



# 大豆 *DGAT1/2* 基因表达分析和敲除靶点设计

杨 滢,陈丽玉,廖春梅,孔凡江

(广州大学 生命科学院/分子遗产与进化创新研究中心,广东 广州 510006)

**摘 要:**二酰甘油酰基转移酶(DGAT)是将甘油二酯(DAG)催化成甘油三酯(TAG)的限速酶。TAG 是植物种子油脂的主要储存形式,人体内 TAG 过高不仅会造成高血脂、高血糖,还会使肝脏功能超负荷代谢,导致肝脏功能受损,血清转氨酶含量增加并最终形成脂肪肝,而 DAG 则更有益于人体健康。为给创制大豆 *dgat* 突变体和解析 *DGAT1/2* 基因功能奠定研究基础,本研究利用定量 PCR 检测 8 个 *GmDGAT1/2* 基因(*DGAT1a*、*DGAT1b*、*DGAT1c*、*DGAT2a*、*DGAT2b*、*DGAT2c*、*DGAT2d* 和 *DGAT2e*)的表达模式,通过烟草叶片瞬时表达方法检测 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 表达对烟草叶片中油脂含量的影响,设计 *GmDGAT1/2* 基因敲除靶点并构建 CRISPR/Cas9 基因敲除载体,并通过大豆离体毛根转化试验检测基因敲除载体的有效性。结果表明:*GmDGAT1/2* 在大豆的不同组织中均有表达,在种子中的表达丰度高于其他组织,且在完熟期(R8)的种子中表达丰度最高。瞬时表达 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 能使烟草叶片油脂含量分别提高 32.53% 和 25.90%。另外,获得了含 *DGAT1a*、*DGAT1c* 的有效编辑靶点载体 *GmDGAT1-Cas9*,含 *DGAT2a*、*DGAT2b*、*DGAT2c*、*DGAT2d* 和 *DGAT2e* 的有效编辑靶点载体 *GmDGAT2-Cas9*。

**关键词:**大豆;*DGAT1*;*DGAT2*;基因表达;烟草叶片瞬时表达;CRISPR/Cas9;敲除靶点;大豆毛根转化

## Gene Target Design and Functional Analysis of Soybean *DGAT1/2* Genes

YANG Cen, CHEN Li-yu, LIAO Chun-mei, KONG Fan-jiang

(Innovation Center of Molecular Genetics and Evolution, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Diacylglycerol transferase (DGAT) is a speed-limiting enzyme that catalyzes triacylglycerol (TAG) from diacylglycerol (DAG). TAG is the main storage form of plant seed oil. Excessive TAG in human will only not cause hyperlipidemia and hyperglycemia, but also overload metabolism of liver function, resulting in impaired liver function, increased serum transaminase content and eventually formed fatty liver. While, DAG is more beneficial to human health. In order to lay the groundwork of acquire the mutant and understanding the function of *DGAT1/2* genes, using quantitative PCR to detect tissue expression patterns of the eight *GmDGAT1/2* genes (*DGAT1a*, *DGAT1b*, *DGAT1c*, *DGAT2a*, *DGAT2b*, *DGAT2c*, *DGAT2d* and *DGAT2e*), expressed *GmDGAT1c* and *GmDGAT2b* separately in tobacco leaves. And we constructed the knockout vectors of *DGAT1/2* and transformed them into soybean hair roots for target detection by CRISPR/Cas9 technology. The results showed that *GmDGAT1/2* were expressed in all detected tissues of soybeans, and the abundance of expression in seeds was higher than that in other tissues. And the expression of them in the seeds was the highest at seeds of mature stage (R8). The fat content of tobacco leaves, which expressed *GmDGAT1c* and *GmDGAT2b* separately was increased by 32.53% and 25.90%. In addition, we obtained vector *GmDGAT1-Cas9* containing effective targets *DGAT1a* and *DGAT1c*, and vector *GmDGAT2-Cas9* containing effective targets *DGAT2a*, *DGAT2b*, *DGAT2c*, *DGAT2d* and *DGAT2e*.

**Keywords:** soybean; *DGAT1*; *DGAT2*; gene expression; transient expression in tobacco leaves; CRISPR/Cas9; knockout target; soybean hair root transformation

大豆是重要的油料作物,其脂肪含量达 20% 左右,其中包含大量的油酸和亚油酸,以及棕榈酸、硬脂酸、磷脂等,其中饱和脂肪酸含量高达 80%,是一种十分健康的植物用油<sup>[1]</sup>,在中国的食用率达到 50%<sup>[2]</sup>。油脂主要的生理功能是提供能量和贮存能量,在体内油脂能够提供的能量大于蛋白质和糖类所能提供的能量<sup>[3]</sup>。TAG 是人体中储存能量的成分之一,但是当体内的 TAG 过高时会引起高血脂、高血糖,还会使肝脏功能超负荷代谢,导致肝脏功能受损,血清转氨酶含量增加,最终形成脂肪

肝<sup>[4-6]</sup>。DAG 被用作食品添加剂的主要成分时,能够提高食品保质期。DAG 也可以替代普通油脂制造低热量食品,促进人体分泌瘦素,在肠道中影响肠道微生物并引起其他器官功能性变化,抑制脂肪的吸收,从而抑制体重增加,预防动脉血栓形成<sup>[7]</sup>。因此提高植物种子中有益油脂的积累近年来引起研究人员高度关注<sup>[8]</sup>。植物中 TAG 合成涉及大量的基因及其编码的酶类,改变其中任何一个关键酶都可能改变植物含油量或者油脂成分<sup>[9]</sup>,所以研究油脂合成过程中的每一个环节都具有重大意义。

收稿日期:2022-01-07

基金项目:广东省基础与应用基础研究重大项目(2019B030302006)。

第一作者:杨滢(1997—),女,硕士研究生,主要从事大豆油脂合成相关基因研究。E-mail:15908495651@163.com。

通讯作者:孔凡江(1972—),男,博士,教授,主要从事大豆光周期调控产量与适应性机制研究。E-mail:kongfj@gzhu.edu.cn。

与油脂合成相关的酶主要有二酰甘油酰基转移酶(DGAT)、脂肪酸脱氢酶(FAD)、锌指蛋白等。在油菜和玉米中已证明 DGAT 的过量表达能够提高油菜籽和玉米中的油脂含量<sup>[10]</sup>;FAD 能够催化油酸脱氢形成亚油酸,在棉花、油菜和大豆中抑制 FAD 的作用能够提高油酸的含量<sup>[11]</sup>;GmZF392 锌指蛋白通过与启动子中富含 TG 和 TA 序列的二联体顺式元件结合,激活脂质生物合成途径中基因的表达,促进转基因拟南芥和转基因大豆籽粒的油脂积累<sup>[12]</sup>。

植物中油脂合成过程主要包括:脂肪酸的从头合成、脂肪酸碳链脱饱和、脂肪酸碳链延长、TAG 的生物合成。DGAT 主要作用于 TAG 的生物合成<sup>[13]</sup>,TAG 的合成主要是在内质网中进行,由 L- $\alpha$ -磷酸甘油在甘油磷酸转酰酶的作用下形成溶血磷酸酯,再经过甘油磷酸转酰酶的作用形成磷脂酸<sup>[14-15]</sup>,磷脂酸在磷脂酸磷酸酶催化下进行去磷酸化得到甘油二酯(DAG),DAG 在 DGAT 的催化下合成 TAG<sup>[16-17]</sup>。TAG 在油类植物种子中大量存在,DGAT 在大豆、花生、拟南芥和油菜中催化 DAG 形成 TAG。抑制 *DGAT1* 的表达会减少烟草、油菜和棉花的油脂积累<sup>[18]</sup>,而过量表达 *DGAT1* 能够提高花生、烟草和亚麻种子中的油脂含量<sup>[19-20]</sup>。且其他研究证明 DGAT 在续随子、大豆、牡丹中对油脂的调控具有重要作用<sup>[21-22]</sup>。

随着生物技术的发展,基因工程被广泛运用到植物油脂品质改良中<sup>[23]</sup>。为了保护自身免受外源遗传物质(如噬菌体、质粒)的侵袭,细菌和古细菌进化出了一种 RNA 分子介导的获得性免疫系统,称为 CRISPR<sup>[24]</sup>。2013 年,Mojica 等<sup>[25]</sup>利用化脓性链球菌的 Cas9 蛋白首次在哺乳动物细胞中实现了 RNA 引导下的精确靶向和基因组序列修饰,为 CRISPR/Cas9 作为一种广泛应用的基因组编辑工具奠定了基础。CRISPR/Cas9 基因编辑技术已被大范围应用于植物基因功能研究和农作物性状改良等领域。刘耀光教授及其团队研发了高效简便的 CRISPR/Cas9 植物多基因编辑载体系统,在该系统中,可以通过设计不同目标序列的多个导向 RNA (sgRNA),将 Cas9 蛋白靶向到多个基因组位点上,同时进行多基因编辑,也可以在目的基因的启动子或 UTR 区域设计靶点,对目的基因的启动子或 UTR 进行编辑,调节目的基因的表达量<sup>[26]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除大豆中的基因以研究基因的生物功能已有很多报道,例如,在大豆中同时敲除 4 个 *API* 基因可影响大豆的开花期、花器官发育和株高<sup>[27]</sup>。大豆稳定转基因效率显著低于拟南芥

和水稻<sup>[28]</sup>,为了加快获得 CRISPR/Cas9 的大豆突变体,有研究在大豆整株转基因之前先利用毛根转化体系检测靶点的编辑效率<sup>[29-30]</sup>,而利用 CRISPR/Cas9 技术敲除大豆 DGAT 基因的研究还鲜见报道。

目前已报道的 DGAT 基因主要是 *DGAT1*、*DGAT2* 和 *DGAT3*,其中 *DGAT1* 存在于动植物中,*DGAT2* 主要存在于动植物及酵母中,*DGAT3* 的功能在花生中首次被报道。朱红霞等<sup>[31]</sup>通过进化分析发现 *DGAT* 是古老的基因家族,功能区域在进化演变中仍保有较高的保守性。魏晨丹等<sup>[32]</sup>发现 DGAT 基因家族四倍体栽培花生和大豆同源拷贝数最多,这也可能是导致花生和大豆油脂含量更高的原因之一。此外,拟南芥哥伦比亚生态型点突变体 *as11* 中 DGAT 基因表达被抑制,导致甘油三酯合成速率减慢,引起 DAG 含量提高 10% 左右<sup>[33]</sup>。

刘贵芹等<sup>[34]</sup>发现,大豆中存在 10 个 DGAT 基因,分属于 3 个 DGAT 亚家族(*DGAT1*、*DGAT2* 和 *DGAT3*),其中 Glyma. 09G065300、Glyma. 13G106100 和 Glyma. 17G053300 基因为 *DGAT1* 亚家族,Glyma. 01G156000、Glyma. 09G195400、Glyma. 11G088800、Glyma. 16G115700 和 Glyma. 16G115800 基因为 *DGAT2* 亚家族,Glyma. 13G118300 和 Glyma. 17G041600 为 *DGAT3* 亚家族。*DGAT3* 首次在花生中发现,在花中的表达量最高<sup>[35]</sup>,与 *DGAT1* 和 *DGAT2* 的相似性不足 10%,因此本研究针对与拟南芥 DGAT 基因相似性最高的 *DGAT1* 和 *DGAT2* 展开研究,根据染色体位置进一步将 *DGAT1/2* 基因命名为 *DGAT1a* (Glyma. 09G065300)、*DGAT1b* (Glyma. 13G106100)、*DGAT1c* (Glyma. 17G053300)、*DGAT2a* (Glyma. 01G156000)、*DGAT2b* (Glyma. 09G195400)、*DGAT2c* (Glyma. 11G088800)、*DGAT2d* (Glyma. 16G115700) 和 *DGAT2e* (Glyma. 16G115800)。晁毛妮等<sup>[36]</sup>已经验证大豆中 *DGAT1A* (Glyma. 09G065300) 的 ATG 上游 2 192 bp 启动子序列能够驱动该基因的表达。然而,大豆 *dgat* 突变体是否也能提高种子中的 DAG 含量仍不清楚,因此,本研究前期通过定量 PCR 检测 *GmDGAT1/2* 的组织表达模式,尤其是在不同发育阶段的种子中的表达模式。为探究 *GmDGAT1/2* 的功能,本研究挑选相对表达量较高的 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b*,构建过表达载体,在烟草叶片中分别瞬时表达 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b*,以 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 为目标,探索 *GmDGAT1/2* 在籽粒油脂合成中的功能,最后,构建 CRISPR/CAS9 敲除 *GmDGAT1/2* 基因的载体,并利用大豆离体毛根转化体系进行靶点编辑有效性检测,为分析 *GmDGAT1/2* 的功能奠定理论基础,以期获得富含 DAG 的健康食

用油脂,为进一步获得大豆 dgat 突变体奠定理论基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

毛根转化受体材料,定量 PCR 组织样品均为大豆品种 Williams 82,烟草瞬时转化受体为本氏烟。sgRNA 载体、pLYCRISPR/Cas9 载体均由华南农业大学刘耀光教授实验室提供。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司;逆转录试剂盒、荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司;pEASY-Blunt Simple Cloning kit、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、发根农杆菌菌株 K599、根癌农杆菌菌株 EHA101 均购自全式金公司;Master Taq mix、DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司;胰蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、卡那霉素(Kan,50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、壮观霉素(Spec,100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )等其他化学试剂均为国产分析纯试剂,引物合成和测序由天一辉远公司完成。大豆萌发培养基和发根培养基配方参考甘卓然等<sup>[37]</sup>。

## 1.2 试验设计

在 Phytozome 数据库中搜索并下载与拟南芥二酰甘油转移酶基因 *AtDGAT1* (AT2G19450) 和 *AtDGAT2* (AT3G51520) 的同源大豆基因序列,分析 *GmDGAT* 基因在大豆品种 Williams 82 不同部位的表达情况,并分析 *GmDGAT* 基因在种子不同发育时

期的表达情况。分别挑选在种子中表达量较高的 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 基因,构建过表达载体,瞬时转化烟草叶片后测定油脂含量,以确定 *GmDGAT* 蛋白的功能。为研究 *GmDGAT1/2* 在大豆中的生物学功能,构建大豆 *GmDGAT1/2* 的 CRISPR/Cas9 敲除载体,通过毛根转化方法验证各个靶点的有效性。

## 1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 利用全能型植物 RNA 提取试剂盒提取大豆茎、叶、花、根、荚皮、不同发育阶段的种子的总 RNA,保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  以备用,参考 RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-Time) 试剂盒方法,以提取的 RNA 为模板,反转录为 cDNA。

1.3.2 荧光定量 PCR 分析 根据在 Phytozome 13 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 下载的 *GmDGAT1/2* 的 cDNA 序列并设计荧光定量 PCR 特异性引物(表 1),以 *GmTublin* 作为内参基因,对大豆的茎、叶、根、花、荚皮、种子进行荧光定量 PCR 检测。反应体系(10  $\mu\text{L}$ )为:cDNA 模板(稀释 100 倍)1  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ,Nuclease-free  $\text{H}_2\text{O}$  3.6  $\mu\text{L}$ ,SYBR Green 2  $\times$  qPCR Master Mix 5  $\mu\text{L}$ ,设置 3 次生物学重复。反应程序:预变性,95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,1 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环;溶解,95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  0.11  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ,1 个循环;降温,50  $^{\circ}\text{C}$  30 s,1 个循环。

表 1 引物信息  
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
QPCR-DGAT1a-F	TGCACAAATGGATGGTTCGC	定量 PCR
QPCR-DGAT1a-R	TGAACATGTGGCAAGGAACG	定量 PCR
QPCR-DGAT1b-F	TCTGCCCCGATACTCTGAACATG	定量 PCR
QPCR-DGAT1b-R	TGACAAGTTGGCGAAACAGC	定量 PCR
QPCR-DGAT1c-F	TGGCCCCCTTTTCATGTGTTG	定量 PCR
QPCR-DGAT1c-R	ACTTCCGTGTGTGCCAACTTC	定量 PCR
QPCR-DGAT2a-F	CATTTCACATGCAGCATGGC	定量 PCR
QPCR-DGAT2a-R	ATTGCTACGCGGACAAATCC	定量 PCR
QPCR-DGAT2b-F	TGCGTTAGCTGACAACACAG	定量 PCR
QPCR-DGAT2b-R	TGGTGTTAAGCCCAACCATG	定量 PCR
QPCR-DGAT2c-F	TTCGCCGTGTTTTTCCTTCC	定量 PCR
QPCR-DGAT2c-R	AGGCGTGCTTGCATATGAAC	定量 PCR
QPCR-DGAT2d-F	TCAAGACGGTTCCTGCATTG	定量 PCR
QPCR-DGAT2d-R	ACCAAGAGCAAACCGAACAC	定量 PCR
QPCR-DGAT2e-F	AAGGTGTTCAAGGGAAGTGAGG	定量 PCR

续表 1

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
QPCR-DGAT2e-R	ACGCGCGCTTGAAATGAATG	定量 PCR
ORF-DGAT1c-F	ACACGCTCGGTCTTCTTCTC	扩增基因 ORF
ORF-DGAT1c-R	TGAACTGGCATATCCCGTGG	扩增基因 ORF
ORF-DGAT2b-F	CCGTTCGGACAAAGTAGCCT	扩增基因 ORF
ORF-DGAT2b-R	TCGAGTTGCCACAATTAACCA	扩增基因 ORF
GmDGAT1c-Mlu I-F	AGCCTAGGGATGAGCCTGAAAGTGTAGCC	构建过量表达载体
GmDGAT1c-Spe I-R	GACTAGTGTGTCAAGTTGCCTTTCCTAT	构建过量表达载体
GmDGAT2b-Mlu I-F	AGCCTAGGGACAGATGAACCACGGCGG	构建过量表达载体
GmDGAT2b-Spe I-F	GACTAGTGTAAACAATTCTCAACTCAAGGT	构建过量表达载体
GmDGAT1-T1-F	GTCAAGCGGGACGGAAGGACGGT	构建敲除载体
GmDGAT1-T1-R	AAACACCGTCCTTCCGTCCCCGCT	构建敲除载体
GmDGAT1-T2-F	GTCAGTCGCTGCTGATGGAGTCGT	构建敲除载体
GmDGAT1-T2-R	AAACACGACTCCATCAGCAGCGAC	构建敲除载体
GmDGAT1-T3-F	ATTGGTCATCACCGAACTGTCGG	构建敲除载体
GmDGAT1-T3-R	AAACCCGACAGTTCCGGTGATGAC	构建敲除载体
GmDGAT1-T4-F	ATTGATCCGTACACTGTGACCTTC	构建敲除载体
GmDGAT1-T4-R	AAACGAAGGTCACAGGTACGGAT	构建敲除载体
GmDGAT2-T1-F	GTCAGGAGGGGGAGAAGGTGTTCA	构建敲除载体
GmDGAT2-T1-R	AAACTGAACACCTTCTCCCCCTCC	构建敲除载体
GmDGAT2-T2-F	GTCAGTTGCATTGGCTGACCACAC	构建敲除载体
GmDGAT2-T2-R	AAACGTGTGCTCAGCCAATGCAAC	构建敲除载体
GmDGAT2-T3-F	ATTGGTTCAAGACGGTTCCTGCAT	构建敲除载体
GmDGAT2-T3-R	AAACATGCAGGAACCGTCTTGAAC	构建敲除载体
GmDGAT2-T4-F	ATTGGATTGGCCGAAATTTGTCTG	构建敲除载体
GmDGAT2-T4-R	AAACCGACAAATTTCTGGCCGAATC	构建敲除载体
SP3	GTCGTGCTCCACATGTTGACCG	检测敲除载体
SP1	CCCGACATAGATGCAATAAATTCTC	检测敲除载体
GmDGAT1-JCF1	TGCGCCGCGGTCCCACCGCC	检测靶点是否编辑
GmDGAT1-JCR1	AACATGGAAGAGGCAAAACC	检测靶点是否编辑
GmDGAT1-JCF2	GGAGAAGAGAAGACTGAGTT	检测靶点是否编辑
GmDGAT1-JCR2	GCAACCGATTCAATAATTAG	检测靶点是否编辑
GmDGAT1-JCF3	GAGCACTTACTGTTTCGAATG	检测靶点是否编辑
GmDGAT1-JCR3	AACAATGCCTTATGGGCTTC	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCF4	TGTCAACCAACTACCCACAC	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCR4	CAGGGATGAGCACGAACACC	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCF5	CAATGGCGCTGTGGCTGTAT	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCR5	GCCAGTGCAACAATGCCAAT	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCF6	TCGAGTCGATGGAAACTCCG	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCR6	AGCAAACCGAAAAGCCTGAC	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCF7	TCCGATCACGCTTCACGTAG	检测靶点是否编辑
GmDGAT2-JCR7	GGCCAGATGCTAACAGGGAG	检测靶点是否编辑



1.3.3 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 基因克隆 根据基因 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 序列设计 PCR 扩增引物(表 1),以大豆种子 cDNA 为模板,使用 Master *Taq* mix 试剂进行 PCR 扩增。反应体系(50  $\mu$ L)为:cDNA 模板(稀释 100 倍)1  $\mu$ L,Master *Taq* mix 25  $\mu$ L,正反向引物各 1  $\mu$ L,Nuclease-free  $H_2O$  22  $\mu$ L,切胶回收 PCR 产物后,将产物连接至 pEASY-Blunt Simple 载体上,并将 pEASY-*GmDGAT1c* 和 pEASY-*GmDGAT2b* 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,菌落 PCR 鉴定阳性克隆,将阳性克隆送至天一辉远生物公司进行测序。

1.3.4 植物表达载体的构建及烟草瞬时表达 设计带有 *Mlu* I 和 *Spe* I 酶切位点的引物 *GmDGAT1c-Mlu* I-F, *GmDGAT1c-Spe* I-R, *GmDGAT2b-Mlu* I-F, *GmDGAT2b-Spe* I-R (表 1),分别以测序正确的 pEASY-*GmDGAT1c* 和 pEASY-*GmDGAT2b* 质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物切胶回收,对植物表达载体 pTF101 及 PCR 产物进行双酶切。酶切反应体系(50  $\mu$ L):1  $\mu$ L *Mlu* I,1  $\mu$ L *Spe* I,51  $\mu$ L pTF101 载体/PCR 产物,51  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer,381  $\mu$ L Nuclease-free  $H_2O$ 。酶切后切胶回收,利用 T4 DNA 连接酶将纯化产物进行连接。连接体系(10  $\mu$ L):酶切后 pTF101 载体/PCR 产物各 2  $\mu$ L,0.1  $\mu$ L T4 Ligase,1  $\mu$ L T4 Ligase Buffer,4.9  $\mu$ L Nuclease-free  $H_2O$ 。连接反应结束后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,菌落 PCR 鉴定阳性克隆,将阳性克隆送至天一辉远生物公司进行测序,得到过表达重组质粒 p35s:*GmDGAT1c* 和 p35s:*GmDGAT2b*。

将空载体及重组质粒转化至农杆菌 EHA101 中,菌落 PCR 鉴定筛选阳性克隆,加入含壮观霉素、卡那霉素和利福平抗性的 LB 培养基中,振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0,离心后加入 2 mL 渗透液[100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮、10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 氯化镁和 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸]重悬菌液,室温暗处静置 3 h 后注射烟草叶片,取培养 3 d 后的烟草叶片,提取 RNA 并 PCR 检测基因转化情况,取培养 5 d 后的烟草叶片作为样品测定总脂肪酸含量。

1.3.5 转基因烟草叶片的总脂肪酸含量测定 称取 10 mg 冷冻干燥 48 h 后的转基因烟草叶片,研磨成粉末后置于离心管中,加入甲醇与氯仿(体积比为 2:1)混合提取液 5 mL,在 37  $^{\circ}$ C 恒温摇床中提取 24 h,低速离心收集上层有机相。在沉淀中再次加入混合提取液 5 mL,12 h 后离心收集有机相,重复该步骤 1 次。最后将 3 次所得有机相混合,先加入 5 mL 无菌水,取下层有机相后,加入 0.2 倍体积的 0.9% NaCl 溶液。混匀离心后吸取下层有机相至已经称重的新玻璃管中,氮吹仪吹干后称管重,每个

样品 3 个重复。总油脂量 = (氮吹仪吹干后的管重 - 加样前的管重)/烟草叶片重量<sup>[38]</sup>。

1.3.6 CRISPR/Cas9 载体构建以及毛根转化 参照马兴亮等<sup>[26]</sup>方法构建 CRISPR/Cas9 载体,首先进行靶点引物(表 1)退火,对双链靶点接头和 sgRNA 表达盒酶切并连接后进行第一轮 PCR 和第二轮 PCR 扩增,最后将 sgRNA 表达盒与 pYLCRISPR/Cas9 载体连接,并将连接产物转化到大肠杆菌中,使用引物 SP3-F 和 SP1-R(表 1)进行 PCR,检测阳性克隆并送天一辉远生物公司测序。使用质粒提取试剂盒提取质粒,将正确重组质粒转化至 K599 农杆菌感受态细胞中,使用引物 SP3-F 和 SP1-R(表 1)进行 PCR,检测有目的质粒的菌落,并保存菌株。

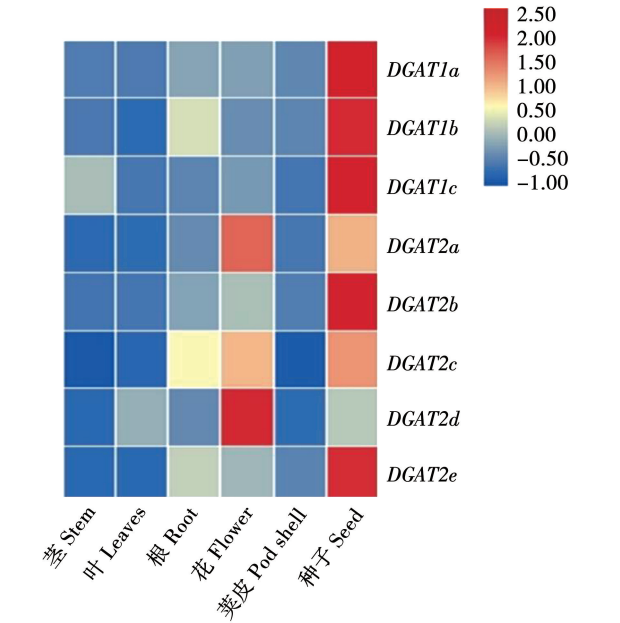
利用毛根转化体系进行靶点效率检测,参照 Cheng 等<sup>[39]</sup>的方法,把灭菌后的大豆放置在萌发培养基上,在 25  $^{\circ}$ C 和持续光照条件下放置 5~7 d,直到子叶与下胚约成直角状态。将含有目的质粒的农杆菌 K599 于 28  $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右,取 1 mL 菌液,5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 室温离心 5 min,移除上清液,用 200  $\mu$ L 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 重悬沉淀得到侵染液。用解剖刀在大豆子叶背面抠一个小三角状的洞。将处理好的子叶整齐摆放到根诱导培养基上。在子叶的洞里加入 20  $\mu$ L 侵染液。25  $^{\circ}$ C 光照培养 10 d 左右时长出毛根。

1.3.7 基因靶点有效性检测 每 3 个转基因毛状根混合成 1 个样品,使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。以提取的毛状根 DNA 为模板,用 SP3-F 和 SP1-R 引物和靶位点检测引物分别扩增靶点所在区域的片段。PCR 反应体系为:10  $\mu$ L Master *Taq* mix,正向引物和反向引物各 0.4  $\mu$ L,2  $\mu$ L DNA 模板,ddH<sub>2</sub>O 补足到 20  $\mu$ L。PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C 2 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。SP3-F 和 SP1-R 引物 PCR 有带的毛根用靶点检测引物扩增,其产物被送到天一辉远公司测序,利用 BioEdit 软件查看测序数据,靶点的位置产生双峰的样品已经发生编辑,该靶点为有效编辑靶点。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmDGAT* 基因表达分析

2.1.1 组织特异性表达分析 对大豆茎、叶、根、花、荚皮和种子中 *GmDGAT* 基因进行表达模式分析的结果如图 1 所示,*GmDGAT1/2* 基因在茎、叶、根、花、荚皮和种子中均有表达,但 *GmDGAT1a*、*GmDGAT1b*、*GmDGAT1c*、*GmDGAT2b*、*GmDGAT2c* 和 *GmDGAT2e* 在种子中的表达量明显高于其他部位。*GmDGAT2a* 和 *GmDGAT2d* 在花和种子中表达量较高。



注: 红色代表高转录水平, 蓝色代表低转录水平, 下同。

Note: The red represents high transcript level, and the blue represents low transcript level, the same below.

图 1 *GmDGAT1/2* 基因在大豆不同组织的表达量  
Fig. 1 Expression level of *GmDGAT 1/2* genes in different tissues of soybean

2.1.2 不同发育阶段表达分析 检测 *GmDGAT1/2* 在不同发育阶段种子中的表达量,发现在大豆 R8 期表达量达到最高(图 2)。说明 *GmDGAT* 基因在大豆种子的油脂形成中的作用可能是保守的。

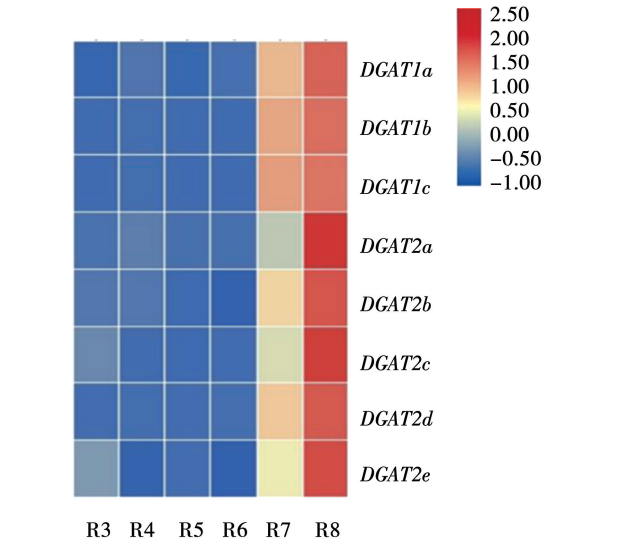


图 2 *GmDGAT1/2* 基因在不同发育阶段种子中的表达量  
Fig. 2 Expression level of *GmDGAT 1/2* genes in seeds at different developmental stages

## 2.2 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 基因烟草瞬时表达系统分析

2.2.1 植物表达载体构建 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 植物表达载体示意图如图 3 所示。利用双酶切法将克隆的基因 ORF 片段连接到植物表达载体 pTF101 上。将构建好的植物表达载体转化大肠杆菌后通过 PCR 筛选阳性克隆(图 4)。测序结果正确的质粒用于后续烟草瞬时转化。

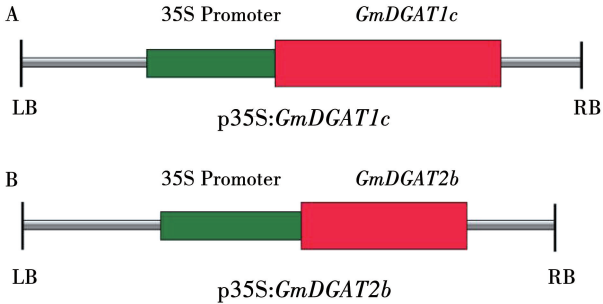


图 3 *p35S:GmDGAT1c* (A) 和 *p35S:GmDGAT2b* (B) 表达载体示意图  
Fig. 3 Construction of *p35S:GmDGAT1c* (A) and *p35S:GmDGAT2b* (B) expression vectors

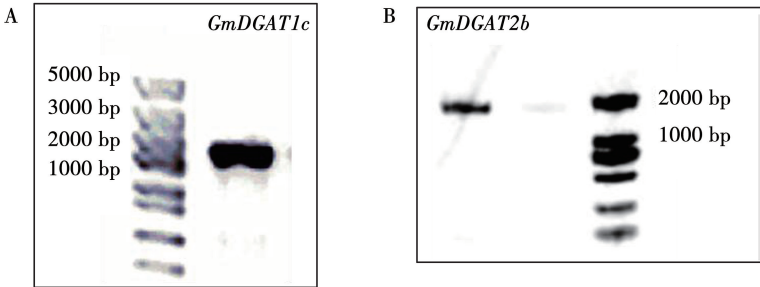
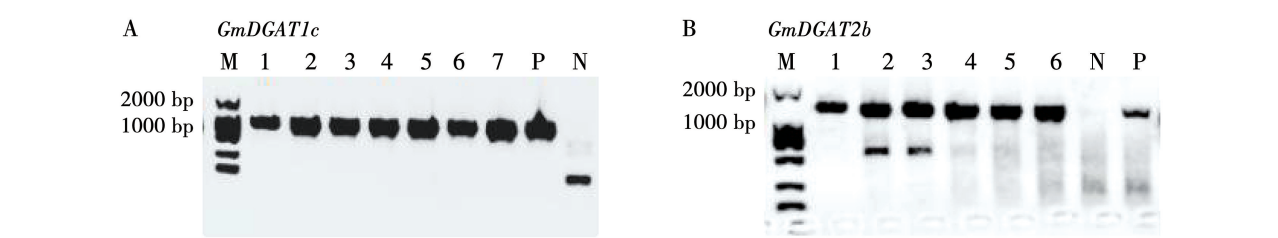


图 4 *p35S:GmDGAT1c* (A) 和 *p35S:GmDGAT2b* (B) 表达载体 PCR 验证  
Fig. 4 *p35S:GmDGAT1c* (A) and *p35S:GmDGAT2b* (B) expression vectors verified by PCR

2.2.2 转基因烟草叶片总油脂含量测定 PCR 鉴定表明对照 pTF101、*p35S::GmDGAT1c* (*GmDGAT1c*) 和 *p35S::GmDGAT2b* (*GmDGAT2b*) 载体在烟草叶片中表达 (图 5)。表达对照 pTF101 载体、*GmDGAT1c*、*GmDGAT2b*

烟草叶片的总油脂含量分别占叶片干重的 3.32%、4.40% 和 4.18%。表达 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 烟草叶片的总油脂含量分别较表达对照载体叶片显著增加了 32.53% 和 25.90%。



A. *p35S::GmDGAT1c* 载体烟草注射 PCR 验证; B. *p35S::GmDGAT2b* 载体烟草注射 PCR 验证; M. marker; 1~7. 生物学重复; P. 阳性对照; N. 阴性对照 pTF101 载体。  
A. PCR validation of *GmDGAT1c* tobacco injection; B. PCR validation of *GmDGAT2b* tobacco injection; M. marker; 1-7. Biological repetition; P. Positive control; N. Negative control pTF101 vector.

图 5 表达 *GmDGAT1* 和 *GmDGAT2b* 基因烟草叶片检测和总油脂含量分析  
Fig. 5 Detection on tobacco leaves harboring *GmDGAT1c* and *GmDGAT2b* genes and total lipid content analysis

2.3 *GmDGAT1* 和 *GmDGAT2* 基因敲除 CRISPR/Cas9 载体构建

2.3.1 基因编辑载体构建 设计含有敲除 *DGAT1a*、*DGAT1b*、*DGAT1c* 靶点的载体 *GmDGAT1-Cas9*, 含有敲除 *DGAT2a*、*DGAT2b*、*DGAT2c*、*DGAT2d*

和 *DGAT2e* 靶点的载体 *GmDGAT2-Cas9*, CRISPR/Cas9 编辑载体示意图如图 6 所示, 载体构建情况 PCR 验证结果如图 7 所示, 测序结果证明 *GmDGAT1-Cas9* 载体和 *GmDGAT2-Cas9* 载体构建成功。

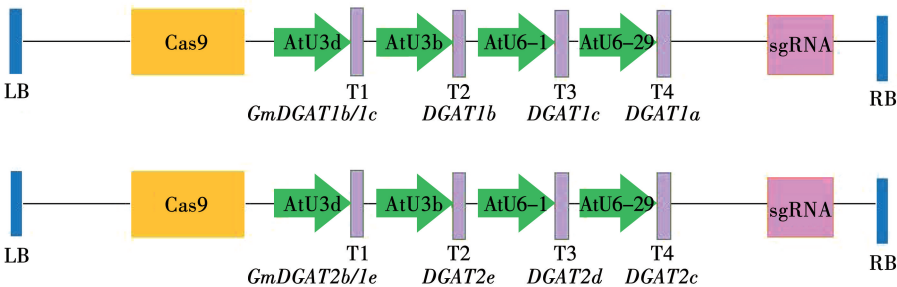


图 6 *GmDGAT1-Cas9* 和 *GmDGAT2-Cas9* 载体结构示意图  
Fig. 6 Schematic diagram of the structure of *GmDGAT1-Cas9* and *GmDGAT2-Cas9* vector

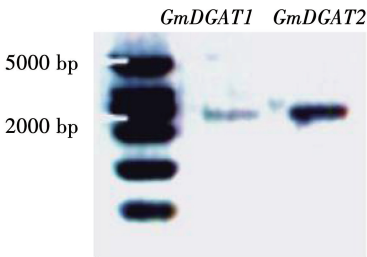
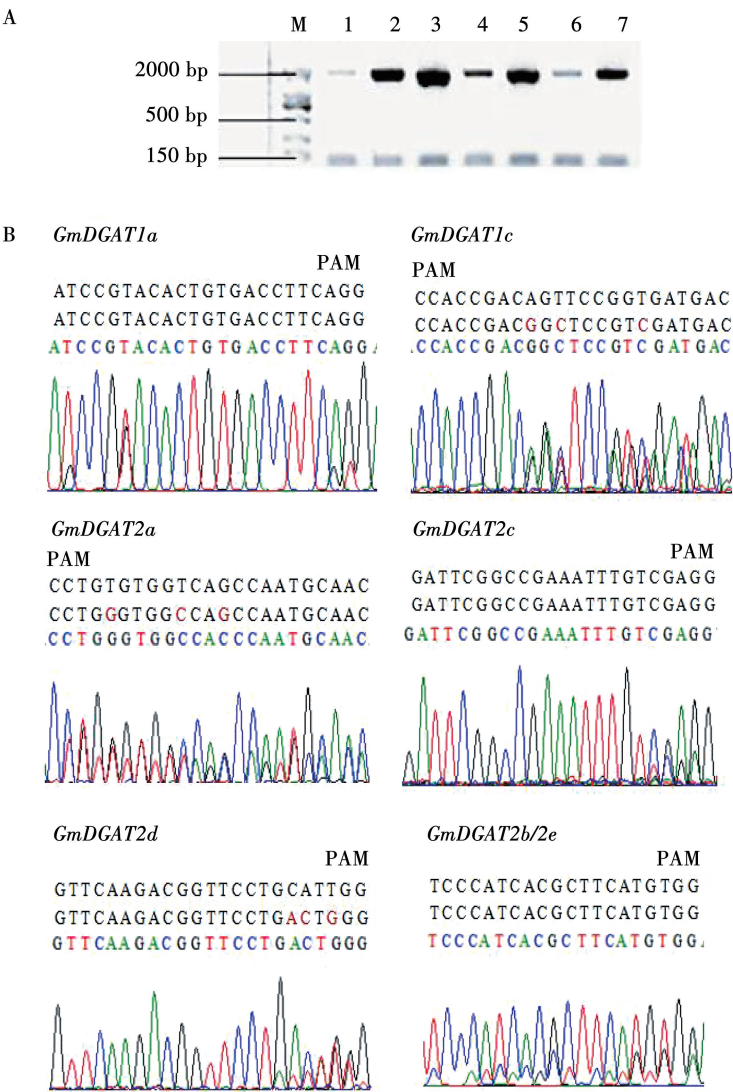


图 7 *GmDGAT1-Cas9* 和 *GmDGAT2-Cas9* 载体 PCR 验证  
Fig. 7 *GmDGAT1-Cas9* and *GmDGAT2-Cas9* vectors verified by PCR

2.3.2 基因编辑靶点有效性检测 以转基因烟草毛状根 DNA 为模板,用 SP3 和 SP1 引物和靶位点检测引物分别扩增靶点所在区域的片段(图 8A),测序结果显示,*GmDGAT1a*、*GmDGAT2b*、*GmDGAT2c* 和 *GmDGAT2e* 的靶点附近均产生了双峰,*GmDGAT1c*、*GmDGAT2a* 和 *GmDGAT2d* 的靶点处产生了双峰,同时靶点处出现了基因的突变,说明以上 7 个靶点可

以用于下一步的基因敲除。成功构建出能同时敲除 *GmDGAT1a*、*GmDGAT1c* 的载体 *GmDGAT1-Cas9* 和同时敲除 *GmDGAT2a*、*GmDGAT2b*、*GmDGAT2c*、*GmDGAT2d*、*GmDGAT2e* 的载体 *GmDGAT2-Cas9* (图 8B)。目前未筛选到能有效编辑 *GmDGAT1b* 的靶点,后续还将继续筛选。



注:A. 转基因根毛鉴定;M. marker;1. 阴性对照(Williams 82 大豆 DNA);2. 阳性对照;3~7. 阳性转基因烟草;  
B. *GmDGAT1a*、*GmDGAT1c*、*GmDGAT2a*、*GmDGAT2b*、*GmDGAT2c*、*GmDGAT2d* 和 *GmDGAT2e* 有效编辑靶点的序列突变情况。

Note; A. Identification of positive transgenic roots; M. marker; 1. Negative control (The DNA of Williams 82); 2. Positive control; 3-7. Positive transgenic tobacco; B. Mutation of effective editing targets of *GmDGAT1a*, *GmDGAT1c*, *GmDGAT2a*, *GmDGAT2b*, *GmDGAT2c*, *GmDGAT2d* and *GmDGAT2e*.

图 8 基因编辑靶点有效性检测  
Fig.8 Gene editing target validity testing



3 讨论

有研究显示油莎豆 *CeDGAT1* 主要在发育块茎中高表达,在块茎播种后 90 d 时达峰值,表明 *CeDGAT1* 在油莎豆块茎油脂合成积累中行使重要功能<sup>[40]</sup>。本研究为进一步明确大豆 *DGAT1/2* 的生物学功能,通过组织特异性表达分析发现大豆中的 *DGAT1/2* 在种子中表达丰度很高,说明其可能在大豆种子的 TAG 合成通路中起作用。

任国鹏等<sup>[21]</sup>发现与野生型和空载体转化烟叶相比,续随子 *EIDGAT2* 瞬时表达的烟叶组织总油脂含量提高 1.59%,饱和脂肪酸减少,油酸等不饱和脂肪酸增加。本研究选取 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 为代表,研究 *DGAT1/2* 是否能提高油脂含量。将 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 在烟草中瞬时表达,初步证明大豆 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 基因分别能够提升烟草叶片的油脂含量 32.53% 和 25.90%,说明大豆中 *GmDGAT1c* 和 *GmDGAT2b* 基因在油脂合成途径中的功能是保守的,且可初步推测 *GmDGAT1* 提高油脂含量的能力可能稍强于 *GmDGAT2*。

利用毛根体系对 *DGAT1/2* 候选靶点进行检测,获得 7 个有效编辑靶点,为进一步对大豆 *DGAT1/2* 基因的功能分析提供有力的理论支撑,其中 *GmDGAT1b* 和 *GmDGAT1c* 共用同一靶点,该靶点能有效编辑 *GmDGAT1c*,不能敲除 *GmDGAT1b*,说明同一靶点在不同基因中的编辑效率有差异。后续将继续开发 *GmDGAT1b* 的其他有效靶点。本研究可为创制富含 DAG 的优质大豆材料提供理论基础。

4 结论

本研究通过组织表达分析及烟草瞬时转化推测出大豆 *DGAT1/2* 主要在大豆油脂途径中发挥功能,与其他物种中的 *DGAT1/2* 功能是保守的。本研究成功构建 *GmDGAT1* 和 *GmDGAT2* 敲除载体,并获得 7 个有效编辑靶点,为之后的基因功能分析及材料创制提供有效依据。

参考文献

[1] NAN H, LU S, FANG C, et al. Molecular breeding of a high oleic acid soybean line by integrating natural variations [J]. *Molecular Breeding*, 2020, 40(9): 1-10.

[2] 邱玲. 中国食用植物油贸易竞争力研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017. (QIU L. Study on trade competitiveness of Chinese edible vegetable oil[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.)

[3] 任波, 李毅. 大豆种子脂肪酸合成代谢的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005(3): 301-306. (REN B, LI Y. Research advances on fatty acid biogynthesis metabolism in soybean seed

[J]. *Molecular Breeding*, 2005(3): 301-306.)

[4] MURASE T, MIZUNO T, OMACHI T, et al. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice[J]. *Journal of Lipid Research*, 2001, 42(3): 372-378.

[5] NAGAO T, WATANABE H, GOTO N, et al. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial[J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(4): 792-797.

[6] 乔睿. 怎样有效降低甘油三酯[N]. 健康报, 2019-06-04(7). (QIAO R. How to reduce triglycerides effectively [N]. *Health*, 2019-06-04(7).)

[7] 李熠阳, 王远亮. 甘油二酯的功能及安全性评价研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 255-257, 261. (LI Y Y, WANG Y L. Functions and safety evaluation of diacylglycerol[J]. *Food & Machinery*, 2012, 28(3): 255-257, 261.)

[8] LI R, HATANAKA T, YU K, et al. Soybean oil biosynthesis: Role of diacylglycerol acyltransferases [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2013, 13: 99-113.

[9] 仲晓芳, 钱雪艳, 牛陆, 等. 转基因技术对提高大豆油脂和油酸含量的作用[J]. 大豆科技, 2019(6): 27-29. (ZHONG X F, QIAN X Y, NIU L, et al. Effect of transgenic technology on improving soybean oil and oleic acid content[J]. *Soybean Science & Technology*, 2019(6): 27-29.)

[10] LARDIZABAL K, EFFERTZ R, LEVERING C, et al. Expression of umbelopsis ramanniana DGAT2A in seed increases oil in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 89-96.

[11] 边妙, 郭葳, 周新安, 等. 转基因科普系列-转基因技术提高大豆油脂品质[J]. 大豆科技, 2018(4): 54-58. (BIAN M, GUO W, ZHOU X A, et al. Improveing soybean oil quality by GM technology[J]. *Soybean Science and Technology*, 2018(4): 54-58.)

[12] 张飞, 高秀清, 张靖洁, 等. 种子特异表达异源 *DGAT1* 基因提高大豆种子含油量和营养品质[J]. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1478-1490. (ZHANG F, GAO X Q, ZHANG J J, et al. Seed-specific expression of heterologous gene *DGAT1* increase soybean seed oil content and nutritional quality [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(9): 1478-1490.)

[13] 赵翠格, 刘岷, 李凤兰, 等. 植物种子油脂的生物合成及代谢基础研究进展[J]. 种子, 2010, 29(4): 56-62. (ZHAO C G, LIU D, LI F L, et al. Advances in research on seed oil biosynthesis and basal metabolism [J]. *Seed*, 2010, 29(4): 56-62.)

[14] 黄卓烈, 朱利泉. 生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 226-232. (HUANG Z L, ZHU L Q. *Biochemistry* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 226-232.)

[15] 马三梅. 植物中从二酰甘有到三酰甘油的两条合成新途径[J]. 生命的化学, 2006, 26(1): 65-66. (MA S M. Two new pathways from diacylglycerol to triacylglycerol in plants [J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(1): 65-66.)

[16] 陶芬芳, 邢蔓, 岳宁燕, 等. 植物甘油三酯合成相关基因研究进展[J]. 作物研究, 2017, 31(3): 330-336. (TAO F F, XING M, YUE N Y, et al. Research advances of genes related to plant triacylglycerol synthesis[J]. *Crop Research*, 2017, 31(3): 330-336.)

[17] DAHLQVIST A, STAHL U, LENMAN M, et al. Phospholipid: Dia-cylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 2000, 97(12): 6487-6492.

[18] LU L, WEI W, LI Q T, et al. A transcriptional regulatory module controls lipid accumulation in soybean [J]. *New Phytologist*, 2021, 231(2): 661-678.

[19] 郑玲. 花生二酰甘油酰基转移酶(*AhDGAT*)基因家族的功能与调控研究[D]. 济南: 山东大学, 2018. (ZHENG L. Function and regulation research of peanut Diacylglycerol Acyltransferase(*AhDGAT*) gene family [D]. Jinan: Shandong University, 2018.)

[20] 苑丽霞, 毛雪, 高昌勇, 等. 种子特异表达二酰甘油酰基转移酶 1 基因(*VgDGAT1*)提高亚麻荠种子油脂积累 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51(5): 668-678. (YUAN L X, MAO X, GAO C Y, et al. Seed-specific over-expression of a *Diacylglycerol Acyltransferase 1* gene (*VgDGAT1*) increase seed oil accumulation in *Camelina sativa*[J]. *Plant Physiology Communications*, 2015, 51(5): 668-678.)

[21] 任国鹏, 葛丽萍, 孙超超, 等. 续随子二酰甘油酰基转移酶 2 基因(*EIDGAT2*)克隆与功能分析[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(8): 1156-1166. (REN G P, GE L P, SUN C C, et al. Cloning and functional analysis of acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase 2 gene (*EIDGAT2*) in *Euphorbia lathyris* [J]. *Plant Physiology Communications*, 2019, 55(8): 1156-1166.)

[22] 袁秀云, 田云芳, 张燕, 等. 油用牡丹 PEPC 基因的克隆及表达分析[J]. *中国油料作报*, 2019, 12(10): 1-9. (YUAN X Y, TIAN Y F, ZHANG Y, et al. Cloning and expression analysis of PEPC gene from *Paeonia ostii*[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 12(10): 1-9.)

[23] 孟祥河. 功能性甘油二酯的酶促酯化合成及其减肥功能的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004. (MENG X H. Study on enzymatic synthesis of functional lipid and its antiobesity characteristics [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004.)

[24] 李聪, 曹文广. CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2015, 31(11): 1531-1542. (LI C, CAO W G. Advances in CRISPR/Cas9-mediated gene editing [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(11): 1531-1542.)

[25] MOJICA F, DiEZ-VILLASE O R C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182.

[26] 马兴亮, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. *遗传*, 2016, 38(2): 118-125. (MA X L, LIU Y G. CRISPR/Cas9-based genome editing systems and the analysis of targeted genome mutations in plants [J]. *Hereditas*, 2016, 38(2): 118-125.)

[27] CHEN L, NAN H A, KONG L, et al. Soybean AP1 homologs control flowering time and plant height[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(12): 1868-1879.

[28] 姜丽静, 马春玲, 车淑静. 大豆育种中转基因技术的研究进展 [J]. *现代化农业*, 2017(12): 15-16. (JIANG L J, MA C L, CHE S J. Research progress of transgenic technology in soybean breeding[J]. *Modernizing Agriculture*, 2017(12): 15-16.)

[29] 李泰, 杜浩, 黎永力, 等. 大豆 *BBX32* 基因生物信息学分析及基因编辑靶点设计[J]. *大豆科学*, 2021, 40(5): 602-611. (LI T, DU H, LI Y L, et al. Bioinformatics analysis and gene editing target design of *BBX32* gene in soybean [J]. *Soybean Science*, 2021, 40(5): 602-611.)

[30] 黎永力, 杜浩, 李泰, 等. 大豆 *FUL* 基因家族进化规律分析及基因编辑靶点鉴定 [J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4): 1120-1132. (LI Y L, DU H, LI T, et al. Molecular evolution of *FUL* family genes and identification of gene editing targets in soybean[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 1120-1132.)

[31] 朱红霞, 胡利宗, 邓小莉, 等. 三种豆科植物 *DGAT1* 基因家族的分子特征与进化分析[J]. *生物技术通报*, 2011(10): 163-166. (ZHU H X, HU L Z, DENG X L, et al. Molecular characterization and evolutionary analysis of *DGAT1* gene family in three fabaceae plants [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(10): 163-166.)

[32] 魏晨丹, 于继高, 滕佳, 等. 豆科全基因组 *DGAT* 基因家族的鉴定与进化分析[J]. *中国油料作物学报*, 2020, 42(5): 807-817. (WEI C D, YU J G, TENG J, et al. Identification and evolutionary analysis of *DGAT* gene family in legumes[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020, 42(5): 807-817.)

[33] 白玫, 吴鸿. 拟南芥 *TAG1* 基因对脂类合成调控作用的研究进展[J]. *植物学报*, 2009, 44(6): 735-741. (BAI M, WU H. Recent progress in lipid biosynthesis regulated by *TAG1* in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Bulletin of Botany*, 2009, 44(6): 735-741.)

[34] 刘贵芹, 邵群, 黄荣峰, 等. 大豆 *DGAT* 基因家族的鉴定和表达分析[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(12): 55-61. (LIU G Q, SHAO Q, HUANG R F, et al. Characterization and expression analysis of *DGAT* gene family in soybean[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(12): 55-61.)

[35] 张飞, 高慧玲, 刘宝玲, 等. 大豆 *GmDGAT3* 基因的鉴定及表达分析[J]. *山西农业科学*, 2019, 47(4): 491-496. (ZHANG F, GAO H L, LIU B L, et al. Identification and expression analysis of soybean *GmDGAT3* genes [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2019, 47(4): 491-496.)

[36] 晁毛妮, 胡喜贵, 张晋玉, 等. 大豆二酰甘油酰基转移酶基因 *GmDGAT1A* 启动子的克隆与功能分析 [J]. *华北农学报*, 2020, 35(4): 27-34. (CHAO M N, HU X G, ZHANG J Y, et al. Cloning and functional analysis of promoter of diacylglycerol acyltransferase gene *GmDGAT1A* in soybean[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(4): 27-34.)

[37] 甘卓然, 石文茜, 黎永力, 等. 大豆生物钟基因 *GmLNKI/2*、*GmRVE4/8* 和 *GmTOCI* CRISPR/Cas9 组织表达分析及敲除靶点的鉴定 [J]. *作物学报*, 2020, 46(8): 1291-1300. (GAN Z R, SHI W Q, LI Y L, et al. Identification of CRISPR/Cas9 knockout targets and tissue expression analysis of circadian clock genes *GmLNKI/2*, *GmRVE4/8*, and *GmTOCI* in soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(8): 1291-1300.)

[38] 王计平, 张玲慧, 赵静, 等. 紫苏种子脂肪酸代谢及关键酶基因调控油脂合成规律的研究 [J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(3): 5. (WANG J P, ZHANG L H, ZHAO J, et al. Regulation of controlling oil synthesis by fatty acid metabolism of *Perilla* seed and key enzyme gene[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2016, 31(3): 5.)

[39] CHENG Q, DONG L, GAO T, et al. The bHLH transcription factor GmPIB1 facilitates resistance to *Phytophthora sojae* in *Glycine max* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(10): 2527-2541.

[40] 高宇, 陈莹, 孙岩, 等. 特色油料作物油莎豆 *CeDGAT1* 基因的鉴定及表达分析 [J]. *山西农业科学*, 2020, 48(6): 831-835, 841. (GAO Y, CHEN Y, SUN Y, et al. Identification and expression analysis of *CeDGAT1* gene in *Cyperus esculentus* with a special oil crop [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2020, 48(6): 831-835, 841.)