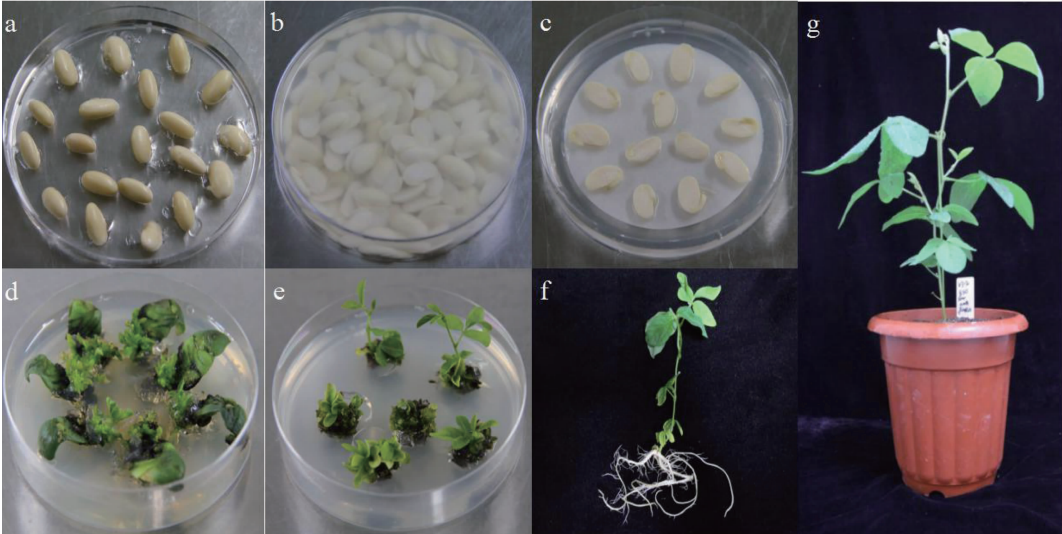


M: DL2000 plus 分子量标准;1: attB-*eEF1Ai* 干扰片段;2: P35S 和 attB-EF1Ai-R 扩增片段;3: T35S 和 attB-EF1Ai-R 扩增片段。

M: Marker DL2000 plus;1: Interference fragment of attB-*eEF1Ai*;2: Amplification fragment of P35S and attB-EF1Ai-R;3: Amplification fragment of T35S and attB-EF1Ai-R.

图 3 *GmeEF1Ai* 干扰片段插入方向鉴定

Fig. 3 Identification of the insertion direction of *GmeEF1Ai* interference fragment



a: 种子萌发;b: 菌液侵染;c: 共培养;d: 丛生芽诱导;e: 芽伸长;f: 生根;g: 幼苗成活。  
a: Seed germination;b: Inoculation in bacterium liquid;c: Co-cultivation;d: Shoot induction;e: Shoot elongation;f: Rooting;g: Seedling survival.

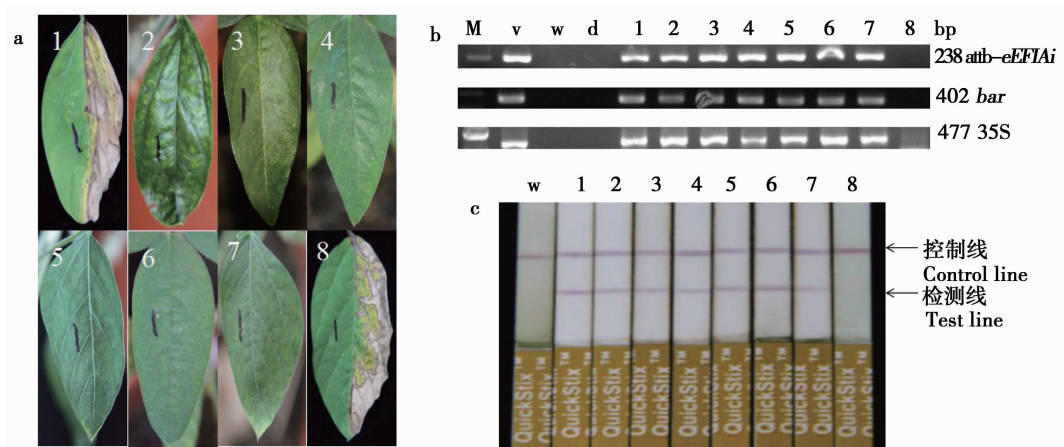
图 4 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化流程

Fig. 4 Process of *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary-node transformation

2.3 T<sub>0</sub>代转基因大豆的检测

利用农杆菌介导法进行遗传转化共移栽成活 T<sub>0</sub>代幼苗 8 株。PCR 电泳检测用 attB-*eEF1Ai*、*bar* 基因和 35S 启动子引物扩增,其中 7 株获得目标大小的条带(图 5b),说明干扰片段 *GmeEF1Ai* 成功整合到大豆基因组中。对 7 株阳性幼苗用 200 mg·L<sup>-1</sup> 除草剂涂抹幼苗叶片,涂抹除草剂的叶面有 6 株与

对照叶面并未出现明显差异,有 1 株叶面出现坏死症状(图 5a)。PCR 阳性的 7 株幼苗进行 PAT/*bar* 试纸条检测,结果都能观察到控制线和表示阳性的检测线(图 5c),说明 *bar* 基因已经翻译成蛋白质。综上结果表明干扰片段 *GmeEF1Ai* 已插入到大豆基因组中,转录形成了对靶基因具有阻抑作用的含内含子的发夹结构(intronsplicinghpRNA, ihpRNA)。



a: T<sub>0</sub>代转基因大豆除草剂涂抹;1:野生型 Tianlong 1;2~7:抗除草剂植株;8:不抗除草剂植株。  
b: T<sub>0</sub>代转基因植株 PCR 鉴定;M: D2000 分子量标准;v: 质粒阳性对照;w: 野生型 Tianlong 1 阴性对照;d: ddH<sub>2</sub>O 空白对照;1~7: 阳性转基因植株;8: 假阳性转基因植株。  
c: T<sub>0</sub>代转基因植株 PAT/*bar* 试纸条检测;w: 野生型 Tianlong1 阴性对照;1~7: 转基因阳性植株;8: 空白对照。  
a: Identification of T<sub>0</sub> transgenic soybean plants by herbicide painting;1: Wild type Tianlong1;2-7: Herbicide resistant plants;8: Herbicide nonresistant plant.  
b: Identification of T<sub>0</sub> transgenic soybean plants by PCR;M: Marker D2000;v: Positive control of plasmid;w: Negative control of wild-type Tianlong 1;d: Blank control of ddH<sub>2</sub>O;1-7: Positive transgenic plants;8: Negative transgenic plant.  
c: Identification of T<sub>0</sub> transgenic soybean plants by Quick Stix Kit for Liberty Link (*bar*);w: Negative control of wild-type Tianlong1;1-7: Positive transgenic plants;8: Blank control of buffer.

图5 T<sub>0</sub>代转基因大豆的检测  
Fig. 5 Identification of T<sub>0</sub> transgenic soybean plants

2.4 T<sub>0</sub>代植株 *GmeEF1Ai* 拷贝数的确定

为明确 *GmeEF1Ai* 在受体品种基因组中的插入情况,同时提供转 *GmeEF1Ai* 大豆后代筛选的参考标准,对 7 株阳性苗进行绝对荧光定量分析。根据荧光定量得到的 Ct 值绘制标准曲线,通过计算最终确定 *GmeEF1Ai* 的拷贝数。从表 2 可知 E2-1、E2-2、E4-3 和 E4-4 为单拷贝,E1-2 为双拷贝,E4-1 和 E4-5 为多拷贝。这一结果为高世代单拷贝、纯合体植株的筛选提供了重要的参考依据。

2.5 T<sub>0</sub>代植株 *GmeEF1A* 表达量分析

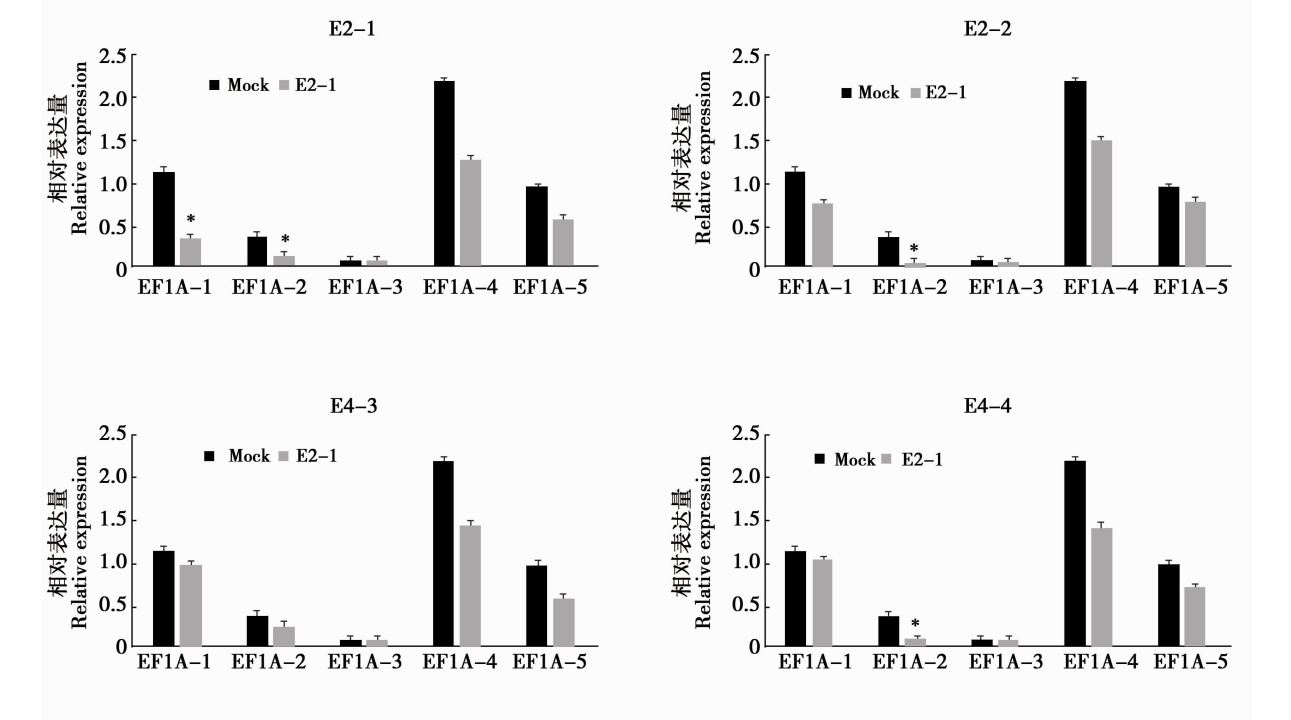
为验证 *GmeEF1Ai* 载体的沉默效率,对 4 株单拷贝转基因阳性植株的 *GmeEF1A* 基因表达量进行检测。如图 6 所示,在 4 棵植株中 *GmeEF1A*-1, *GmeEF1A*-2, *GmeEF1A*-4, *GmeEF1A*-5 的表达量与非转基因植株 (Mock) 相比都有不同程度的降低, *GmeEF1A*-3 沉默效率相对较低。

其中,E2-1 植株 *GmeEF1A*-1 表达量降低 70%, *GmeEF1A*-2 表达量降低 62%, *GmeEF1A*-4 表达量降低 42%, *GmeEF1A*-5 表达量降低 40%; E2-2 植株 *GmeEF1A*-1 和 *GmeEF1A*-4 表达量降低 32%,

*GmeEF1A*-2 表达量降低 83%; E4-3 植株 *GmeEF1A*-2 表达量降低 34%, *GmeEF1A*-4 表达量降低 35%, *GmeEF1A*-5 表达量降低 40%; E4-4 植株 *GmeEF1A*-2 表达量降低 73%, *GmeEF1A*-4 表达量降低 36%。

表 2 转基因植株 *bar* 基因拷贝数检测  
Table 2 The copy number detection of *bar* in soybean transformants

样品编号 Code	拷贝数 Copies
CK	0.095
E1-2	1.803
E2-1	1.072
E2-2	1.112
E4-1	3.730
E4-3	1.115
E4-4	1.083
E4-5	3.173



Y 轴代表 *GmeEF1A* 相对含量;X 轴代表 *GmeEF1A* 的 5 个拷贝。  
Y-axes indicate *GmeEF1A* transcript levels;X-axes indicate 5 isoforms of *GmeEF1A*.

图 6 *GmeEF1A* 的不同拷贝基因沉默效率

Fig. 6 *GmeEF1A* isoforms silenced expression level

3 讨论

RNA 干扰作为研究基因功能的一项重要技术,目前已广泛应用于抗黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV)<sup>[4]</sup>、马铃薯 X 病毒(*potato virus X*, PVX)<sup>[5]</sup>、水稻黄斑驳病毒(*rice yellow mottel virus*, RYMV)<sup>[6]</sup>等多种作物抗病毒研究。在本研究将大豆翻译延伸因子 1A 的干扰片段通过 GATEWAY 方法插入到载体 pB7GWIWG2 (II) 中,该方法不仅减少了传统酶切方法繁琐的工作,还能保存每一步的反应产物用于后续研究。

自从 1988 年 Hinchee 等<sup>[13]</sup>利用农杆菌介导转化法获得第一株转基因大豆以来,该技术在转基因研究方面已获得广泛应用。但仍存在转化率偏低、重复性差及受体品种受限等问题。翟锐等<sup>[14]</sup>对大豆基因型、氯气灭菌时间、外植体状态、菌株活力、侵染浓度、侵染时间、共培养时间等方面对该技术进行了研究和优化,并以天隆 1 号作为转化受体品种,使转化率达到 2.98%。该研究发现,因环境条件的较大改变,部分阳性组培苗在从组培室移栽到培养室的时候发生死亡。在本研究中共有 17 株组培苗,移栽后只成活 8 株。因此培育壮苗,优化炼苗和移栽环节,尽可能使组培室、炼苗室和人工气候室培育条件一致也是提高转化率的关键。

现有的阳性检测手段一般从 DNA 水平、蛋白水平和表型观察上进行鉴定,有时会出现检测结果不一致现象。本试验中有 1 株苗除草剂涂抹和试纸条检测结果不一致。Olhoft 等<sup>[15]</sup>在转基因大豆后代中发现了嵌合体现象。嵌合体的产生是由于不定芽中只有部分细胞导入了外源基因,由此发育而来的植株也只有部分组织含有外源基因。而在阳性检测中叶片采样和除草剂涂抹都是随机选取的,这是嵌合体植株 bar 试纸条检测呈阳性却不抗 Basta 的原因。

在转基因植株中外源基因拷贝数能影响表达效果和遗传稳定性<sup>[16]</sup>,传统检测转基因植株拷贝数的方法是 Southern 印记杂交。而绝对荧光定量的方法不仅省时省力,结果与 Southern 印记杂交的检测结果接近<sup>[17]</sup>。但两种方法有时结果会出现一定差别,绝对荧光定量检测结果的准确性取决于标准品的质量和标准曲线的制备,而在许多植株中标准品和待测样品的量化都只能做到近似估计<sup>[18]</sup>,因此它主要用于待检材料数目较多且需快速检测时。本文的绝对荧光定量结果对转基因植株后代的筛选提供了参考依据,后续研究中会对阳性后代进行 Southern 印迹杂交检测,以筛选转化效果良好的单拷贝家系,为大豆抗大豆花叶病毒育种提供可用的种质资源。

4 结 论

本研究通过 GATEWAY 技术成功构建 *GmeEF1A*基因 RNAi 载体,并用农杆菌介导的大豆子叶节转化法导入受体品种。转基因植株的阳性检测和 *GmeEF1A* 沉默效率检测结果都表明 *GmeEF1Ai* 已插入大豆基因组中并转录形成内含子的发夹结构,对 *GmeEF1A* 的 5 个拷贝基因有不同程度的阻抑。*GmeEF1Ai* 拷贝数分析结果显示有 4 颗转基因阳性植株为单拷贝,可用于高势代纯合体植株的筛选。

参考文献

[1] Zhang X, Sato S, Ye X, et al. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(11): 1264-1269.

[2] 董志敏, 刘佳, 衣志刚. 大豆抗花叶病毒病研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(35): 17538-17539, 17542. (Dong Z M, Liu J, Yi Z G. Research progress on the resistance of soybean to mosaic virus[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(35): 17538-17539, 17542. )

[3] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[4] Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, et al. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(8): 826-833.

[5] Takahashi S, Komatsu K, Kagiwada S, et al. The efficiency of interference of *potato virus X* infection depends on the target gene[J]. *Virus Research*, 2006, 116(1): 214-217.

[6] 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(7): 702-707.

[7] Gao L, Ding X, Li K, et al. Characterization of *soybean mosaic virus* resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128(8): 1489-1505.

[8] 高乐, 翟锐, 丁雪妮, 等. 大豆花叶病毒 CP 基因 RNAi 载体的构建及大豆遗传转化[J]. *植物保护学报*, 2014 (4): 453-460. (Gao L, Zhai R, Ding X N, et al. RNAi vector construction of *soybean mosaic virus CP* gene and soybean transformation[J]. *Journal of Plant Protection*, 2014 (4): 453-460. )

[9] Infante C, Asensio E, Cañavate J P, et al. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): Differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis[J]. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9(1): 1.

[10] Lamberti A, Caraglia M, Longo O, et al. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article[J]. *Amino Acids*, 2004, 26(4): 443-448.

[11] Costa J H, Saraiva K D C, Morais V D, et al. Reference gene identification for real-time PCR analyses in soybean leaves under fungus (*Cercospora kikuchii*) infection and treatments with salicylic and jasmonic acids[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2016, 45(2): 191-199.

[12] Luan H, Shine M B, Cui X, et al. The potyviral P3 protein targets EF1A to promote the unfolded protein response and viral pathogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(1): 221-234.

[13] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Biotechnology*, 1988, 6(8): 915-922.

[14] 翟锐, 高乐, 丁雪妮, 等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化[J]. *大豆科学*, 2015 (5): 768-775. (Zhai R, Gao L, Ding X N, et al. Optimization of cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated soybean transformation system[J]. *Soybean Science*, 2015 (5): 768-775. )

[15] Olhoft P M, Flagel 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.

[16] Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(9): 3490-3496.

[17] Song P, Cai C, Skokut M, et al. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKER-S<sup>TM</sup>-derived transgenic maize[J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20(10): 948-954.

[18] Mason G, Provero P, Vaira A M, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[J]. *BMC Biotechnology*, 2002, 2(1): 1.