

RNA 干扰高油 *GmPEPc* 基因转入大豆研究

张原宇<sup>1</sup>,董英山<sup>1</sup>,于盛竹<sup>2</sup>,邢国杰<sup>1</sup>,李 桐<sup>3</sup>,郑惠景<sup>1</sup>,张 玲<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院 吉林省农业生物技术重点实验室,吉林 长春 130033; 2. 东北农业大学 资源与环境学院,黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 东北师范大学 生命科学学院,吉林 长春 130024)

**摘 要:**通过构建 *GmPEPc* 基因的植物 RNAi 双元表达载体,并通过农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化方法将控制油脂和蛋白合成途径的相关基因 *GmPEPc* 转入受体品种沈农 9 号中,通过抑制大豆内源 *GmPEPc* 基因的表达,增加油脂积累,从而获得高油的转基因大豆新品种。在大豆组织培养过程中,共切取大豆外植体 407 块,获得 T<sub>0</sub>代转化苗 35 株,转化率 8.9%。通过对转基因后代中目的基因的整合及表达情况进行分子鉴定。获得 23 株 T<sub>1</sub>代转基因后代,其中高抗草丁膦除草剂(喷施浓度 300 mg·mL<sup>-1</sup>)14 株,通过 PCR 检测结果表明其中 12 株为 PCR 阳性;PCR 和 Southern 杂交检测表明,*GmPEPc* 基因已经成功插入到转基因大豆植株基因组 DNA 中。对 T<sub>1</sub>代测定结果显示,转基因大豆籽粒的平均含油量比对照高 9.51%,平均蛋白质含量下降 5.44%。这些研究结果为筛选高油脂含量的转基因大豆新株系提供了依据,为下一步高油新品种的选育提供了种质基础。

**关键词:**大豆;转基因;*pepc*;RNA 干扰;子叶节

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.04.0514

Introduction of RNAi-*PEPc* Gene into Soybean

ZHANG Yuan-yu<sup>1</sup>, DONG Ying-shan<sup>1</sup>, YU Sheng-zhu<sup>2</sup>, XING Guo-jie<sup>1</sup>, LI Tong<sup>3</sup>, ZHENG Hui-jing<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>1</sup>  
(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Jilin Provincial Key laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China; 2. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Life Science College of Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

**Abstract:** Soybean is one of the most important oil seed crop planted as a major source of oil and protein for human. The cultivation of high-oil soybean varieties has been one of the important issues for soybean breeding. In this study, we expressed the *pepc*-RNAi into the receptor varieties Shennong 9 by soybean cotyledonary nodes method. Though inhibiting the soybean endogenous *GmPEPc* gene expression to gain high oil of genetically modified soybean varieties. We co-cultivated about 407 explants, and got 35 transgenic plants, conversion rate 8.9%. Stock of glufosinate(300 mg·L<sup>-1</sup>) was painted on half the upper surface of T<sub>1</sub> soybean leaves, and we had got 23 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 *pepc*-RNAi gene into the soybean genome. The results of T<sub>1</sub> generation showed that the average oil content of transgenic soybean grain was 9.51% higher than that of the control, and the average protein content decreased by 5.44%. The results of these studies provide a basis for the selection of new varieties of high oil content, which provides the basis for the selection of new varieties of high oil.

**Keywords:** Soybean; Transgenic; *pepc*; RNAi; Cotyledonary node

大豆是重要的经济和油料作物,其种子油是植物食用油的重要来源。目前大豆油约占食用、饲用和工业用植物油的 28%<sup>[1]</sup>。利用基因工程技术提高其油脂的含量,培育高油脂、高油酸品种对推动我国大豆产业具有显著的现实意义。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指通过反链 RNA 与正链 RNA 形成双链 RNA 特异性抑制靶基因的转录后表达的现象,它通过人为地引入与内源性靶基因具有相同序列的双链 RNA,诱导内源靶基因的 mRNA 降解,从而改变染色体的结构,关闭相应序列表达或使其目的基因沉默。RNAi<sup>[2]</sup>现象自 20 世纪 90 年代被发现以来,已广泛应用在植物功能基因组研

究和植物品质营养改良中。随着生物技术的发展, RNAi 技术通过农杆菌介导等转化手段,为改变作物品质提供了新的方向,并在水稻、小麦、马铃薯等作物中得到广泛应用<sup>[3-6]</sup>。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, *pepc*)是控制油菜蛋白质与油脂含量比例的一个关键酶。*pepc* 催化丙酮酸合成草酰乙酸进入蛋白质代谢, ACCase 催化丙酮酸合成乙酰辅酶 A 进入脂肪酸代谢。早在 20 世纪 50 年代,就有关于油菜蛋白质含量与油脂含量呈高度负相关的报道 80 年代末,日本学者杉本博士发现籽粒蛋白质含量与 *pepc* 活性密切相关<sup>[7-8]</sup>。在此基础上,陈锦清

收稿日期:2017-03-29  
基金项目:国家自然科学基金青年基金(31501327);吉林省科技发展计划-青年科研基金项目(20150520123JH)。  
第一作者简介:张原宇(1983-),男,硕士,助理研究员,主要从事转基因生物技术研究。E-mail: zyy\_1983@foxmail.com。  
通讯作者:张玲(1981-),女,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。E-mail: zly\_jaas@126.com。

等<sup>[9]</sup>提出“底物竞争”假说,认为种粒的油脂和蛋白质存在着底物竞争,而平衡点取决于两类物质代谢的关键酶,pepc 和乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)的相对活性。两种酶的相对活性是调控籽粒蛋白质/油脂含量比率的关键酶。通过抑制蛋白的合成,将更多的碳源用于油脂的合成,提高了籽粒中的含油量。

本研究通过农杆菌介导子叶节方法,将高油基因 *GmPEPc*-RNAi 表达载体成功转入大豆受体材料沈农 9 号基因组序列中,通过抑制大豆内源 *pepc* 基因的表达,调控油脂和蛋白质含量比例,增加转基因大豆的油脂含量。该研究有助于为今后转基因大豆育种提供新的种质材料,以满足人们对植物性油脂的大量需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 大豆受体材料 受体材料为大豆品种沈农 9 号,由吉林省农业科学院农业生物技术研究所以转基因大豆课题组提供。

1.1.2 菌种和质粒 大肠杆菌菌株为 *E. coli* Trans10,农杆菌菌株为 EHA101,大豆转化载体为植物双元表达载体 pLYZRNAi。以上材料均由吉林省农业科学院农业生物技术研究所以转基因大豆课题组提供。

1.1.3 试剂 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒、*Taq*DNA 聚合酶、限制性内切酶、*T<sub>4</sub>*-DNA 连接酶、Trizol、反转录试剂盒购自北京金全生物科技有限公司;凝胶回收核酸小片段试剂盒购自 TaKaRa 试剂生物公司;Southern 杂交试剂盒购自罗氏试剂公司,其它试剂均为国产分析纯产品。

### 1.2 方法

1.2.1 *GmPEPc* 基因的克隆及 RNAi 干扰载体 pLYZRNAi-*GmPEPc* 的构建 提取大豆 Williams 82 生长 30 d 幼苗叶片 RNA,反转录得到 cDNA。选取 *GmPEPc* (Genbank No. NM\_001250673.1)基因中一段 349 bp 的序列作为干扰区序列构建 RNAi 干扰载体。

1.2.2 农杆菌介导大豆子叶节及转基因大豆的再生 在平板上挑取农杆菌菌株 EHA101 单菌落,接入 100 mL YEP 液体培养基中,加入 500 μg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素,500 μg·mL<sup>-1</sup>壮观霉素,250 μg·mL<sup>-1</sup>利福平,28℃,180 r·min<sup>-1</sup>过夜培养至对数期(OD = 0.5),3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃上清,用液体培养基悬浮沉淀,作为侵染菌液。子叶节受体的制

备,取成熟饱满的大豆种子经过氯气灭菌 16 h,放入培养基中萌发 16 h 作为受体。子叶节描述的方法参照 Olhoft 等<sup>[10]</sup>,培养基配方参照 Olhoft 等<sup>[11]</sup>。子叶节切取,从胚轴处将受体一切为二,切时刀尖蘸侵染菌液。将切开后的子叶节放入侵染菌液中,轻柔晃动(30 r·min<sup>-1</sup>)30 min,转入共培养基中,23℃避光培养 3~5 d。共培养后,将伸长的胚轴切去,只保留长约 5 mm 的胚轴,插入伸长培养基中。在伸长培养基中培养 7 d 后转入分化筛选培养基中,间隔 15 d 继代 1 次,继代时弃除变黄及褐化的丛生芽,保留嫩绿伸长的丛生芽,筛选 3~4 轮,逐步得到转化苗。转化苗放入生根培养基中生根,炼苗 3~5 d 后,移栽到花盆中,温室正常管理。

1.2.3 转基因后代植株的除草剂抗性鉴定 转化载体中包含筛选标记基因 *bar*,因此在植株幼苗时期,通过喷洒草丁膦方法(浓度 300 mg·mL<sup>-1</sup>),快速排除非转基因植株。

1.2.4 转基因植株分子检测 转基因植株 PCR 检测:使用 CTAB 法,提取转基因植株和非转基因植株的基因组 DNA,以此为模板。根据 *GmPEPc* 基因和载体序列设计出两对引物,扩增片段大小为 520 和 425 bp。序列分别为:Left MCS-F:5'-CGCACAATCCACTATCCTT-3';Left MCS-R:5'-AGGCGGTACAATGATCAACC-3'。Right MCS-F:5'-TATGACACGGCTGTTTCGAG-3';Right MCS-R:5'-GAATCCTGTTGCCGTCTT-3'。PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃,5 min。

转基因植株 Southern 杂交检测:对 PCR 检测为阳性的植株,提取叶片基因组 DNA,用 *Eco*R I 酶消化 16 h,以正向 *pepc* 基因和部分载体表达框序列设计探针,进行 Southern 杂交检测。

脂肪和蛋白含量测定:转基因植株后代籽粒中,油脂及蛋白质含量测定采用 FOSS 公司生产的近红外谷物品质分析仪(Infratec TM 1241)快速测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体 pLYZRNAi-*GmPEPc* 的酶切鉴定

将构建好的 pLYZRNAi-*GmPEPc* 质粒(图 1)转入大肠杆菌 Trans10 感受态细胞中,涂布在含有壮观霉素抗生素的 LB 固体培养基中。单菌落形成后,随机挑取 3 个单菌落在 LB 液体培养基中振荡培养,提取质粒进行酶切鉴定。通过两个双酶切,分别将正向和反向的 *pepc* 基因片段切出,电泳检测结果表明 pLYZRNAi-*GmPEPc* 载体构建成功(图 2)。

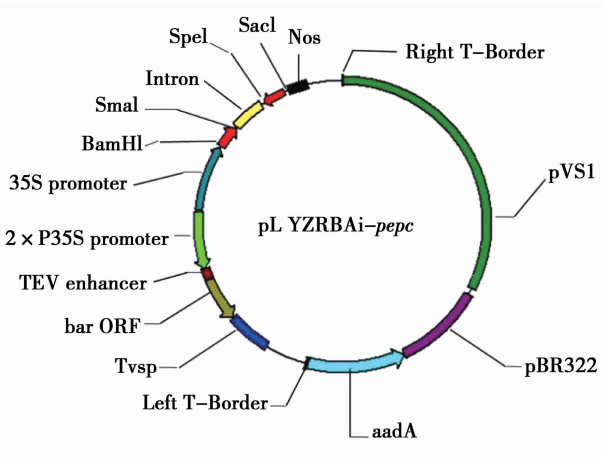
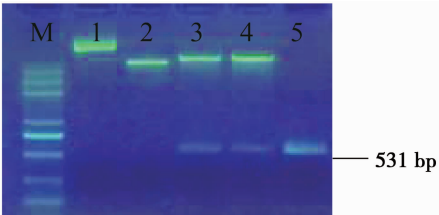


图 1 表达载体 pLYZRNAi-pepc

Fig. 1 Binary expression vector pLYZRNAi-pepc

2.2 大豆子叶节遗传转化

通过将 pLYZRNAi-pepc 质粒转入农杆菌菌株 EHA101 中,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沈农 9 号进行遗传转化。



M: Trans2K™ plus DNA Marker; 1: pLYZRNAi 载体; 2: 未经酶切的 pLYZRNAi-GmPEPc 质粒; 3: 经 Spe I 和 Sac I 双酶切的 pLYZRNAi-GmPEPc 正向片段; 4: 经 Sma I 和 Bam HI 双酶切的 pLYZRNAi-GmPEPc 反向片段; 5: pepc 编码区全长片段。

M: Trans2K™ plus DNA Marker; 1: Plasmid pLYZRNAi-Gm-PEPc; 2: Plasmid pTF101-RNAi-PEPc; 3: Digested with Spe I and Sac I; 4: Digested with Sma I and BamH I; 5: Full-length pepc.

图 2 表达载体 pLYZRNAi-pepc 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of expression vector pLYZRNAi-pepc

共切取 407 个大豆外植体,最终得到 T<sub>0</sub>代转基因再生植株 35 株,转化率接近 8.9%。这些再生植株移栽后,可以正常生长发育,且叶型、株型,花色等表型与对照相比,没有明显变化。

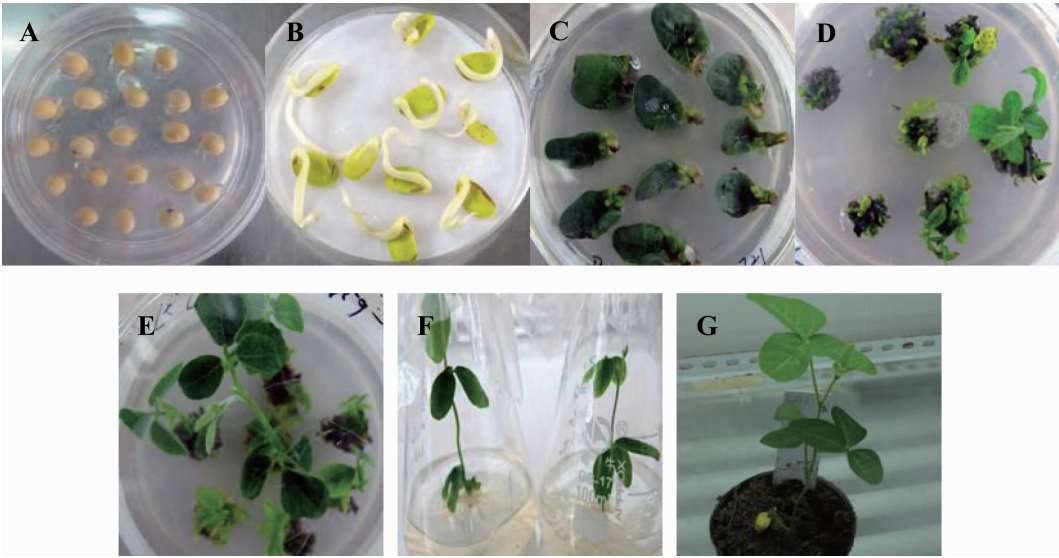


图 3 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法转化 pLYZRNAi-GmPEPc

Fig. 3 Agrobacterium-mediated soybean transformation of pLYZRNAi-GmPEPc with the cotyledonary node

2.3 转 GmPEPc 基因 T<sub>1</sub>代植株的除草剂鉴定和 PCR 检测

T<sub>0</sub>代转基因植株通过加代自交得到 T<sub>1</sub>代转基因大豆植株 23 株。通过喷洒草丁膦除草剂,筛选剔除非转基因植株。抗除草剂的植株则表现为正常生长状况,没有明显的颜色变化,不抗除草剂的植株表现为叶片发黄、枯萎(图 4)。选取其中高抗除草剂的 14 株转化苗进行 PCR 检测,电泳结果显示

共获得阳性植株 12 株(图 5)。

2.4 转 GmPEPc 基因 T<sub>1</sub>代大豆植株的 Southern 检测

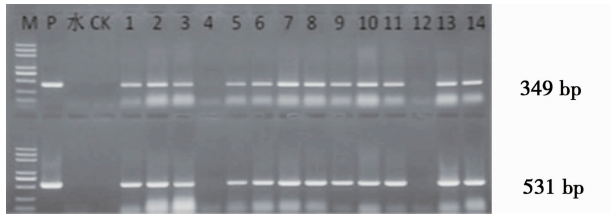
DNA 基因组经过内切酶 EcoR I 酶切,T<sub>1</sub>代转基因植株 4 ~ 11 有杂交带出现,而 3 号为非转基因植株对照没有杂交带出现(图 6),说明目的基因已经整合到大豆基因组中。杂交带大小有所不同,说明外源基因的整合位点不同。



左:抗性植株;右:非抗性植株。  
Left: Resistant plant; Right: Non-resistant plant.

图 4 T<sub>1</sub>代转基因阳性植株的草丁膦抗性分析

Fig. 4 Glufosinate resistance of T<sub>1</sub> transgenic plants

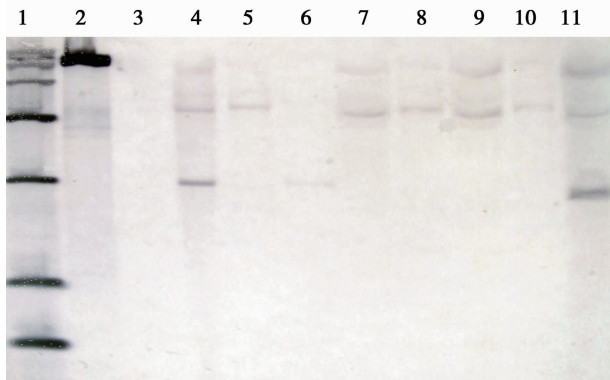


M: Trans2Kplus Marker; P: 质粒; 水: 阴性对照; CK: 未转基因植株; 1~14: 转基因植株; 上排为正向 *pepc* 引物检测结果, 下排为相应单株 DNA 用反向 *pepc* 引物检测的结果。

M: Trans2Kplus Marker; P: Plasmid; Water: The negative control; CK: Untransforming plants; 1-14: Transgenic plant; On the test results for forward direction *pepc* primers for DNA detection with single row corresponding opposite direction primer of *pepc* results.

图 5 T<sub>1</sub>代转化植株的 PCR 法鉴定

Fig. 5 PCR analysis of the transgenic plants



1: 分子量 15 K Marker; 2: 质粒 DNA; 3: 阴性对照; 4~11: T<sub>1</sub>代转基因植株。

1: Marker; 2: Plasmid; 3: The negative control; 4-11: Transgenic plants from T<sub>1</sub>.

图 6 转基因 T<sub>1</sub>代植株的 Southern 杂交

Fig. 6 Southern blot analysis of T<sub>1</sub> transgenic plants.

2. 5 转 *GmPEPc* 基因 T<sub>1</sub>代种子油脂和蛋白质测定

从转基因后代植株中挑取 10 个株系单株籽粒

及 5 个对照籽粒平均蛋白和油脂含量。转基因单株平均蛋白质含量为 40.09%, 平均油脂含量为 22.67%。转基因籽粒含油量平均比对照高 9.51%, 蛋白质含量低 5.44%。其中一株(39.1%, 23.7%), 油脂含量提高了 14.49%, 蛋白质含量下降了 7.78%。

表 1 转 *GmPEPc* 基因 T<sub>1</sub>代种子的油脂和蛋白质含量

Table 1 Oil and protein contents of *GmPEPc* (%)

项目 Item		蛋白含量	油脂含量
		Protein contents	Oil contents
转基因植株	1	39.8	22.4
Transgenic plants	2	40.4	22.3
	3	40.5	22.2
	4	39.1	23.7
	5	40.1	22.9
	6	40.2	22.6
	7	40.1	22.6
	8	39.2	23.5
	9	40.3	22.4
	10	41.2	22.1
转基因植株平均含量			
Mean content of transgenic plants		40.09	22.67
对照植株平均含量			
Mean content of non-transgenic plants		42.40	20.70

3 讨 论

转基因技术可以改造不同物种间的基因联系, 对基因进行优选, 定向转移, 对解决常规育种中的周期长、筛选量大等客观因素的影响起到了重要作用。如何提高转化效率和降低插入基因的拷贝数是制约大豆子叶节遗传转化发展的两个关键问题。受体材料、农杆菌菌种、工程菌液浓度、侵染时间等因素均是影响转化效率和拷贝数的重要因素。RNA 干扰技术中, 正义臂和反义臂之间往往加入几十至几百个碱基的内含子, 以增加沉默效果。在干涉片段的选择上具有极大的可塑性, 一般认为 90~1 800 bp 能达到比较好的沉默效果<sup>[12]</sup>。RNA 干扰技术在许多植物和动物上改良获得成功, 但应用到大豆的品质改良却少有报道。吴关庭等<sup>[13]</sup>将 *pepc* 基因插入到水稻基因组序列中, 获得了高脂肪含量的转基因水稻, 赵桂兰等<sup>[14]</sup>将反义 *pepc* 基因导入大豆基因组中, 获得了稳定的超高油(脂肪含量 25%)大豆转基因品系。通过前人的研究发现, *pepc* 基因增加了脂肪含量。本试验通过将 *pepc* 基因与 RNA 干扰载体结合, 目的侧重于 *pepc* 基因的强化表达。经过分子鉴定, 获得了稳定遗传的转基因后代, 我们将进一步



进行转基因株系后代品质方面的测定,以期获得稳定高效的高油脂转基因大豆新品种。

4 结 论

本试验利用大豆未成熟子叶节法将 RNAi-*pepc* 高油基因插入到栽培大豆品种沈农 9 号中,经 PCR 检测及 Southern 分析表明目的基因已整合到受体大豆基因组中。转基因大豆籽粒对比受体亲本油脂含量高出 9.51%,蛋白质含量下降 5.44%。转基因后代籽粒中,油脂含量增加趋势显著,油脂含量和蛋白质含量呈负相关。

参考文献

[1] Li R Z, Hatanaka T, Yu K, et al. Soybean oil biosynthesis: Role of diacylglycerol acyltransferases[J]. Functional & Integrative Genomics, 2013, 13(1): 99-113.

[2] 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: 806-811.

[3] 李加瑞, 赵伟, 李全梓, 等. *Waxy* 基因的 RNA 沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降[J]. 遗传学报, 2005, 32(8): 846-854. (Li J R, Zhao W, Li Q Z, et al. RNA silencing of *Waxy* gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat[J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(8): 846-854. )

[4] 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: 702-707.

[5] Feng Q, Qing Y, Wang C L, et al. Modification of plant height via RNAi suppression of OsGA20ox2 gene in rice[J]. Euphytica, 2007, 158(2):35-45.

[6] 郭志鸿, 张金文, 王蒂, 等. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 494-501. (Guo Z H, Zhang J W, Wang D. Using RNAi technology to pro-

duce high-amylose potato plants[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(2): 494-501. )

[7] Sugimoto T, Tanaka K, Monma M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53: 885-887.

[8] Sugimoto T, Kawasaki T, Kato T, et al. cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene from soybean [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 20: 743-747.

[9] 陈锦清, 郎春秀, 胡张华, 等. 反义 *PEP* 基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(4): 316-320. (Chen J Q, Lang C X, Hu Z, et al. Antisense *PEP* gene regulates to ratio of protein and lipid content in brassica napus seeds[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1999, 7(4): 316-320. )

[10] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 706-711.

[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] Sayaka H, Shin-ichiro O, Eri A, et al. The effects of spacer sequences on silencing efficiency of plant RNAi vectors[J]. The Plant Journal, 2001, 27(6): 581-590.

[13] 吴关庭, 郎春秀, 胡张华, 等. 应用反义 *PEP* 基因表达技术提高稻米脂肪含量[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 339-344. (Wu G T, Lang C X, Hu Z H, et al. Raising fat content in transgenic rice by anti-*PEP* gene transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(3): 339-344. )

[14] 赵桂兰, 陈锦清, 尹爱萍, 等. 获得转反义 *PEP* 基因超高油大豆新材料[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 792-796. (Zhao G L, Chen J Q, Yi A P, et al. Transgenic soybean lines harbouring anti-*PEP* gene express super-high oil content[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(6): 792-796. )