

网络出版时间:2015-06-10 08:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.07.003

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150610.0840.003.html>

大豆凝集素和脂肪氧化酶双价 RNAi 表达载体的构建及其遗传转化

张学明, 宋 阳, 王丕武, 马 建, 晏佳琳, 付永平,
曲 静, 张 卓, 董环宇, 李 琦

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

【摘要】【目的】应用 RNA 干扰技术,同时抑制大豆凝集素(Soybean agglutinin,SBA)和脂肪氧化酶(Lipoxygenase,Lox)基因在种子中的表达,改良大豆营养品质,为培育优质大豆材料奠定基础。【方法】根据 RNAi 原理,酶切获得 Lox 目的片段,构建以除草剂 Bar 基因为筛选标记、种子特异性启动子 P7 α P 启动 SBA 和 Lox 双干扰的 pCAMBIA3301-SBA-Lox(pSBA-Lox)干扰表达载体,并通过农杆菌介导法转化大豆(品种为吉农 28),采用 PCR、Southern 杂交和实时荧光定量 PCR 对转基因植株进行检测。【结果】质粒 PCR 和酶切鉴定结果表明,双价 RNAi 植物表达载体 pSBA-Lox 构建成功。将其转入到大豆中,对转化植株进行 PCR、Southern 杂交检测,结果显示,外源基因以单拷贝形式整合到植物基因组中,并能遗传给后代。T₁ 代转基因植株的实时荧光定量 PCR 分析显示,转基因植株中 SBA 基因和 Lox 基因在籽粒中的表达量比未转化受体植株均明显降低,SBA 基因表达量降低了 35.9%~47.2%,Lox 基因表达量降低了 32.8%~56.1%,而在幼嫩叶片中的表达量相比对照植株变化不大。【结论】获得了大豆凝集素和脂肪氧化酶表达量均明显降低的 T₁ 代转基因大豆。

【关键词】 大豆;凝集素;脂肪氧化酶;RNA 干扰技术;遗传转化

【中图分类号】 S565.103.53

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)07-0082-07

Construction of RNAi expression vector of soybean agglutinin and lipoxygenase inhibitor genes and its transformation

ZHANG Xue-ming, SONG Yang, WANG Pi-wu, MA Jian, YAN Jia-lin,
FU Yong-ping, QU Jing, ZHANG Zhuo, DONG Huan-yu, LI Qi

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

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to improve the nutritional quality of soybean and create new elite soybean germplasm by using RNA interference to prohibit the expression of agglutinin and lipoxygenase inhibitor genes in soybean seed. 【Method】RNAi expression vector of soybean agglutinin and lipoxygenase inhibitor genes promoted by P7 α P and selected using herbicide, was constructed by digestion and cloning. Then the obtained expression vector was introduced into to soybean cultivar Jinong 28 via agrobacterium-mediated transformation and detected by PCR, Southern blot, and Real-time quantitative PCR. 【Result】RNAi expression vector of soybean agglutinin and lipoxygenase inhibitor genes was successfully obtained. PCR and Southern blot results showed that the transgenic plants were also successfully established. Real-time quantitative PCR in T₁ generation demonstrated that the expression of soybean agglu-

【收稿日期】 2014-01-17

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30971805);转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-004)

【作者简介】 张学明(1987-),男,吉林长春人,在读硕士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:254024178@qq.com

【通信作者】 王丕武(1958-),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:peiww@163.com

tinin and lipoxygenase in transgenic soybeans was significantly inhibited. The expression of soybean agglutinin decreased by 35.9%—47.2% and that of lipoxygenase decreased by 32.8%—56.1%. **【Conclusion】** Transgenic plant lines of T₁ generation with prohibited expression of soybean agglutinin and lipoxygenase inhibitor genes in seed were obtained.

Key words: soybean; soybean agglutinin; lipoxygenase; RNAi; transformation

大豆是我国重要的粮食作物和油料作物,含有丰富的蛋白质且氨基酸平衡性好,是优质蛋白质的主要来源^[1]。但大豆同时也含有许多抗营养因子,包括大豆凝集素、脂肪氧化酶、胰蛋白酶抑制剂、植酸、脲酶等,严重影响了大豆的品质^[2-4]。

大豆凝集素(Soybean agglutinin, SBA)具有典型的豆科植物凝集素的四聚体结构,能够凝集动物红细胞和其他细胞,破坏小肠正常结构,干扰肠道对营养物质的消化吸收,对动物的生长发育及吸收均有影响,严重影响了大豆蛋白质的利用率^[5-6];但凝集素亦可作用于昆虫消化道上皮细胞的糖蛋白受体,具有防御虫害侵袭、抑制害虫生长、抵御病原微生物入侵等功能,起到抗虫作用^[7]。脂肪氧化酶(Lipoxygenase, Lox),又称脂肪加氧酶或脂肪含氧酶,是一种含非血红素铁、不含硫的球型无色可溶蛋白质,可专一催化不饱和脂肪酸的氧化反应,与食品中的蛋白质和氨基酸结合,从而使豆制品产生豆腥味和苦涩味,同时还会破坏人体必需脂肪酸,降低大豆蛋白的营养价值,严重影响了豆类食品的质量^[8-10]。

大豆凝集素和脂肪氧化酶的消除能明显提高大豆的营养价值和食用安全性。大豆凝集素在湿热条件下易变性失活,利用 95 °C 30 min, 100 °C 20 min 或 105 °C 10 min 的湿热法处理均可使其生物学和抗营养作用丧失;在高温 120 °C 以上时,干热法处理也可使其失活^[11]。脂肪氧化酶在 85 °C 湿热条件下处理 10 min 后,其活性大幅度降低,但同时会对其他蛋白和酶类造成破坏^[12]。此外,利用抗营养因子的化学特性,通过添加某些化合物破坏其结构,也可以达到消除或缓解抗营养物质的目的,但存在化学物质残留,且排出的脱毒液会造成环境污染等问题。

解决大豆抗营养因子影响最根本、有效的方法是,利用回交育种对大豆凝集素、脂肪氧化酶进行改良,但这种方法育种周期长、品种资源有限,而且同时对 2 个性状进行改良难度较大。随着基因工程研究的深入,转基因技术在大豆育种中的应用日益广泛, RNAi 技术在作物品质改良中显示出极大的应用价值,为培育缺失抗营养因子的大豆新品种开辟

了一条崭新的途径。

本研究利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,用植物表达载体 pC1301-LoxRi 和 pCAMBIA3301-KTi-SBA,构建了同时具有 SBA 和 Lox 2 个基因反向重复结构的双价 RNAi 种子特异性表达载体 pCAMBIA3301-SBA-Lox(pSBA-Lox),通过 RNAi 的抑制作用降低大豆种子中凝集素和脂肪氧化酶的含量,探讨双价干扰表达载体对 2 个目的基因同时抑制的表达效果,以期为改良大豆品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试大豆品种“吉农 28”,单价 RNAi 植物表达载体 pC1301-LoxRi、携带种子特异性启动子 P7 α P 和草丁膦除草剂抗性基因 Bar 的 pCAMBIA3301-KTi-SBA 双价 RNAi 表达载体,大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α)、农杆菌 EHA105 等,均由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 V-gene 公司,植物基因组 DNA 提取试剂盒、pMD18-T Vector 载体试剂盒、DNA Marker、PCR Kit、SYBR Premix Ex TaqTM试剂盒购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶、T4 DNA Ligase、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 FERMENTAS 公司, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自 Roche 公司,其他试剂均为国产分析纯。引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.2 RNAi 双价表达载体的构建

首先将吉林农业大学植物生物技术中心提供的基础表达载体 pC1301-LoxRi 和 pCAMBIA3301-KTi-SBA 分别用 *Sal* I 限制性内切酶进行单酶切,利用 T4 连接酶将酶切得到的 Lox 基因小片段与 pCAMBIA3301-KTi-SBA 载体大片段相连接,用 Lox 基因反义片段替换 pCAMBIA3301-KTi-SBA 中的 KTi 基因,得到中间载体 pCAMBIA3301-SBA-LoxF。

根据 GenBank 中已知的大豆凝集素基因序列(编号: K00821、M30884)和脂肪氧化酶基因序列(编号: GMU50081、X13302、X06928、AY028297),

用 Primer Premier 5.0 软件设计凝集素基因引物 SBAs、SBAAs, 脂肪氧化酶基因引物 Loxs、Loxas (表 1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
SBA-Lox	SBA-Loxs	5'-TTGGGTTACCATCCACATTTGGGACAGC-3'
	SBA-Loxas	5'-GGGAAGCTTGAATGGCTCAACAACCTGC-3'
SBA	SBAs	5'-ATCCACATTTGGGACAGC-3'
	SBAAs	5'-TGGCAAATTGGAAGAAAA-3'
Lox	Loxs	5'-GAAGGGCTCACTGTAGATG-3'
	Loxas	5'-GAATGGCTCAACAACCTGC-3'
Bar	Bars	5'-AAGTCCAGCTGCCAGAAAACC-3'
	Baras	5'-CCATCGTCAACCACTACATC-3'
Actin	QActins	5'-CGGTGGTTCTATCTTGGCATC-3'
	QActinas	5'-GTCTTTCGCTTCAATAACCCCTA-3'
Lox	QLoxs	5'-GCAGATGAAGGTGTTGAA-3'
	QLoxas	5'-GGCTGACAAGTTGATGAT-3'
SBA	QSBAAs	5'-ACGACCAAGTAACCAATGT-3'
	QSBAAs	5'-TCTCTGCGAAGGATGAAC-3'
Bar	QBars	5'-CGTCCACTCCTGCGGTTC-3'
	QBaras	5'-ACCATCGTCAACCACTACAT-3'

注: 加下划线的部分代表酶切位点的碱基。

Note: The bases with underline represent restriction enzyme cutting site.

以中间载体 pCAMBIA3301-SBA-LoxF 为模板, 利用引物 SBA-Loxs、SBA-Loxas 扩增 SBA-Lox 双片段。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 21 个循环; 72 °C 后延伸 8 min。SBA 基因片段 PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 后延伸 10 min。Lox 基因片段 PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 后延伸 8 min。

将扩增得到的 SBA-Lox 双片段连入 pMD18-T

载体, 得到重组克隆载体 pMD18-SBA-Lox。将重组克隆载体 pMD18-SBA-Lox 与中间载体 pCAMBIA3301-SBA-LoxF 分别进行 *BstE* II、*Hind* III 双酶切, 在 T4 连接酶作用下将中间载体 pCAMBIA3301-SBA-LoxF 中的 KTi-SBA 反义片段替换为目的基因 SBA-Lox 正义片段。对重组载体进行 PCR 和酶切鉴定, 并进行测序, 测序正确的表达载体即为大豆凝集素和脂肪氧化酶双价 RNAi 表达载体, 将其命名为 pSBA-Lox, 其 T-DNA 区结构见图 1。

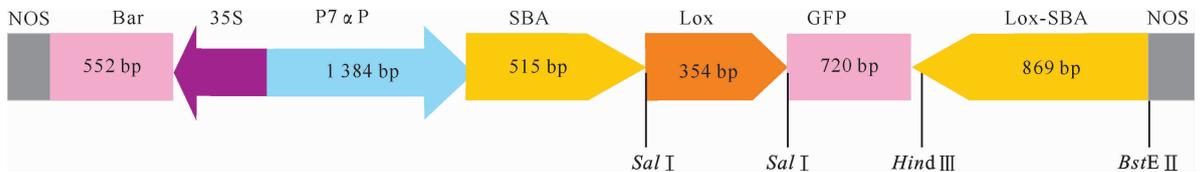


图 1 双价 RNAi 表达载体 pSBA-Lox 的 T-DNA 区结构

Fig. 1 Structural map of T-DNA region of plant expression vector pSBA-Lox

1.3 pSBA-Lox 的遗传转化

用冻融法将通过酶切鉴定的重组植物表达载体 pSBA-Lox 质粒 DNA 转化到农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞中, 根据王丕武等^[13]的方法进行大豆品种“吉农 28”的遗传转化。

1.4 转基因植株的检测

1.4.1 PCR 检测 根据已知的 Bar 基因序列(552 bp)设计引物, 引物序列见表 1。取 T₀ 和 T₁ 代再生大豆植株叶片提取 DNA, 进行 PCR 检测, 以未转基因的植株作为阴性对照, 以质粒作为阳性对照。

PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。

1.4.2 Southern 杂交检测 对经 PCR 检测为阳性的转基因植株,采用 CTAB 法^[14]大量提取其叶片基因组 DNA,然后进行 Southern 杂交检测。以纯化的 Bar 基因为模板制备探针,以未转基因的植株作为阴性对照,以质粒回收产物作为阳性对照,采用随机引物标记法进行标记,杂交及检测其他步骤均按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒说明书操作。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测 提取经 PCR、Southern blot 检测均为阳性的 T₁ 代转化植株幼嫩叶片和籽粒的总 RNA,反转录成相应的 cDNA,对目的片段 SBA、Lox 和 Bar 进行实时荧光定量 PCR 检测。以大豆 β -actin 基因(GenBank 登录号为 TC204137)为内参基因,对转基因大豆植株中 Lox 基因、SBA 基因和 Bar 基因的表达量分别进行相对定量分析,设置 4 次重复。根据相应的 cDNA 序列

设计定量 PCR 引物,引物序列见表 1。依据 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书操作,扩增目的基因。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 10 s,60 °C 反应 40 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法,分析内源目的基因和外源目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 RNAi 双价表达载体的构建及鉴定

以基础表达载体 pC1301-LoxRi 为模板,通过 *Sal* I 单酶切,得到与预期大小一致的目的片段 Lox (图 2)。测序结果表明,Lox 基因片段大小为 354 bp,与 GenBank 中报道的序列同源性达到 100%。利用 T4 连接酶将 Lox 基因片段与 pCAMBIA3301-KTi-SBA 载体大片段相连,构建中间载体 pCAMBIA3301-SBA-LoxF,采用连接酶和 PCR 扩增方法构建重组克隆载体 pMD18-SBA-Lox,PCR 和酶切鉴定结果(图 3)显示,均得到大小约为 869 bp 的片段,表明重组克隆载体 pMD18-SBA-Lox 构建成功。

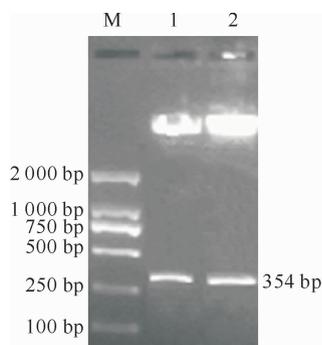


图 2 基础表达载体 pC1301-LoxRi 的酶切结果

M. DNA Marker;1~2. 酶切产物

Fig. 2 Digestion of basic expression vector pC1301-LoxRi

M. DNA Marker;1-2. Products of digestion

分别对 Lox 目的片段、SBA 目的片段和 SBA-Lox 双片段进行特异性扩增,对构建成功的大豆凝集素和脂肪氧化酶双价 RNAi 表达载体 pSBA-Lox 进行 PCR 和酶切鉴定。PCR 鉴定结果(图 4)显示,得到与预期大小相符的 354 bp Lox 基因片段、515 bp SBA 基因片段和 869 bp SBA-Lox 双片段。pSBA-Lox 酶切鉴定结果(图 5)显示,用 *Sal* I 单酶切,得到 1 条大小约为 354 bp 的片段;用 *Hind* III 和 *Bst* E II 双酶切,得到 1 条大小约为 869 bp 的片段。

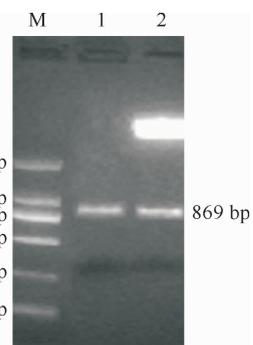


图 3 重组克隆载体 pMD18-SBA-Lox 的 PCR 和酶切鉴定

M. DNA Marker;1. PCR 产物;2. *Hind* III / *Bst* E II 双酶切

Fig. 3 Identification of recombinant cloning vector pMD18-SBA-Lox

M. DNA Marker;1. PCR product;2. pMD18-SBA-Lox digested by *Hind* III and *Bst* E II

PCR 和双酶切鉴定结果及测序结果表明,双价 RNAi 表达载体 pSBA-Lox 构建成功。

2.2 转基因植株的检测

2.2.1 PCR 检测 采用农杆菌介导法对大豆品种“吉农 28”进行遗传转化,获得了具有草丁膦除草剂抗性的转化植株 23 株。提取抗性苗的叶片基因组 DNA,对筛选标记 Bar 基因进行 PCR 检测,得到大小约 552 bp 的 Bar 基因特异性条带(图 6),与预期结果相一致。

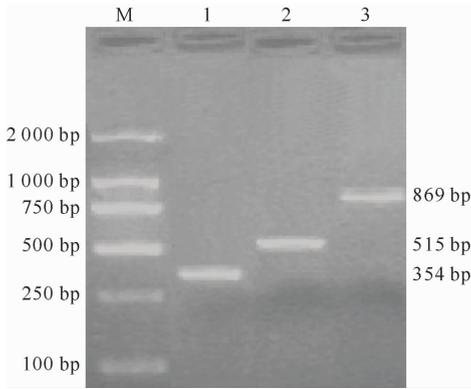


图 4 双价 RNAi 表达载体 pSBA-Lox 的 PCR 鉴定

M. DNA Marker; 1. Lox 基因; 2. SBA 基因; 3. SBA-Lox 双片段

Fig. 4 PCR analysis of plant expression vector pSBA-Lox

M. DNA Marker; 1. Lox gene; 2. SBA gene;
3. Fragment of SBA-Lox

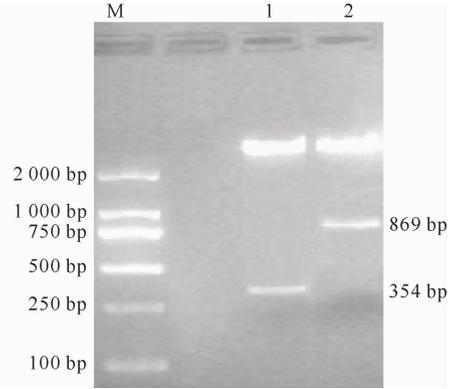


图 5 双价 RNAi 表达载体 pSBA-Lox 的酶切鉴定

M. DNA Marker; 1. Lox 基因; 2. SBA-Lox 双片段

Fig. 5 Restriction enzyme analysis of plant expression vector pSBA-Lox

M. DNA Marker; 1. Lox gene; 2. Fragment of SBA-Lox

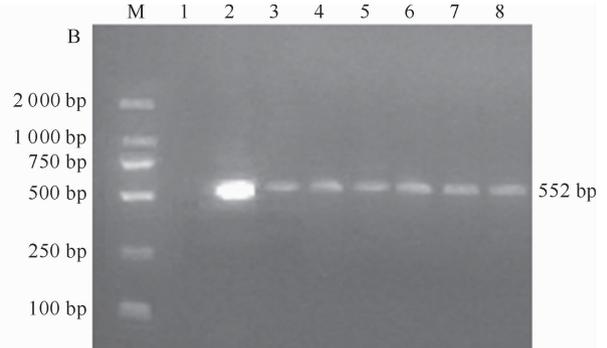
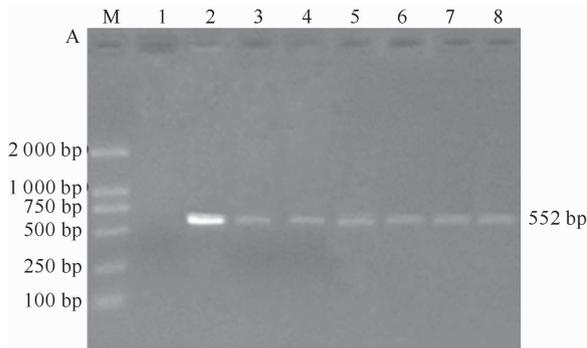


图 6 转基因大豆的 PCR 检测

A. T₀ 代 Bar 基因片段 PCR 检测; B. T₁ 代 Bar 基因片段 PCR 检测;

M. DNA Marker; 1. 未转基因植株(阴性对照); 2. 质粒阳性对照; 3~8. 转基因阳性植株

Fig. 6 PCR analysis of transgenic soybeans

A. PCR detection for Bar gene of T₀; B. PCR detection for Bar gene of T₁;

M. DNA Marker; 1. Negative control of transformed plant; 2. Positive control of plasmid; 3-8. Putative transgenic plants

2.2.2 Southern 杂交检测 从阳性的 T₁ 代植株中随机选取 4 株进行 Southern 杂交, 结果见图 7。

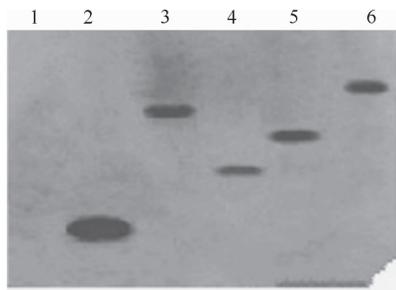


图 7 转基因大豆的 Southern blot 检测

1. 阴性对照(未转化的大豆植株);

2. 阳性对照; 3~6. 转基因植株

Fig. 7 Southern blot analysis of transgenic soybean

1. Non-transformed plant as negative control;

2. Positive control; 3-6. Transgenic soybeans

图 7 结果显示, 4 株转基因大豆均具有明显的杂交信号, 且杂交带大小不一, 而选取的未转基因对照植株无杂交信号产生, 进一步证明这 4 株转基因植株是转基因阳性植株, 说明筛选标记 Bar 片段已经整合到大豆的基因组中, 整合形式均为单拷贝形式。

2.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 SBA 基因和 Lox 基因的表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 设定未转化受体植株的表达量为 1, 结果见图 8。由图 8 可以看出, 转化植株籽粒中 SBA 基因和 Lox 基因的表达量比对照受体植株均明显降低, SBA 基因表达量降低了 35.9%~47.2%, Lox 基因表达量降低了 32.8%~56.1%; 转化植株幼嫩叶片中 SBA 基因和 Lox 基因的表达量比对照植株分别降低 7.4%~9.3% 和 8.9%~12.5%, 说明受种子特异性启动子 P7 α P 调

控的 SBA 基因和 Lox 基因表达量在籽粒中受明显抑制,而在叶片中所受影响不大。统计分析结果显示,与对照相比,转化植株 1 的 SBA 基因在籽粒中

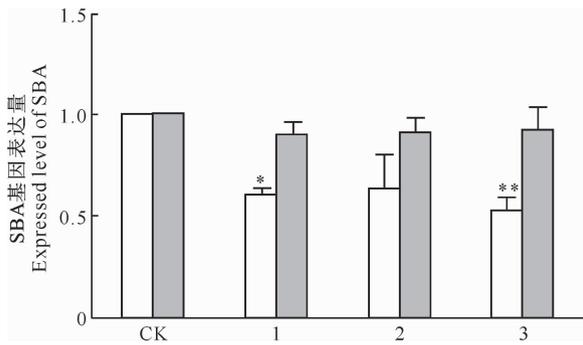


图 8 SBA 基因和 Lox 基因在转基因大豆籽粒和叶片中的表达

□, 籽粒; ■, 叶片; 1, 2, 3, 转基因植株; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同

Fig. 8 Expression profiles of SBA and Lox in seed and leaf of transgenic soybeans

□, Seed; ■, Leaf; 1, 2, 3, Transgenic soybeans; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below

图 9 结果显示,未转化受体植株不表达 Bar 基因,但在转化植株的籽粒和幼嫩叶片中均有表达,且这 2 个部位表达差异不大。统计分析结果显示,与对照相比,3 个转化植株 Bar 基因在籽粒中的表达量极显著提高。

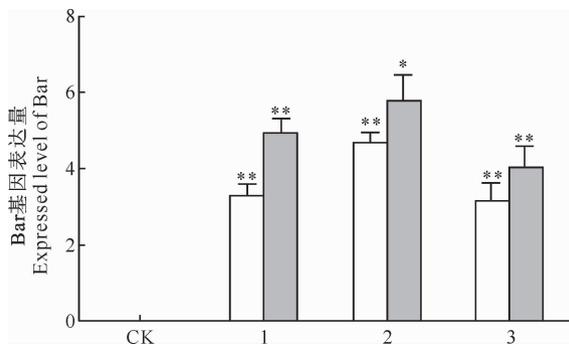


图 9 Bar 基因在转基因大豆籽粒和叶片中的表达

□, 籽粒; ■, 叶片; 1, 2, 3, 转基因植株

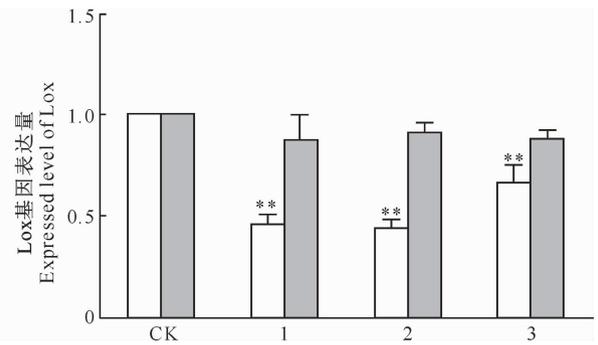
Fig. 9 Expression profiles of Bar gene in seed and leaf of transgenic soybeans

□, Seed; ■, Leaf; 1, 2, 3, Transgenic soybeans

3 讨论

目前,关于大豆凝集素和脂肪氧化酶抑制改良的研究主要集中在转录水平上,而对转录后表达调控的报道较少,且主要是利用传统育种技术获得凝集素、脂肪氧化酶缺失的大豆品种,这个过程不仅耗时,且改良所需的突变体材料有限。RNA 干扰是一种由双链 RNA 介导、能够高效特异性沉默目标基因的转录后基因沉默现象,在进化过程中高度保守。在应用转基因技术抑制大豆凝集素和脂肪氧化酶表

表达量显著降低($P < 0.05$),转化植株 3 则表现为极显著降低($P < 0.01$);3 个转化植株的 Lox 基因在籽粒中的表达量均极显著降低($P < 0.01$)。



达方面,马建等^[15]应用重组 PCR 技术构建了大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体;魏益凡等^[16]和魏强等^[5]先后构建了大豆凝集素 Le1 基因和 le2 基因的 RNAi 表达载体。

Wesley 等^[17]发现,干扰效率与目的片段的长短有密切联系,大小在 300~600 bp 的片段更易获得较高的干扰效率。此外,研究发现,植物中某一基因的蛋白质产物可能广泛存在于植株的各个组织,因此,对某一基因进行改良有可能对植株的很多器官造成影响^[18-19]。本研究根据 RNA 干扰载体的最佳构建原则,选择大豆凝集素和脂肪氧化酶基因大小分别为 515 和 354 bp 的核心片段,以期达到高效沉默 SBA 和 Lox 基因表达的目的。针对大豆凝集素和脂肪氧化酶的抗营养抑制特点,本研究应用 RNAi 技术结合种子特异性启动子 P7_αP,有针对性地抑制 SBA 基因和 Lox 基因在种子中的表达;实时荧光定量 PCR 结果显示, T₁ 代阳性植株籽粒中 SBA 基因和 Lox 基因的表达量比对照受体植株均明显降低,但转基因植株幼嫩叶片中 SBA 基因和 Lox 基因表达量相比对照植株变化不大。说明在转基因植株种子中有效抑制表达 SBA 基因和 Lox 基因的同时,未对转基因植株的叶片部位造成明显影响,这样在改良大豆营养品质的同时,可以保留其原有的抗虫性。转基因后代植株 SBA 基因和 Lox 基因的表达效果及遗传稳定性还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 卢义伯,潘超.大豆功能因子的研究进展[J].现代食品科技,2007,23(2):105-108.

- Lu Y B, Pan C. Research progress of soybean functional factors [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(2): 105-108. (in Chinese)
- [2] 李德发. 大豆抗营养因子 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003.
- Li D F. Soybean antinutritional factors [M]. Beijing: China Science Press, 2003. (in Chinese)
- [3] Reinprecht Y, Yan S L, Yu K F, et al. Molecular basis of seed lipoxygenase null traits in soybean line OX948 [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 1247-1264.
- [4] Fasoyiro S B, Ajibade S R, Omole A J, et al. Proximate, minerals and antinutritional factors of some underutilized grain legumes in south-western Nigeria [J]. *Nutrition and Food Science*, 2006, 36(1): 18-23.
- [5] 魏 强, 李鲁华, 王春艳, 等. 大豆凝集素 *le2* 基因 RNA 干扰表达载体构建及转化的研究 [J]. *大豆科学*, 2013, 32(6): 306-309.
- Wei Q, Li L H, Wang C Y, et al. Construction of RNAi expressed vector of soybean agglutinin *le2* gene and transform research [J]. *Soybean Science*, 2013, 32(6): 306-309. (in Chinese)
- [6] Reynald T, Mary F, Rima M, et al. High-yield expression of recombinant soybean agglutinin in plants using transient and stable systems [J]. *Transgenic Res*, 2011(20): 345-356.
- [7] 魏 强. 凝集素基因干扰表达体系的研究 [D]. 吉林长春: 吉林农业大学, 2013: 32-34.
- Wei Q. The research on interference expression system of lectin gene [D]. Changchun, Jilin: Jilin Agriculture University, 2013: 32-34. (in Chinese)
- [8] 马 建, 张 君, 曲 静, 等. 应用 RNA 干扰技术创造低脂肪氧化酶活性大豆新种质 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(11): 3804-3811.
- Ma J, Zhang J, Qu J, et al. Development of novel soybean germplasm with low activity of lipoxygenases by RNAi method [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(11): 3804-3811. (in Chinese)
- [9] 韩粉霞, 丁安林, 孙君明, 等. 大豆脂肪氧化酶同工酶全缺失种质的创新 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(2): 197-202.
- Han F X, Ding A L, Sun J M, et al. Development of new type soybean germplasm with null lipoxygenase [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(2): 197-202. (in Chinese)
- [10] Toyoda K, Kawanishi Y, Kawamoto Y, et al. Suppression of mRNAs for lipoxygenase (LOX), allene oxide synthase (AOS), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) in pea reduces sensitivity to the phytotoxin coronatine and disease development by *Mycosphaerella pinodes* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2013, 9: 321-334.
- [11] 戴大章, 陈妙月, 刘建新, 等. 大豆凝集素的灭活研究 [J]. *粮油加工与食品机械*, 2003(5): 45-47.
- Dai D Z, Chen M Y, Liu J X, et al. Inactivation study of soybean agglutinin [J]. *Machinery for Cereals Oil and Food Processing*, 2003(5): 45-47. (in Chinese)
- [12] 胡廷章, 胡宗利, 屈霄霄, 等. 植物脂肪氧化酶的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 1-9.
- Hu T Z, Hu Z L, Qu X X, et al. Advances in plant lipoxygenases research [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(1): 1-9. (in Chinese)
- [13] 王丕武, 武丽敏, 张 君, 等. Bt+CpTI 抗虫基因转化大豆的研究 [C]//第四届全国植物分子育种学术研讨会论文集. 上海: 中国生物化学与分子生物学会, 2004.
- Wang P W, Wu L M, Zhang J, et al. A study on transformation of Bt+CpTI insect resistant gene into soybean [C]//The Forth National Plant Molecular Breeding Symposium. Shanghai: Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004. (in Chinese)
- [14] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744.
- Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002: 744. (in Chinese)
- [15] 马 建, 厉 志, 刘艺苓, 等. 应用重组 PCR 技术构建大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(4): 564-568.
- Ma J, Li Z, Liu Y L, et al. Use recombinant PCR to construct RNAi expression vector of soybean lipoxygenase [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(4): 564-568. (in Chinese)
- [16] 魏益凡, 马 建, 付永平, 等. 抑制大豆 *Le1* 基因表达的 RNAi 载体构建 [J]. *吉林农业科学*, 2010, 35(3): 18-20.
- Wei Y F, Ma J, Fu Y P, et al. Construction of RNAi vector inhibit expression of soybean *Le1* gene [J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 2010, 35(3): 18-20. (in Chinese)
- [17] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient effective and high through put gene silencing in plants [J]. *Plant J*, 2001, 27(6): 581-590.
- [18] 付永平, 周海涛, 王丕武. 大豆种子特异性启动子的克隆及功能分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(12): 105-110.
- Fu Y P, Zhou H T, Wang P W. Cloning and identification of the seed specific promoter from soybean [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2009, 37(12): 105-110. (in Chinese)
- [19] Ma Q H, Wang X M, Wang Z M. Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific Lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development [J]. *J Plant Growth Regul*, 2008, 27(1): 68-76.