



大豆 *CHR2-1* 基因生物信息学分析与大豆遗传转化

崔慧敏, 曲 硕, 王金璐, 范素杰, 李素芳, 王丕武, 张 卓

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:大豆异黄酮是有助于人类身体健康的一类次级代谢产物,大豆查尔酮还原酶(chalcone reductase, CHR)基因是控制大豆异黄酮主要组分大豆苷元生物合成的关键酶之一。为拓宽大豆 CHR 研究范围,促进异黄酮代谢机理研究,进而推进大豆品种改良,本研究利用基因工程技术对大豆 *CHR2-1* 基因进行克隆及生物信息学分析,并且构建植物表达载体 pCAMBIA3301-*CHR2-1*,通过农杆菌介导法将目的基因整合到东农 50 受体大豆基因组中,PCR 筛选鉴定获得大豆转化植株。结果表明:*GmCHR2-1* 基因编码的蛋白属于非分泌型蛋白,可能在细胞质中发挥主要功能,属于非跨膜类蛋白并不在细胞中发生迁移;该蛋白存在 22 个潜在磷酸化位点,其中苏氨酸(Thr)4 个、丝氨酸(Ser)18 个;该蛋白由 α -螺旋(40.63%)、延伸链(14.29%)、 β -转角(4.13%)和无规则卷曲(40.95%)4 个部分组成。PCR 鉴定表明,转化植株基因组包含草丁膦抗性基因 *Bar*、终止子 *NOS* 和启动子 35S 位点,初步确定已将 *GmCHR2-1* 转入到东农 50 大豆品种基因组中,并获得 T₂ 阳性植株转化苗 12 株。

关键词:大豆;查尔酮还原酶;*GmCHR2-1*;生物信息学分析;遗传转化;东农 50

Bioinformatics Analysis of Soybean *CHR2-1* Gene and Its Genetic Transformation to Soybean

CUI Hui-min, QU Shuo, WAN Jin-lu, FAN Su-jie, LI Su-fang, WANG Pi-wu, ZHANG Zhuo

(College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Soybean isoflavones is a class of secondary metabolites that contribute to human health. Soybean chalcone reductase (CHR) gene is one of the key enzymes controlling the biosynthesis of daidzein, the main component of soybean isoflavones. In order to broaden the research types of soybean CHR, promote the research of isoflavone metabolism mechanism, and then promote the improvement of soybean varieties, this study used genetic engineering technology to perform gene cloning and bioinformatics analysis of *GmCHR2-1*. And then we constructed a recombinant plant expression vector pCAMBIA3301-*CHR2-1*, transformed the vector into the Dongnong 50 soybean receptor through agrobacterium-mediated method, and identified regenerated soybean transformed plants with PCR screening. The results showed that the protein encoded by the *GmCHR2-1* gene is a non-secretory protein and may play a major role in the cytoplasm. The protein is a non-transmembrane protein and does not migrate in the cell. The protein has 22 potential phosphorylation sites, including four threonine(Thr), and eighteen serine(Ser) composed of 40.63% α -helix, 14.29% extended chain, 4.13% β -turn and 40.95% random curl. PCR identified that the genome of the transformed plant contained the glufosinate resistance gene *Bar*, the terminator *NOS* and the promoter 35S site, and it was preliminarily determined that *GmCHR2-1* was transferred into the genome of Dongnong 50 soybean variety, and we finally obtained 12 T₂ positive plants.

Keywords: soybean; chalcone reductase; *GmCHR2-1*; bioinformatics; genetic transformation; Dongnong 50

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]起源于中国,种子中含有多种次级代谢所产生的营养物质,如大豆异黄酮和卵磷脂等。大豆异黄酮的主要组分大豆苷元在大豆不同时期和不同部分中的含量均有差异,在苗期胚轴部位其含量最高可以达到 30%,可以提高大豆对于病原微生物的抗性^[1-3]。近年来,大豆异黄酮生物学活性受到了各国科学研究人员的高度关注,研究表明大豆苷元具有植物雌激素功能和抗氧化功能。高丹丹等^[4]研究发现大豆苷元能够增强碱性磷酸酶的活性,进而促进人成骨细胞

分化成熟,对防治骨质疏松具有明显作用。因此利用分子生物学手段改良大豆苷元含量对提高大豆食用价值及抗病性具有重要意义。

查尔酮还原酶(chalcone reductase, CHR)是大豆苷元合成中的关键酶之一。查尔酮还原酶能与查尔酮合成酶结合在一起共同催化合成异甘草素^[5],而异甘草素是大豆苷元合成的必要前体物质。吴楠等^[6]克隆 CHR 基因并进行遗传转化,高效液相色谱法检测结果表明转化后的植株中大豆苷元前体物质异甘草素的含量降低 38.7%,证明 CHR

收稿日期:2021-10-20

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31801381);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190935KJ)。

第一作者:崔慧敏(1998—),女,硕士研究生,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail:1830456861@qq.com。

通讯作者:张卓(1983—),男,博士,副教授,主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail:zho1018@163.com。

基因在大豆苷元合成途径中发挥关键作用。张卓等^[7]从大豆中分离出多个新发现的 CHR 基因并转化至模式植物中,通过实时荧光定量 PCR 和高效液相色谱技术分析了基因表达水平和催化产物含量。刘江等^[8]在大豆中成功克隆出第 14 号染色体上的 CHR 基因,通过与豆科中其他 CHR 基因比较发现 CHR 基因以多基因形式同时存在,共同联合调节合成异甘草素,因此分析不同类型的 CHR 基因可以明确其在催化过程中的效率及相互调控关系。钱丹丹等^[9]利用 SOE-PCR 技术将查尔酮合酶和查尔酮异构酶的两个编码基因融合,并构建了原核表达载体和真核表达载体。张卓^[10]研究表明,查尔酮还原酶相当于大豆苷元合成中的限速酶,该基因在植物体内表达量较低,当查尔酮还原酶含量高时,酶的催化效率也高,所得产物大豆苷元的含量相应提高。

目前通过传统育种方法改良大豆苷元含量的主要困难有优良种质资源少、育种周期长及改良方向不固定等,本研究对 *GmCHR2-1* 基因进行生物信息学分析,研究其对大豆苷元生物合成效率的影响。利用基因工程技术手段,以植物表达载体 pCAMBIA3301 作为骨架构建 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 过表达载体,并且通过农杆菌介导大豆子叶节进行遗传转化,旨在为大豆苷元合成途径代谢机理研究及高异黄酮含量大豆品种改良提供理论和材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种东农 50,由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌感受态 DH5 α 、根瘤农杆菌菌株 EHA105、植物表达载体 pCAMBIA3301,由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.3 主要仪器 高速台式离心机 (Eppendorf, 5810R); 振荡器 (UVS-1); PCR 仪 (东胜龙, ETC811);电泳仪 (LIUYI, DYY-12C); 孵育器 (杭州米欧, DTC-100); 凝胶成像仪 (东胜龙, Bio-Imaging Systems910); 分子杂交炉 (Hybaid Limited, HBMOVCSY220); 电子天平 (TOMS); pH 测定器 (PHS-3C); -80 ℃ 冰箱 (Hair); 恒温水浴锅 (北京长风); 光照恒温培养箱 (LGZ); 控温摇床 (Stab

Mini); 高压蒸汽灭菌锅 (H29144); 超净工作台 (BBS-H1100) 等。

1.1.4 主要试剂 PCR 特异性扩增相关试剂 (Fermentas); 植物 DNA 提取试剂盒 (康为世纪, CW0553); DNA 凝胶纯化试剂盒 (Axygen); 质粒 DNA 提取试剂盒 (威格拉斯); 10 × Loadingbuffer 和 DL-2000 DNA Marker (TaKara); *Bgl* II 和 *BstE* II (Seymour Flight Company); 无缝克隆试剂盒 (中泰美和); 其他试剂 (北京鼎国, 分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行 Blast 分析, 获得 *GmCHR2-1* 基因序列。使用 ProtScale 分析 *GmCHR2-1* 基因编码蛋白质的亲疏水性; 以 Hphob/ Kyte & Doolittle 为预测标准, 使用 TMHMM 分析预测蛋白质跨膜结构; 利用 Signalp 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析预测蛋白质信号肽; 利用 PSORT II 网站 (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 分析预测蛋白质亚细胞定位; 利用 NetPhos 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 在线分析蛋白质磷酸化位点; 利用 SOPMA 网站 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白氨基酸序列并分析蛋白质二级结构; 使用 SWISS-MODEL 软件分析预测蛋白质三级结构; 利用 STRING 网站 (<https://cn.string-db.org/>) 进行蛋白质互作分析。

1.2.2 目的片段获得 使用植物 DNA 提取试剂盒提取大豆吉农 17 叶片基因组 DNA, 使用 Primer 5.0 设计特异性引物 *GmCHR2-1F* 和 *GmCHR2-1R* (表 1), PCR 扩增 *GmCHR2-1* 基因。反应体系为 25 μ L: 12.5 μ L Mix、上下游引物 (*CHR2-1-F*、*CHR2-1-R*) 各 1 μ L、模板 1 μ L、ddH₂O 9.5 μ L。扩增反应条件见表 2。扩增产物使用 0.8% 琼脂糖凝胶 220 V、110 mA 电泳, 利用 DNA 凝胶纯化试剂盒纯化并送至长春市库美生物公司测序。将纯化的 DNA 片段与 pMD18T 载体连接, 获得 pMD18T-*CHR2-1* 质粒。采用热激法将 pMD18T-*CHR2-1* 质粒转化至大肠杆菌 DH5 α , 将转化后的大肠杆菌涂布在含有氨苄霉素 (Amp) 的 LB 培养基中, 37 ℃ 过夜培养后挑取单菌落于液体 LB + Amp 培养基 145 r·min⁻¹、37 ℃ 培养 15 h, 菌液浑浊后提取质粒, 将质粒送往长春市库美生物公司进行测序。

表 1 引物序列信息
Table 1 The primer sequence information

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	酶切位点 Restriction sites	目的片段长度 Target fragment size/bp
GmCHR2-1F	AGCTAGTTGGAGTGCAAGGGAC	<u>actcttgaccatggtagatct</u> GAGCTAGTTGGAGTGCAAGGGAC	711
GmCHR2-1R	ACAATGATAGCATCCACCAAAG	<u>ggggaaattcgagctggtcacc</u> ACAATGATAGCATCCACCAAAG	
35S	TAGAGGACCTAACAGAAC		500
35As	CCGTGTTCTCTCCAAATG		
BarS	TCAAATCTCGGTGACGGGC		552
BarAs	ATGAGCCCAGAACGACGC		
NosS	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG		192
NosAs	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA		

注:划线处为酶切位点。
Note: The underlined point is the restriction site.

表 2 PCR 特异性扩增条件
Table 2 The PCR specific amplification conditions

基因名称 Gene name	预变性 Pre-denaturation	变性 Denaturation	退火 Annealing	延伸 Extend	再延伸 Re-extension	循环次数 Cycle number
<i>CHR2-1</i>	94 ℃, 10 min	94 ℃, 45 s	52 ℃, 45 s	72 ℃, 45 s	72 ℃, 10 min	35
<i>Bar</i>	94 ℃, 5 min	94 ℃, 35 s	58 ℃, 30 s	72 ℃, 35 s	72 ℃, 8 min	30
35S	94 ℃, 5 min	94 ℃, 40 s	53 ℃, 35 s	72 ℃, 30 s	72 ℃, 8 min	30
<i>NOS</i>	94 ℃, 5 min	94 ℃, 40 s	52 ℃, 30 s	72 ℃, 40 s	72 ℃, 8 min	30

1.2.3 大豆 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 植物表达载体构建 使用 0.8% 琼脂糖凝胶对 PCR 反应特异性扩增的 *CHR2-1* 基因片段进行电泳,纯化回收片段,利用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 限制性内切酶对 *CHR2-1* 基因片段与基础植物表达载体 pCAMBIA3301 进行双酶切及片段回收。取 12 μL *CHR2-1* 基因片段、4 μL 双酶切载体、1 μL *T*₄连接酶、2 μL *T*₄缓冲液和 1 μL ddH₂O 混合,25 ℃ 恒温孵育器中反应过夜,获得 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 载体(图 1)。转化大肠杆菌 DH5α 并于 -80 ℃ 保存。

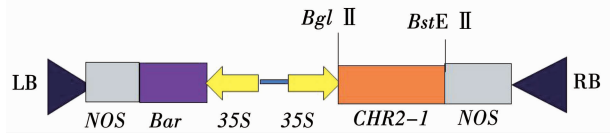


图 1 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 植物表达载体结构示意图
Fig. 1 The schematic diagram of the pCAMBIA3301-*CHR2-1* vector

1.2.4 植物表达载体鉴定 将含有 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 的大肠杆菌涂布在 LB + Kan(卡那霉素)固体培养基上,在恒温培养箱中 37 ℃ 活化 15 h,挑取单菌落至含有 5 mL LB + Kan 液体培养基的试管中,放置于 170 r·min⁻¹、37 ℃ 恒温摇床中培养 15 h,提取菌液中的质粒 DNA 并进行目的基因 PCR 扩增,使用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 进行双酶切验证。同时将 pCAMBIA-3301-*CHR2-1* 质粒送至长春市库美生物

技术有限公司进行测序。
1.2.5 大豆遗传转化 采用农杆菌介导的大豆子叶节下胚轴侵染法^[11]将 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 质粒导入大豆东农 50 中,操作过程包括大豆萌发、侵染菌液的制备、子叶节外植体制备和侵染、共培养、恢复培养、筛选培养、伸长培养和生根培养等步骤。
1.2.6 转基因后代初步检测 使用植物 DNA 提取试剂盒提取 T₂代幼嫩叶片 DNA 基因组。使用特异性引物(表 1)PCR 扩增筛选标记 *Bar*(草铵膦)基因、启动子 35S 基因和终止子 *NOS* 基因,以 pCAMBIA3301-*CHR2-1* 质粒作为阳性对照,未转化东农 50 植株作为阴性对照。各基因的 PCR 反应条件如表 2 所示。PCR 产物使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收特异性扩增片段并测序鉴定。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

2.1.1 蛋白信号肽预测和亚细胞定位 经序列比对获得 *GmCHR2-1* 基因序列,GenBank 登录号为 X55730.1。分析结果显示,*GmCHR2-1* 基因 CDS 编码蛋白功能区约为 711 bp,编码含有 237 个氨基酸残基的蛋白产物,分子量为 35 489.8 Da,理论等电点 6.32。*GmCHR2-1* 蛋白无信号肽结构,说明该蛋白属于非分泌型蛋白(图 2)。亚细胞定位结果如图 3 所示,说明该蛋白可能定位在细胞质上。

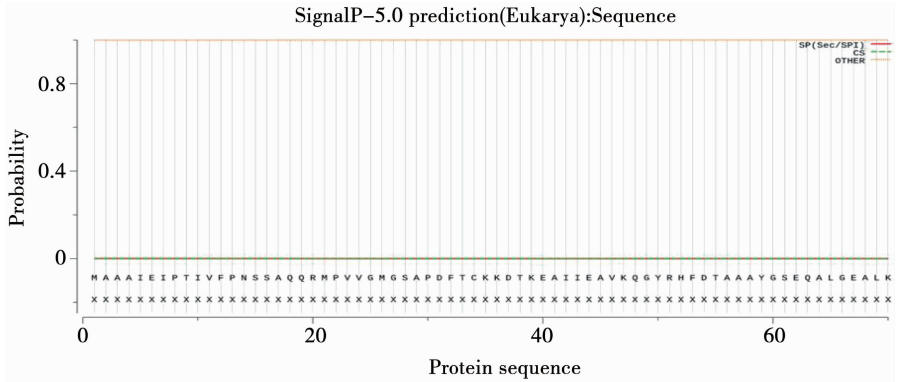


图2 GmCHR2-1 蛋白信号肽预测

Fig.2 The signal peptide prediction of GmCHR2-1 protein

k = 9/23

56.5 %: cytoplasmic
21.7 %: nuclear
4.3 %: endoplasmic reticulum
4.3 %: vacuolar
4.3 %: vesicles of secretory system
4.3 %: mitochondrial
4.3 %: cytoskeletal

>> prediction for QUERY is cyt (k=23)

图3 GmCHR2-1 蛋白亚细胞定位预测

Fig.3 The subcellular localization prediction of the GmCHR2-1 protein

2.1.1.2 蛋白亲疏水性研究与跨膜区域分析 预测结果显示,蛋白多处出现低峰值,其中 263 ~ 277 aa 处出现了明显的低峰,最低峰位于第 270 aa 位置,这个位置上的氨基酸亲水性最强;在第 214 位置上出现了最高峰,这个位置的氨基酸疏水性最强。整条多肽链上亲水性氨基酸占 59.93%,疏水性氨基酸占 40.07%,总体表现为亲水性,由此可知此蛋白是可溶性蛋白(图 4)。GmCHR2-1 蛋白质没有跨膜结构(图 5),为非跨膜类蛋白,并不在细胞中发生迁移。

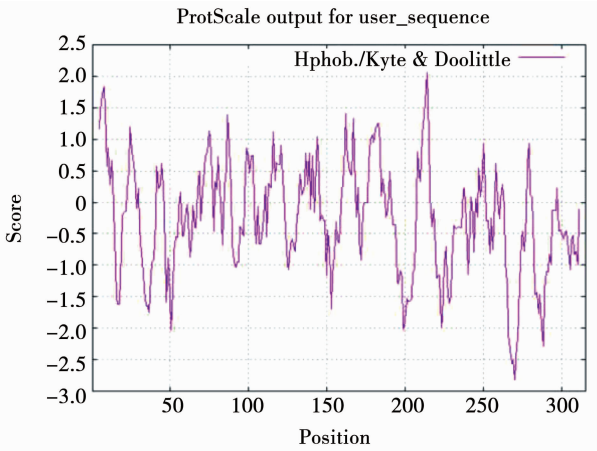


图4 GmCHR2-1 蛋白亲疏水性

Fig.4 The hydrophilicity and hydrophobicity of GmCHR2-1 protein

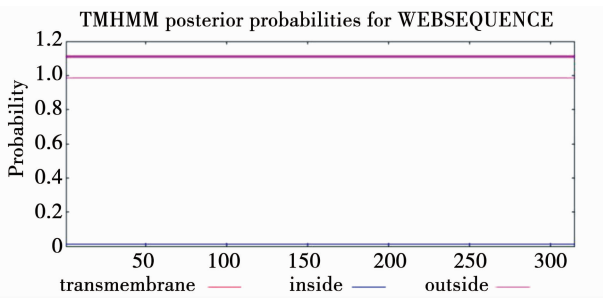


图5 GmCHR2-1 蛋白跨膜区域

Fig.5 The transmembrane region of GmCHR2-1 protein

2.1.1.3 蛋白磷酸化位点预测 预测结果显示, GmCHR2-1 蛋白存在 22 个潜在磷酸化位点,其中 4 个苏氨酸(Thr)位点,18 个丝氨酸(Ser)位点,无酪氨酸(Tyr)位点(图 6)。

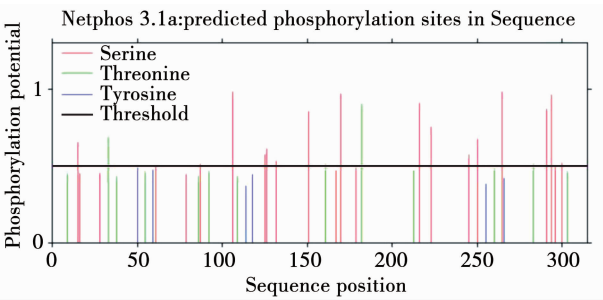


图6 GmCHR2-1 蛋白磷酸化位点预测

Fig.6 The prediction of the phosphorylation site on GmCHR2-1 protein

2.1.1.4 蛋白结构分析 如图 7 和图 8 所示, GmCHR2-1 蛋白由 α -螺旋(40.63%)、延伸链(14.29%)、 β -转角(4.13%)和无规则卷曲(40.95%)4 种结构组成, α -螺旋和无规则卷曲占比较高。GmCHR2-1 蛋白三级结构与二级结构的预测结果高度一致,蛋白的三维结构与拟南芥同源蛋白的同源性高达 87.52%。

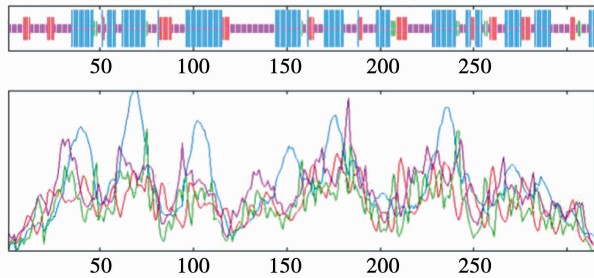


图 7 GmCHR2-1 蛋白二级结构预测

Fig. 7 The prediction of the secondary structure of GmCHR2-1 protein

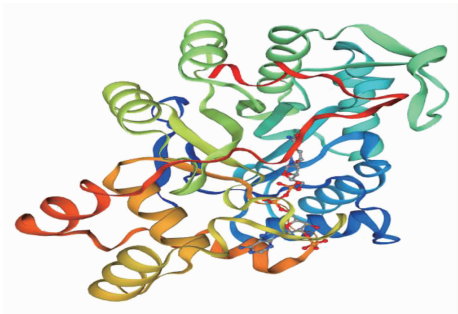


图 8 GmCHR2-1 蛋白三级结构预测

Fig. 8 The prediction of tertiary structure of GmCHR2-1 protein

2.1.5 GmCHR2-1 蛋白互作预测 预测结果显示,转肉桂酸 4 - 单加氧酶 (C4H)、4-coumarate-COA ligase2(4CL4,属于依赖 ATP 的 AMP 结合酶家族)、过氧化氢酶-1 (CAT1)、过氧化氢酶-3 (CAT3)、过氧化氢酶-4 (CAT4)、查尔酮-黄酮异构酶 1A (CHI) 等有互作关系 (图 9)。结果说明 GmCHR2-1 蛋白可能在疾病胁迫响应中发挥重要的作用和功能。

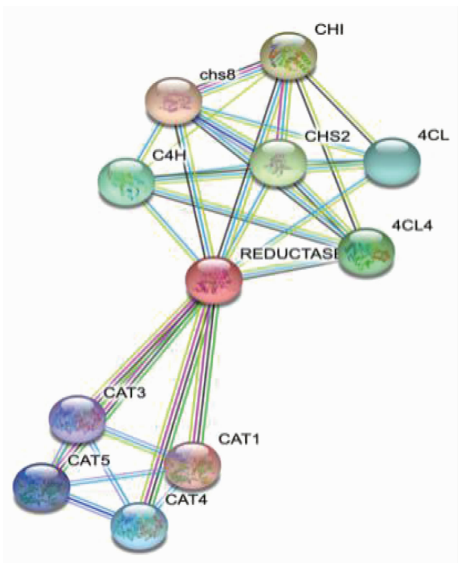
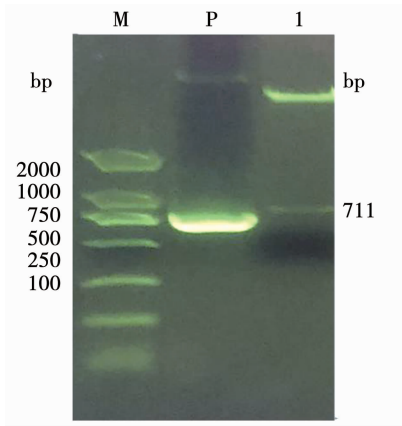


图 9 GmCHR2-1 蛋白互作预测

Fig. 9 The protein interaction analysis of GmCHR2-1 protein

2.2 GmCHR2-1 基因转化大豆

2.2.1 载体构建 所构建的载体经 Bgl II和 BstE II 限制性内切酶双酶切获得约 711 bp 的目标基因片段,与克隆载体双酶切片位置相同 (图 10),说明 pCAMBIA-3301-CHR2-1 过表达载体构建成功。



注: M. DL2000 marker; P. pCAMBIA-3301 质粒; 1. GmCHR2-1 基因双酶切产物。

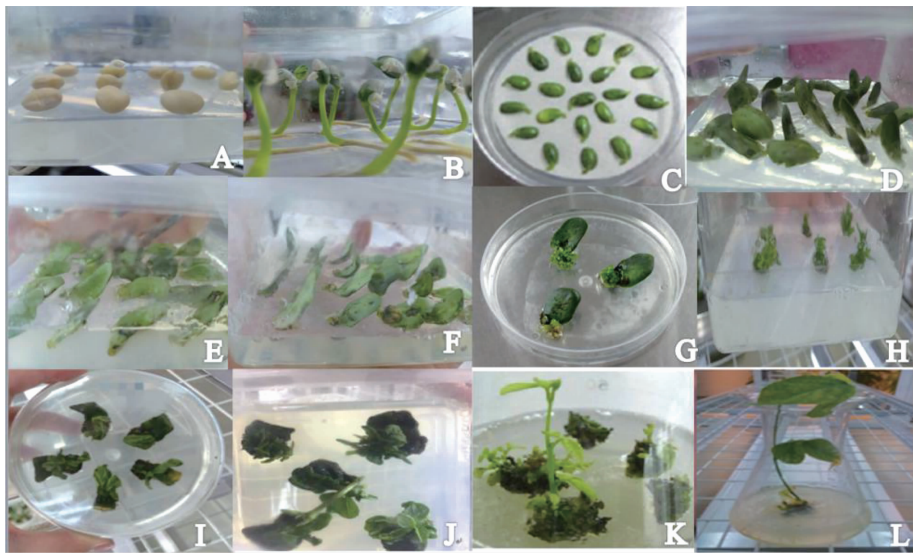
Note: M. DL2000 marker; P. pCAMBIA-3301 plasmid; 1. Double digestion product of GmCHR2-1 gene.

图 10 pCAMBIA-3301-CHR2-1 载体双酶切验证

Fig. 10 The double restriction digestion verification of pCAMBIA-3301-CHR2-1 vector

2.2.2 大豆遗传转化 农杆菌介导大豆子叶节下胚轴侵染遗传转化过程包括:大豆萌发、共培养、恢复培养、筛选培养、伸长培养、生根培养环节 (图 11)。将转化后材料炼苗处理后,移栽到花盆中,人工气候室内进行培养直至结出种子。经过 PCR 初步检测得到 3 株 T₀代阳性植株,共收获 27 粒种子。

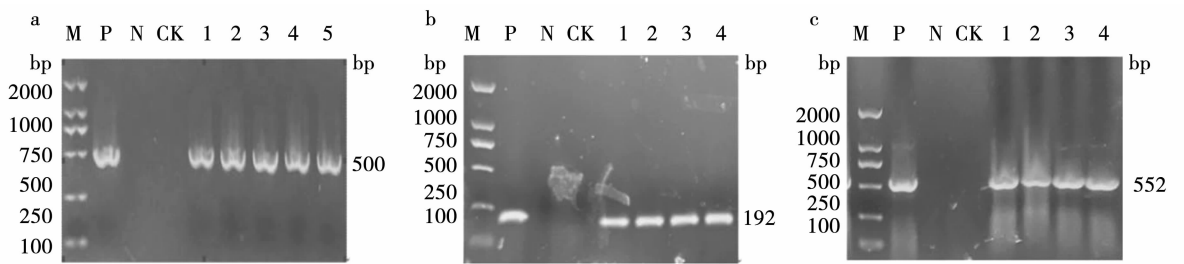
2.2.3 T₂代转基因植株获得及检测 检测结果如图 12 所示,T₂叶片基因组 DNA 特异性扩增的条带长度与目的基因长度一致,可以初步确定该基因已经整合到大豆基因组中,共获得 12 株 T₂阳性植株,转化植株的阳性率达 6%。



注: A ~ B. 萌发和预培养; C ~ E. 共培养; F ~ G. 恢复培养; H ~ I. 筛选培养; J ~ K. 伸长培养; L. 生根培养。
Note: A-B. Germination and pre-culture; C-E. Co-culture; F-G. Recovery culture; H-I. Screening culture; J-K. Elongation culture; L. Rooting culture.

图 11 农杆菌介导转化 pCAMBIA-3301-*CHR2-1* 基因至大豆东农 50

Fig. 11 The transformation of pCAMBIA-3301-*CHR2-1* to soybean Dongnong 50 mediated by agrobacterium



注: a. 35S; b. NOS; c. Bar; M. DL2000 marker; P. 阳性对照质粒; N. 阴性对照; CK. 未转化植株; 1 ~ 5. 检测样品。
Note: a. 35S; b. NOS; c. Bar; M. DL2000 marker; P. Positive control plasmid; N. Negative control; CK. Untransformed plants; 1-5. The test samples.

图 12 T₂代转基因阳性植株检测

Fig. 12 The detection of T₂ transgenic plants

3 讨论

目前大豆异黄酮的研究备受关注,许多研究人员想通过基因工程改良大豆苷元含量,以此提高大豆中异黄酮的含量与营养品质。然而研究表明异黄酮的含量受其合成代谢途径中多个酶的共同影响^[12-13],因此常规育种很难在不改变其他性状的基础上定向改良异黄酮含量。同时,同一品种生长在不同环境中,其异黄酮含量也会有显著差别。张大勇等^[14]种植大豆异黄酮含量不同的大豆品种,研究发现基因型与种植地点和种植时间相比,对于大豆异黄酮的影响更大,证明在不改变其他性状的条件下,通过常规育种的手段实现单独提高大豆苷元的合成量是十分困难的。因此,有必要通过生物技术手段提高异黄酮合成途径关键酶基因的表达量,加速异黄酮合成途径中各代谢物质的合成与积累,从

而提高经济产量中异黄酮物质的占比。

魏洪波等^[15]以 pBI121 为基础载体构建由 35S 启动子驱动的 GmCHR 表达载体,以大豆吉农 28 为受体材料,成功获得 17 株转化植株。张超等^[16]将目的基因 *CHR3* 连接到原核生物大肠杆菌 pET28a 载体上,遗传转化到大肠杆菌 BL21 中构建原核表达载体,尝试通过原核表达系统催化合成大豆苷元。但大豆苷元合成路径涉及多个酶的催化反应,目前尚未有原核系统催化合成大豆苷元的报道。更多的研究集中在改良大豆自身的大豆苷元含量,吴楠等^[6]克隆 *GmCHRI* 基因并构建了 pCB-*CHRI* 植物重组表达载体,并将其转化到吉农 28 大豆品种中,但尚未见后续报道。

本研究的转基因受体东农 50 是遗传转化常用受体材料,其特点是转化效率高,丛生芽分化数量多,是通过农杆菌介导法进行遗传转化的优秀材

料。谭佳琪^[17]以东农 50 为受体材料,转入 *TaDREB3a* 基因并且得到 5 个 T₀转基因大豆品系,并且东农 50 转入 *TaDREB3a* 基因后,在芽期、苗期、开花期均有一定的耐盐碱效果,说明东农 50 不但品质优良而且转化后基因稳定性高。本研究后续计划检测 *GmCHR2-1* 基因在 T₃代株系的根、茎、叶等不同部位的相对表达量,并分析大豆苷元等异黄酮合成途径相关组分含量变化情况及其他主要农艺性状表现,从而筛选最优株系,以望获得优质的大豆新品系。

4 结论

GmCHR2-1 基因编码含有 315 个氨基酸残基的蛋白产物,分子量为 35 489.8 Da,理论等电点 6.32;该蛋白无信号肽结构,为非分泌型蛋白,在细胞质上发挥主要功能;为非跨膜类蛋白,不在细胞中发生迁移;是一种可溶性蛋白;存在 22 个潜在磷酸化位点,二级结构中 α -螺旋和无规则卷曲占比较高。以 pCAMBIA3301 植物载体作为基础载体,构建过表达植物载体 pCAMBIA-3301-*CHR2-1*,将目的基因 *GmCHR2-1* 转入东农 50 大豆品种基因组中,最终获得 T₂阳性植株转化苗 12 株。

参考文献

[1] 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(1): 61-64. (MAO J Q, MI H M. Research progress of soybean isoflavones[J]. Chinese and Herbal Medicine, 2000, 31(1): 61-64.)

[2] SUBRAMANIAN S, GRAHAM M Y, YU O, et al. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes lead to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*[J]. Plant Physiology, 2005, 137(4): 1345-1353.

[3] SCREEVIDYA V S, SRINIVASA RAO C, SULLIA S B, et al. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(9): 1957-1969.

[4] 高丹丹, 张玲玲. 大豆苷元对人成骨样 MG-63 细胞分化的影响及其分子机制研究[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(3): 10-14. (GAO D D, ZHANG L L. The effect of daidzein on the differentiation of human osteoblast-like MG-63 cells and its molecular mechanism[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2020, 32(3): 10-14.)

[5] WELL E R, SCHRODER G, SCHILTZ E, et al. Induced plant responses to pathogen attack analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean[J]. European Journal of Biochemistry, 1991, 196(2): 423-430.

[6] 吴楠, 王丕武, 李丹, 等. 大豆查尔酮还原酶基因 *CHRI* 的功能研究[J]. 遗传, 2014, 36(7): 707-712. (WU N, WANG P W, LI D, et al. Functional study of soybean chalcone reductase gene *CHRI*[J]. Inheritance, 2014, 36(7): 707-712.)

[7] 张卓, 刘振库, 黄卓, 等. 大豆查尔酮还原酶基因(*Gmchr4*)的克隆与功能鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(6): 720-727. (ZHANG Z, LIU Z K, HUANG Z, et al. Cloning and functional identification of soybean chalcone reductase gene (*Gmchr4*)[J]. The Chinese Journal of Oil Crops, 2014, 36(6): 720-727.)

[8] 刘江, 陈沛, 邢光南, 等. 大豆查尔酮还原酶基因 *GmCHR* 的克隆与植物表达载体构建[J]. 大豆科学, 2013, 32(2): 139-142. (LIU J, CHEN P, XING G N, et al. Cloning of soybean chalcone reductase gene *GmCHR* and construction of plant expression vector [J]. Soybean Science, 2013, 32(2): 139-142.)

[9] 钱丹丹, 龚德顺, 焦丽, 等. 大豆异黄酮合成关键酶基因的克隆及表达分析[J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 743-748. (QIAN D D, GONG D S, JIAO L, et al. Cloning and expression analysis of key enzyme genes in soybean isoflavone synthesis [J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 743-748.)

[10] 张卓. 大豆查尔酮还原酶基因的克隆和功能分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014: 20-30. (ZHANG Z. Cloning and functional analysis of soybean chalcone reductase gene [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014: 20-30.)

[11] 邢永新. 大豆 BT 基因抗虫转化体的鉴定与评价[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020: 37-47. (XING Y X. Identification and evaluation of soybean BT gene insect-resistant transformants [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020: 37-47.)

[12] BOMATI E K, AUSTIN M B, BOWMAN M E, et al. Structural elucidation of chalcone reductase and implications for deoxychalcone biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(34): 30496-30503.

[13] LIU G Y. Isolation, sequence identification and tissue expression profile of two novel soybean (*Glycine max*) genes-vestitone reductase and chalcone reductase[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(7): 1991-1994.

[14] 张大勇, 李文滨, 李冬梅, 等. 大豆叶片异黄酮含量与 PAL 基因相对表达量的关系[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 670-673. (ZHANG D Y, LI W B, LI D M, et al. Relationship between isoflavone content in soybean leaves and relative expression of PAL gene[J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 670-673.)

[15] 魏洪波, 王丕武, 张卓, 等. 大豆查尔酮还原酶 *GmCHR* 基因的克隆及其在烟草中的表达[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(5): 546-553. (WEI H B, WANG P W, ZHANG Z, et al. Cloning of soybean chalcone reductase *GmCHR* gene and its expression in tobacco[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36(5): 546-553.)

[16] 张超, 王丕武, 张卓. 大豆查尔酮还原酶 3 基因 (chr3) 的克隆及体外催化活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(9): 89-96. (ZHANG C, WANG P W, ZHANG Z. Cloning and *in vitro* catalytic activity analysis of soybean chalcone reductase 3 gene (chr3) [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2015, 43(9): 89-96.)

[17] 谭佳琪. 转 *TaDREB3a* 基因大豆品系的耐碱性鉴定[D]. 沈阳: 东北农业大学, 2019: 25-35. (TAN J Q. Identification of alkaline tolerance of transgenic soybean lines with *TaDREB3a* gene [D]. Shenyang: Northeast Agricultural University, 2019: 25-35.)