

大豆 BBi 基因 ihpRNA 种子特异性 表达载体的构建

付永平, 张 君, 王丕武, 周海涛, 曲 静

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

[摘 要] **【目的】**构建具有大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因反向重复结构的 ihpRNA 种子特异性表达载体,并将其转入根癌农杆菌中,为大豆品质改良奠定基础。**【方法】**采用 PCR 技术克隆大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因的正义和反义片段、大豆种子特异性启动子 7 α P 和作为内含子的 GFP 基因片段,分别连入克隆载体 pMD18-T Vector 中。然后根据植物中 ihpRNA 原理,以植物表达载体 pCambia1301 为基础,将组成 RNAi 载体的 4 个目的片段分别连入其中,然后利用冻融法转化根癌农杆菌,并进行 PCR 鉴定。**【结果】**PCR 扩增得到组成 RNAi 载体的 4 个目的片段,分别构建成重组克隆载体和 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS,并转化得到含有 p7 α P-GFP-BBiS 的农杆菌 EHA101 和 EHA105。**【结论】**成功构建了具有 BBi 基因反向重复结构的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS, BBi 基因的 ihpRNA 表达框架成功转入到农杆菌中。

[关键词] 大豆;蛋白酶抑制剂 BBi 基因;ihpRNA 表达载体;种子特异性启动子

[中图分类号] Q782;Q943.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)01-0083-07

Construction of ihpRNA seed-specific expressed vector of Bowman-Birk inhibitor gene from soybean

FU Yong-ping, ZHANG Jun, WANG Pi-wu, ZHOU Hai-tao, Qu Jing

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

Abstract: **【Objective】**The ihpRNA seed-specific expressed vector of Bowman-Birk inhibitor gene from soybean was constructed, and then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* to lay a foundation for quality improvement of soybean. **【Method】**In this paper, the BBi gene, soybean seed-specific promoter 7 α P and the fragment of GFP gene which were used as intron were isolated by PCR method, and then inserted into pMD18-T Vector respectively. The ihpRNA seed-specific expressed vector p7 α P-GFP-BBiS with inverted repeats of BBi genes, seed-specific promoter 7 α P and GFP gene was constructed based on the vector of pCambia1301. p7 α P-GFP-BBiS was introduced into EHA101 and EHA105 of *A. tumefaciens* respectively. **【Result】**The BBi gene, soybean seed-specific promoter 7 α P and the fragment of GFP gene were cloned, and the four recombinant cloned vectors and the ihpRNA seed-specific expressed vector p7 α P-GFP-BBiS were constructed. The EHA101 and EHA105 which had p7 α P-GFP-BBiS were obtained. **【Conclusion】**The ihpRNA seed-specific expressed vector p7 α P-GFP-BBiS was constructed with inverted repeats of BBi gene, seed-specific promoter 7 α P and GFP gene, and the RNAi constructs were transformed into *A. tumefaciens*.

Key words: soybean; Bowman-Birk inhibitor gene; ihpRNA expression vector; seed-specific promoter

* [收稿日期] 2009-05-14

[基金项目] 教育部博士点基金项目(20070193005)

[作者简介] 付永平(1981—),女,吉林长春人,博士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail: yongpingf@yahoo.com.cn

[通信作者] 王丕武(1958—),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事作物生物技术和遗传育种研究。
E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn

大豆蛋白酶抑制剂有 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (Kunitz trypsin inhibitor, KTi)^[1] 和 Bowman-birk 型蛋白酶抑制剂 (Bowman-birk trypsin inhibitor, BBi)^[2] 2 种, 其约占种子蛋白质干质量的 2%, 其中 BBi 含量为 0.6% 左右, 蛋白质分子质量为 8 ku, 可同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性^[3]。蛋白酶抑制剂不仅是一种保护大豆免受昆虫和病原体攻击的蛋白质, 而且是大豆品质的主要营养抑制因子之一。生大豆抗营养作用的 40% 是由蛋白酶抑制因子引起的, 主要表现在抑制畜禽小肠胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性, 降低其对饲料蛋白质的消化吸收, 从而引起畜禽生长停滞及胰腺肥大和增生等^[4]。有研究表明, 在采用热失活方法消除大豆抗营养因子时, 因为 BBi 具有热稳定性, 大部分会残留在大豆制品中, 从而影响豆制品的品质和新产品的开发^[5]。因此, 创制缺失 Bowman-birk 型蛋白酶抑制剂的优质大豆新种质, 可有效提高大豆的营养价值和加工品质。

RNA 干扰是指一些小的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 高效、特异地阻断体内相应基因的表达, 促使 mRNA 降解, 使细胞表现出特定基因缺失的一种转录后水平的基因沉默方法^[6]。近年来, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术发展迅速, 已成为验证未知基因功能和改良植物品质的有力工具, 且已在水稻^[7]、玉米^[8]、大豆^[9]、大麦^[10]、小麦^[11]、马铃薯^[12] 和棉花^[13] 等多种农作物的品种改良中得到应用, 但在大豆的品质改良中尚未见报道。因此, 本研究利用基因工程技术, 结合种子特异性启动子, 构建了具有 BBi 基因反向重复结构的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS, 并将该表达载体转化到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中, 以期为进一步利用 RNAi 技术在种子特定部位调控 BBi 基因表达、阻止蛋白酶抑制剂的生物合成、获得低含量或不含蛋白酶抑制剂 BBi 的缺失体, 继而改良大豆品质奠定基础。

1 材料与方法

本试验在吉林农业大学生物技术中心实验室完成。

1.1 材料

1.1.1 植物材料和质粒 大豆品种“吉农 18”, 由吉林农业大学生物技术中心实验室提供。大肠杆菌 DH5 α , 根癌农杆菌 EHA101 和 EHA105, 植物表达载体 pCambia1301、AHLG 和 p7 α P-GUS, 均由吉

林农业大学生物技术中心实验室保存。pMD18-T Vector 克隆载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶和试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker、Agarose Gel DNA Purification Kit、Total RNA Extraction Kit、AMV 反转录试剂盒、质粒小量抽提试剂盒, 均购自 TaKaRa 和 MBI 公司; 引物由北京三博远志生物技术有限公司合成; 其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 大豆幼胚总 RNA 的提取 取授粉 6 周后的大豆幼胚, 参照 Total RNA Extraction Kit 说明书提取总 RNA, 用 M-MLV Reverse Transcriptase 合成 cDNA。

1.2.2 组成 RNAi 载体的 4 个基因片段的克隆 根据 GenBank 中已发表的大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因的 cDNA 序列 (GenBank K01967)、大豆 7S 蛋白 α 亚基基因的启动子序列 (GenBank FJ572966) 和 GFP 基因序列 (GenBank EF546437), 应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计特异性引物, 考虑到 4 个目的片段在 RNAi 表达载体的插入位置和顺序, 分别在引物的 5' 端设计不同的限制性内切酶酶切位点和保护碱基。引物序列如下: BBiZ1: 5' GGG TCT AGA ATG GTG GTG CTA AAG GT 3' (*Xba* I); BBiZ2: 5' TTT CTG CAG TTC CTT GTC ATC CTC AC 3' (*Pst* I)。BBiF1: 5' GGG AGA TCT ATG GTG GTG CTA AAG GT 3' (*Bgl* II); BBiF2: 5' TTG GGT TACC TTC CTT GTC ATC CTC AC 3' (*Bst*E II)。7 α P1: 5' GGG CAA TTC TGC TTG GAT TTG GAC CAG AC 3' (*Eco*R I); 7 α P2: 5' TTT TCT AGA TAG GAT ATT GAA CTA GTT CT 3' (*Xba* I)。GFP1: 5' TTT CTG CAG ATG GTG AGC AAG GGC GA 3' (*Pst* I); GFP2: 5' GGG AGA TCT TTA CTT GTA CAG CTC GTC 3' (*Bgl* II)。

(1) 作为茎体 (stem) 的 BBi 基因的克隆。以上述获得的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因的正义片段 BBiZ 和反义片段 BBiF。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 48 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 28 个循环; 72 °C 后延伸 30 min。

(2) 大豆种子特异性启动子 7 α P 的克隆。利用质粒小量抽提试剂盒提取植物表达载体 p7 α P-GUS 的质粒 DNA, 以其为模板, 通过 PCR 扩增大豆 7S

蛋白 α 亚基基因的启动子序列 7 α P。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,68 $^{\circ}$ C 退火 2.5 min,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。

(3)作为环体(loop)部分的 GFP 基因的克隆。利用质粒小量抽提试剂盒,提取植物表达载体 AHLG 的质粒 DNA,以其为模板,通过 PCR 扩增作为功能性内含子的 GFP 基因。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,54 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,28 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。

1.2.3 重组克隆载体的构建与鉴定 将上述 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,用凝胶回收试剂盒纯化后分别连入克隆载体 pMD18-T Vector;连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞;通过蓝白斑筛选,挑取白斑,提取质粒 DNA,以其为模板,通过 PCR 和酶切鉴定后测序。测序由北京三博远志生物技术有限公司完成,并通过 DNAMAN 软件对其进行序列分析。

1.2.4 ihpRNA 表达载体的构建与鉴定 根据植物中 ihpRNA 原理,以植物表达载体 pCAM-BIA1301 为基础,将启动子 7 α P、BBi 基因正义片段、内含子 GFP 基因、BBi 基因反义片段分别连入植物表达载体,构建具有 BBi 基因的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS。对连入 pCAM-BIA1301 中的启动子、正义片段、内含子和反义片段,分别进行 PCR 和酶切鉴定并测序。

1.2.5 ihpRNA 表达载体转化根癌农杆菌 制备根癌农杆菌 EHA105 和 EHA101 感受态细胞,并用质粒小量抽提试剂盒提取 ihpRNA 表达载体 p7 α P-GFP-BBiS 质粒 DNA,采用冻融法^[14]分别转入根癌农杆菌 EHA105 和 EHA101 感受态细胞中,在含卡那霉素的 YEP 固体培养基上筛选阳性克隆,对转化得到的单菌落进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 大豆幼胚总 RNA 的提取

在大豆授粉 5 周后,大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因开始表达^[3],所以选用授粉 6 周后的大豆幼胚提取总 RNA,用体积分数 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 1。从图 1 可以清晰看到 28 S 和 18 S rRNA 2 条主带,表明提取的大豆幼胚总 RNA 纯度较高,无明显降解,而且不含有 DNA 和蛋白质条带,完全可以满足反转录的要求。

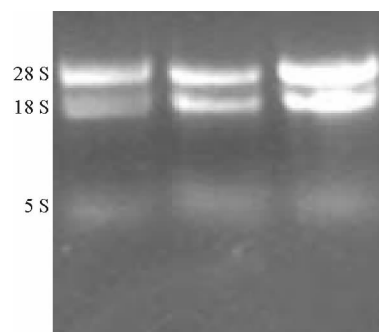


图 1 大豆幼胚总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of the total RNA from soybean embryo

2.2 组成 RNAi 载体的 4 个基因片段的克隆

4 个基因片段经 PCR 扩增后,扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,分别得到一条与预期大小相符的特异性条带,电泳结果如图 2 所示。BBi 基因的正义片段 BBiZ 和反义片段 BBiF 约为 320 bp (图 2A),大豆种子特异性启动子 7 α P 约为 1 382 bp (图 2B),GFP 基因约为 720 bp (图 2C)。

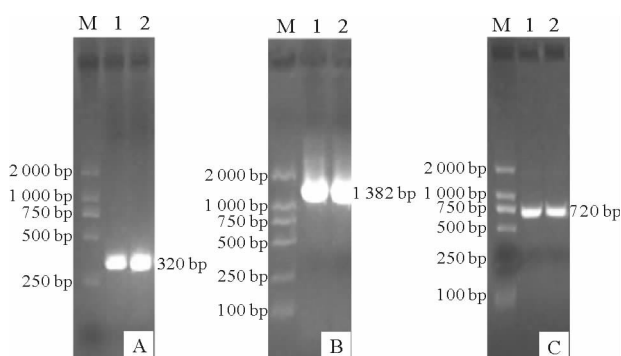


图 2 组成 RNAi 载体的 4 个基因片段的 PCR 产物电泳结果

A. BBi 基因;B. 启动子 7 α P;C. GFP 基因

M. DNA Marker DL-2000;1~2. PCR 产物

Fig.2 Electrophoresis of PCR products from four genes constructing RNAi vector

A. BBi gene;B. 7 α P promoter;C. GFP gene;

M. DNA Marker DL-2000;1-2. PCR product

2.3 重组克隆载体的构建与鉴定

将上述 PCR 产物电泳回收后,分别连入克隆载体 pMD18-T Vector,提取质粒 DNA,以其为模板,用 BBi 基因的正义片段 BBiZ、反义片段 BBiF,大豆种子特异性启动子 7 α P 和 GFP 基因的特异引物分别进行 PCR 鉴定。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定正义片段 BBiZ,用 *Bgl* II 和 *Bst* E II 双酶切鉴定反义片段 BBiF,用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切鉴定启动子 7 α P,用 *Pst* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定 GFP 基因,结果如图 3 所示。由图 3 可见,通过

PCR 扩增分别得到 1 条与目的片段大小一致的条带,通过双酶切分别得到 1 条约为 2 692 bp 的 pMD18-T 载体和 1 条与 PCR 产物大小相同的条带,其中 BBi 基因的正义片段 BBiZ 和反义片段 BBiF 均为 320 bp (图 3A,B),大豆种子特异性启动子 7 α P 为 1 382 bp(图 3C),GFP 基因为 720 bp(图

3D)。然后将 PCR 和双酶切鉴定的重组质粒进行测序,测序结果表明,4 个目的片段与 GenBank 中的参考序列同源性均为 100%。以上结果证明,已成功构建重组克隆载体 pMD18-T-BBiZ、pMD18-T-BBiF、pMD18-T-7 α P 和 pMD18-T-GFP。

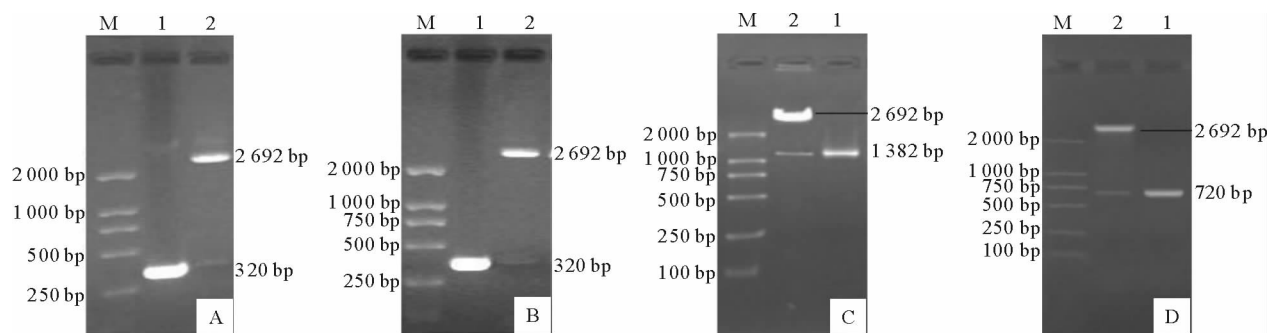


图 3 重组克隆载体的 PCR 和酶切鉴定结果

A. pMD18-T-BBiZ; B. pMD18-T-BBiF; C. pMD18-T-7 α P; D. pMD18-T-GFP

M. DNA Marker DL-2000; 1. PCR 产物; 2. 双酶切产物

Fig. 3 PCR and restriction identification of the recombinant cloned vector

A. pMD18-T-BBiZ; B. pMD18-T-BBiF; C. pMD18-T-7 α P; D. pMD18-T-GFP

M. DNA Marker DL-2000; 1. PCR product; 2. Recombinant cloned vector digested product

2.4 ihpRNA 种子特异性表达载体的构建与鉴定

根据植物中 ihpRNA 原理,以植物表达载体 pCambia1301 为基础,构建具有 BBi 基因反向重

复结构的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS,构建流程见图 4。

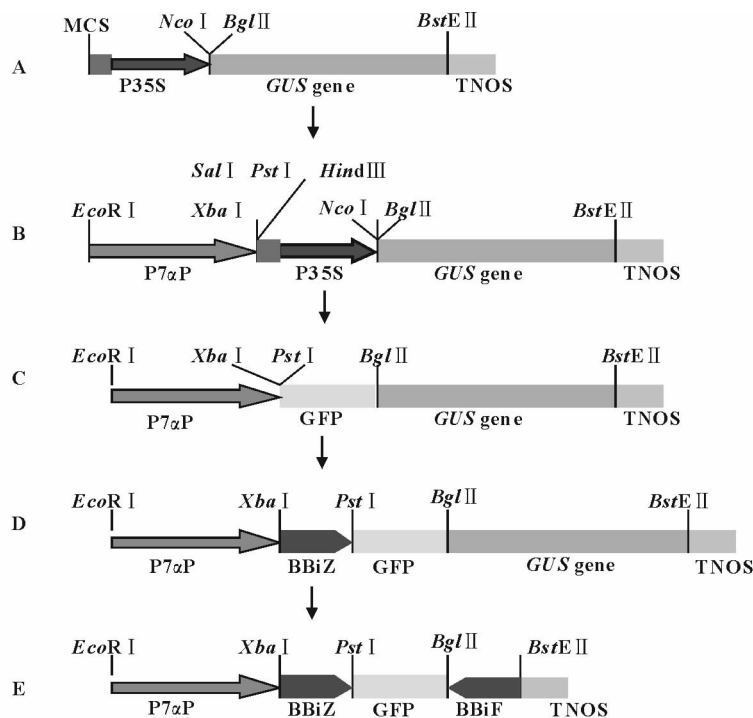


图 4 ihpRNA 种子特异性表达载体的构建流程

A. pCambia1301; B. p1301-7 α P; C. p7 α P-GFP; D. p7 α P-BBiZ-GFP; E. p7 α P-GFP-BBiS

Fig. 4 Flow chart for construction of ihpRNA seed-specific expressed vector

2.4.1 种子特异性表达载体 p1301-7 α P 的构建与鉴定 首先利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 分别双酶切 pMD18-T-7 α P 和 pCAMBIA1301,回收 1 382 bp 的启动子 7 α P 和 pCAMBIA1301 大片段,用 *T*₄DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,用含 50 mg/mL Kan 的 LB 抗性平板筛选阳性克隆(图

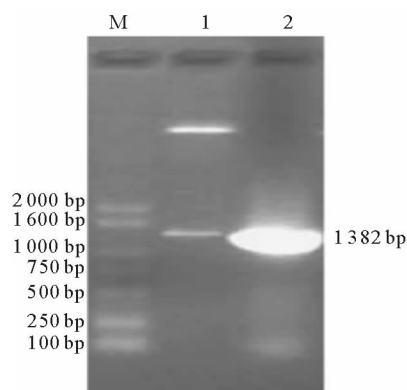


图 5 p1301-7 α P 的 PCR 和酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL-2000; 1. *EcoR* I / *Xba* I 双酶切; 2. PCR 产物

Fig. 5 PCR and restriction identification of p1301-7 α P

M. DNA Marker DL-2000; 1. p1301-7 α P digested by *EcoR* I and *Xba* I; 2. PCR product

2.4.2 中间表达载体 p7 α P-GFP 的构建与鉴定 在构建了种子特异性表达载体 p1301-7 α P 的基础上,插入作为功能性内含子的 GFP 基因,构建中间表达载体 p7 α P-GFP(图 4C)。用 *Pst* I 和 *Bgl* II 分别双酶切 p1301-7 α P 和 pMD18-T-GFP,回收 720 bp 的 GFP 基因和 p1301-7 α P 大片段,采用 2.4.1 中的方法筛选出阳性克隆。用 GFP 基因的特异引物进行 PCR 鉴定,用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 进行双酶切鉴定,电泳结果见图 6。以 p7 α P-GFP 质粒 DNA 为模板,PCR 扩增获得的 720 bp 片段与 GFP 基因大小一致,启动子 7 α P 加上内含子 GFP 的基因大小为 2 102 bp,与用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切结果的大小一致。由此可见,内含子 GFP 基因已成功插入到种子特异性表达载体 p1301-7 α P 中,构建了 RNAi 中间表达载体 p7 α P-GFP。

2.4.3 重组表达载体 p7 α P-BBiZ-GFP 的构建与鉴定 在构建了 RNAi 中间表达载体 p7 α P-GFP 的基础上,插入 BBi 基因正义片段 BBiZ,构建重组表达载体 p7 α P-BBiZ-GFP(图 4D)。利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Pst* I 分别双酶切 pMD18-T-BBiZ 和 p7 α P-GFP,回收 320 bp 的 BBi 基因正义片段 BBiZ 和 p7 α P-GFP 大片段,用 *T*₄DNA 连接酶连接,构建重组表达载体 p7 α P-BBiZ-GFP,PCR 和双酶切电泳

4B)。电泳鉴定结果(图 5)表明,以重组质粒 DNA 为模板,PCR 和双酶切获得的 1 382 bp 片段与启动子 7 α P 的大小一致,说明 7 α P 已成功插入到 pCAMBIA1301 中,种子特异性表达载体 p1301-7 α P 构建成功。

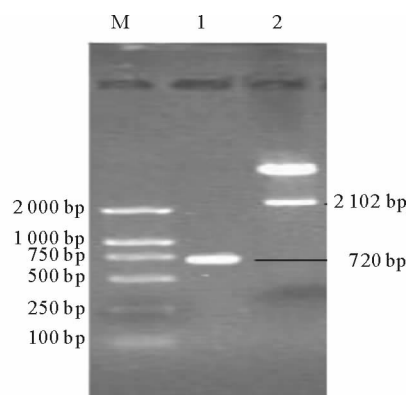


图 6 p7 α P-GFP 的 PCR 和酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL-2000; 1. PCR 产物; 2. *EcoR* I / *Bgl* II 双酶切

Fig. 6 PCR and restriction identification of p7 α P-GFP

M. DNA Marker DL-2000; 1. PCR product; 2. p7 α P-GFP digested by *EcoR* I and *Bgl* II

鉴定结果见图 7。以 p7 α P-BBiZ-GFP 质粒 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 1 条大小约为 320 bp 的特异带,通过 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切得到 1 条与 PCR 产物大小相同的条带,表明 BBi 基因正义片段 BBiZ 插入到 p7 α P-GFP 的启动子 p7 α P 下游,构建重组表达载体 p7 α P-BBiZ-GFP。

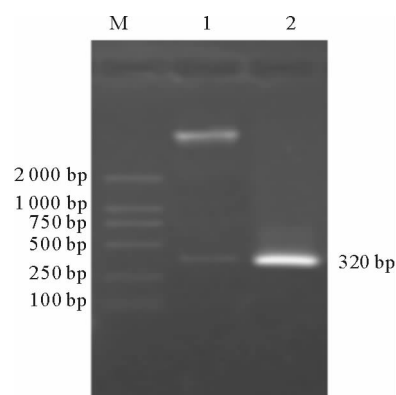


图 7 p7 α P-BBiZ-GFP 的 PCR 和酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL-2000;

1. *Xba* I / *Pst* I 双酶切; 2. PCR 产物

Fig. 7 PCR and restriction identification of p7 α P-BBiZ-GFP

M. DNA Marker DL-2000; 1. p7 α P-BBiZ-GFP digested by *Xba* I and *Pst* I; 2. PCR product

2.4.4 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS 的构建与鉴定 在构建了重组表达载体 p7 α P-BBiZ-GFP 的基础上,插入 BBi 基因反义片段 BBiF,

构建 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS,结果见图 8。

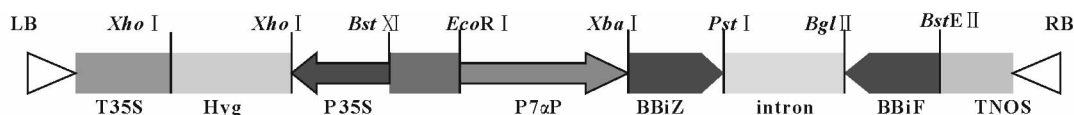


图 8 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS 的 T-DNA 区

LB. T-DNA 的左边界;T35S. CaMV35S 终止子;Hyg. 潮霉素磷酸转移酶基因;P35S. CaMV35S 启动子;P7 α P. 大豆种子特异性启动子 7 α P;intron. GFP 基因;TNOS. 胭脂碱合成酶基因终止子;RB. T-DNA 的右边界

Fig. 8 T-DNA of RNAi constructs of ihpRNA seed-specific expressed vector

LB. The left border of T-DNA;T35S. The terminator of the CaMV35S gene;Hyg. Hygromycin phosphotransferase gene;

P35S. The promoter of CaMV35S;P7 α P. Soybean seed-specific promoter;intron. GFP gene;

TNOS. The terminator of Nopaline synthase gene;RB. The right border of T-DNA

用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 分别双酶切 p7 α P-BBiZ-GFP 和 pMD18-T-BBiF,回收 320 bp 的 BBi 基因反义片段 BBiF 和 p7 α P-BBiZ-GFP 大片段,采用 2.4.1 中的方法筛选出阳性克隆。分别用 7 α P、GFP、BBi 基因的特异引物、7 α P 的上游引物和 NOS 终止子的下游引物,对 p7 α P-GFP-BBiS 进行 PCR 鉴定,结果见图 9。由图 9 可以看出,分别获得与目的基因大小一致的特异条带,其中通过 7 α P 的上游引物和 NOS 终止子的下游引物 PCR 扩增得到了约为 3 007 bp 的 RNAi 完整结构。用 *Xba* I 和 *Pst* I、*Pst* I 和 *Bgl* II、*Bgl* II 和 *Bst*E II 分别对 p7 α P-GFP-BBiS 进

行双酶切鉴定,电泳结果见图 10。图 10 结果表明,用 *Xba* I 和 *Pst* I、*Bgl* II 和 *Bst*E II 双酶切,均得到约为 320 bp 的 BBi 基因正义和反义片段条带,用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 双酶切得到约为 720 bp 的 GFP 基因片段 BBiZ。由此可见,大豆种子特异性启动子 7 α P、BBi 基因正义片段 BBiZ、内含子 GFP 基因、BBi 基因反义片段 BBiF 已经分别连入植物表达载体 pCambia1301 中,并且对完整的 RNAi 表达框架的测序结果进一步证明,已成功构建了具有 BBi 基因反向重复结构的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS。

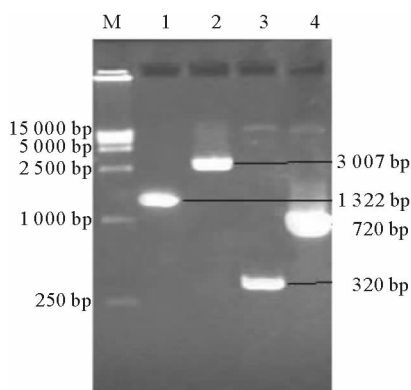


图 9 p7 α P-GFP-BBiS 的 PCR 鉴定结果

M. DNA Marker DL-15000;1. 启动子 7 α P;

2. 完整 RNAi 结构;3. BBi 基因;4. GFP 基因

Fig. 9 PCR identification of p7 α P-GFP-BBiS

M. DNA Marker DL-15000;1. 7 α P promoter;

2. The complete RNAi constructs;3. BBi gene;4. GFP gene

2.5 p7 α P-GFP-BBiS 载体转化农杆菌

将已构建的 ihpRNA 种子特异性表达载体 p7 α P-GFP-BBiS,通过冻融法分别导入根癌农杆菌 EHA105 和 EHA101 感受态细胞中,用卡那霉素进

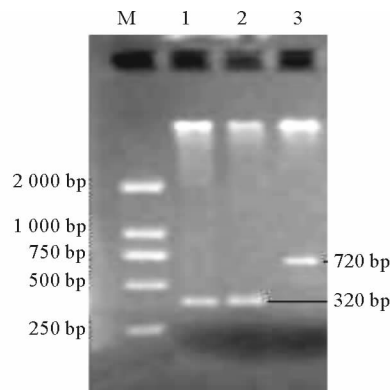


图 10 p7 α P-GFP-BBiS 的酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL-2000;1. *Xba* I / *Pst* I 双酶切;

2. *Pst* I / *Bgl* II 双酶切;3. *Bgl* II / *Bst*E II 双酶切

Fig. 10 Restriction identification of p7 α P-GFP-BBiS

M. DNA Marker DL-2000;1. p7 α P-GFP-BBiS digested by

Xba I and *Pst* I;2. p7 α P-GFP-BBiS digested by *Pst* I

and *Bgl* II;3. p7 α P-GFP-BBiS digested by *Bgl* II and *Bst*E II

行筛选,对转化得到的单菌落分别用 7 α P、GFP、BBi 基因的特异引物进行 PCR 鉴定。由图 11 可知, p7 α P-GFP-BBiS 已分别成功转入农杆菌 EHA105 和 EHA101 中,可直接用于后续的遗传转化。

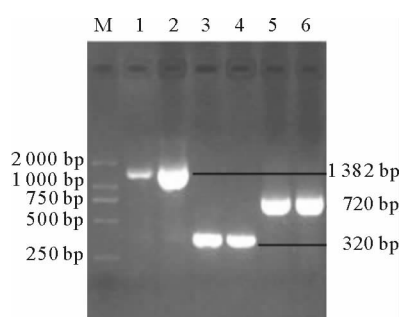


图 11 p7αP-GFP-BBiS 转入农杆菌的 PCR 检测

M. DNA Marker DL-2000;1~2. 启动子 7αP;

3~4. BBi 基因;5~6. GFP 基因

Fig. 11 PCR analysis of p7αP-GFP-BBiS in

Agrobacterium tumefaciens

M. DNA Marker DL-2000;1-2. 7αP promoter;

3-4. BBi gene;5-6. GFP gene

3 讨 论

近年来, RNAi 技术在作物遗传改良中显示出了巨大的应用潜力。Stoutjesdijk 等^[15]利用 RNA 干扰技术成功地在拟南芥中实现了抑制 FAD2 基因表达的目标,且基因抑制效果可在子代稳定传递,首次明确了 RNA 干扰技术在作物种子品质性状改良方面的应用潜力。

本研究根据 RNAi 技术原理,成功构建了具有 ihpRNA 结构的大豆蛋白酶抑制剂 BBi 基因的种子特异性表达沉默载体,为大豆种子中蛋白质的成分改良奠定了基础。在载体构建过程中,由于 BBi 基因不仅在大豆种子中表达,还可在大豆叶片等部位表达而起到抗虫作用,因此,本研究选用大豆 7S 蛋白 α 亚基基因种子特异性启动子,旨在将 RNA 干扰作用限制在种子内部,特异地抑制种子中蛋白酶抑制剂 BBi 基因的表达,而不影响其在大豆其他部位的表达,以充分保证其表达的时空特异性。已有研究表明,如果在靶基因的反向重复序列间加入一段内含子序列,使其在植物体内转录形成 ihpRNA 发夹结构,与 hpRNA 相比,沉默效果可从 55% 提高到 90%^[16]。因此,本研究构建的 RNAi 表达载体在正义和反义链中间插入一段 GFP 基因作为功能性内含子,以期能最大限度地抑制种子中 BBi 基因的表达。此外,本研究构建的 RNAi 中间植物表达载体 p7αP-GFP,可用于大豆等其他作物种子特异表达基因的 RNA 干扰试验,还可以通过替换其他组织特异和诱导型启动子,达到特定器官或特定发育时期或阶段基因沉默的目的。

大豆遗传转化研究可利用农杆菌和子叶节转化系统,由于大豆对农杆菌菌株的敏感性不同,所以本研究选用了根癌农杆菌 EHA105 和 EHA101 作为受体菌株。本研究构建的 ihpRNA 高效表达载体,已应用于大豆转基因工作中,目前已获得具有潮霉素抗性的再生植株,至于该 RNAi 载体能否成功抑制 BBi 基因的表达,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor [J]. Journal Gen Physiol, 1946, 29(3): 149-154.
- [2] Birk Y. Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and α-chymotrypsin from soybeans [J]. Biochem Biophys Acta, 1961, 54: 378-381.
- [3] Hammond R W, Foard D E, Larkins B A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean [J]. Journal Biol Chem, 1984, 259(15): 9883-9890.
- [4] Rackis J J. Biological and physiological factors in soybeans [J]. Journal Am Oil Chem Soc, 1974, 51(1): 161-174.
- [5] Liener I E. Trypsin inhibitors: Concern for human nutrition or not [J]. Journal Nutr, 1986, 116: 920-923.
- [6] 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(19): 806-811.
- [7] Qiao F, Yang Q, Wang C L, et al. Modification of plant height via RNAi suppression of OsGA20ox2 gene in rice [J]. Euphytica, 2007, 158(1/2): 35-45.
- [8] 柴晓杰, 王丕武, 关淑艳, 等. 应用 RNA 干扰技术降低玉米支链淀粉含量 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(6): 625-630.
Chai X J, Wang P W, Guan S Y, et al. Reducing the maize amylopectin content through RNA interference manipulation [J]. Journal Plant Physi Mol Bio, 2005, 31(6): 625-630. (in Chinese)
- [9] Nunes A C, Vianna G R, Cuneo F, et al. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content [J]. Planta, 2006, 224(1): 125-132.
- [10] Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, et al. Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals [J]. Plant Journal, 2000, 24(6): 895-903.
- [11] 李根英, 夏兰芹, 夏先春, 等. Pina 和 Pinb 融合基因表达载体的构建及其在硬粒小麦中的转化 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1315-1323.
Li G Y, Xia L Q, Xia X C, et al. Construction of expression vector harboring Pina and Pinb fused gene and transformation into Durum wheat [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(7): 1315-1323. (in Chinese)

(下转第 96 页)