

网络出版时间:2015-06-30 13:47

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.08.031

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.031.html>

大豆查尔酮还原酶 1 基因的克隆及转化

李 丹, 吴 楠, 郑成忠, 张 琳, 马 建, 曲 静, 张 卓, 付永平, 王丕武

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

【摘 要】 **【目的】**克隆大豆查尔酮还原酶 1(*CHR1*) 基因, 以构建的过表达载体 pCAMBIA3301-*CHR1* 转化大豆, 获得含有 *CHR1* 基因的阳性植株, 为研究该基因的功能奠定基础。**【方法】**以大豆基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增克隆 *CHR1* 基因, 构建植物过表达载体 pCAMBIA3301-*CHR1*, 对其进行 PCR 及双酶切鉴定。采用农杆菌介导法将该载体转入大豆“吉农 28”中, 对转基因植株进行 PCR、Southern 杂交检测, 对 *CHR1* 基因 mRNA 相对表达量进行荧光定量 PCR 检测。**【结果】**克隆得到的 *CHR1* 基因大小为 1 100 bp。成功构建了植物过表达载体 pCAMBIA3301-*CHR1*, 将其转化大豆后, 通过 PCR 检测获得 T₁ 代转基因大豆植株 12 株; Southern 杂交检测结果显示, *CHR1* 基因以单拷贝形式整合入大豆基因组中; 荧光定量 PCR 检测结果显示, 转基因植株的 *CHR1* mRNA 相对表达量高于非转基因大豆植株。**【结论】**成功构建了过表达载体 pCAMBIA3301-*CHR1*, 并获得了 *CHR1* 基因表达量高的转基因大豆。

【关键词】 大豆查尔酮还原酶 1 基因; 克隆; 表达载体构建; 农杆菌介导

【中图分类号】 Q78; S565.103.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)08-0071-08

Cloning and transformation of chalcone reductase 1 gene of soybean

LI Dan, WU Nan, ZHENG Cheng-zhong, ZHANG Lin, MA Jian,

QU Jing, ZHANG Zhuo, FU Yong-ping, WANG Pi-wu

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

Abstract: **【Objective】** The chalcone reductase 1 (*CHR1*) gene was cloned from soybean, and the over-expression vector pCAMBIA3301-*CHR1* was constructed and transformed into soybean to obtain transgenic plants. **【Method】** The *CHR1* gene was cloned by PCR using soybean genomic DNA as template. Then the plant over-expression vector of pCAMBIA3301-*CHR1* was constructed and identified by PCR and double digestion before being transformed into soybean variety “Jinong 28” by *Agrobacterium* mediation. The transgenic plants were detected by PCR and Southern blotting, and mRNA expression of *CHR1* gene was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **【Result】** The cloned *CHR1* gene was 1 100 bp. The plant over-expression vector pCAMBIA3301-*CHR1* was constructed successfully and transformed into soybean. A total of 12 T₁ generation transgenic plants were obtained by PCR detection. Southern blotting showed that the *CHR1* gene was integrated into soybean genome by single copy and real-time fluorescence quantitative PCR showed that mRNA expression of transgenic plants was higher than in non-transgenic plants. **【Conclusion】** The plant over-expression vector pCAMBIA3301-*CHR1* was successfully constructed, and transgenic soybeans with high expression level of *CHR1* gene were obtained.

Key words: chalcone reductase 1 (*CHR1*) gene of soybean; clone; construction of expression vector;

【收稿日期】 2014-01-08

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目“大豆查尔酮还原酶(CHR)在大豆苷元合成中的作用机理研究”(31771568)

【作者简介】 李 丹(1987—), 女, 吉林长春人, 在读硕士, 主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。

E-mail: 604402388@qq.com

【通信作者】 王丕武(1958—), 男, 吉林长春人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种及生物技术研究。

E-mail: peiwuw@163.com

Agrobacterium-mediated

大豆异黄酮是一种非固醇类物质,还可作为一种植物雌激素,具有重要的营养学价值及健康保护作用^[1-4]。近年来,大豆异黄酮生物学活性的多样性受到了各国研究人员的关注。大豆苷元是大豆异黄酮的主要组分之一,又被称为大豆黄酮,具有广泛的生理功能^[5-6],如抗肿瘤,预防和治疗心脑血管疾病、动脉粥样硬化,提高机体免疫力等功能^[7-10]。Choi 等^[11]在研究大豆苷元与细胞周期蛋白关系中发现,大豆苷元对防治乳腺癌有明显的效果。Welle 等^[12-13]研究发现,大豆细胞经大豆疫霉根腐病激发子处理后,诱导了大豆查尔酮还原酶(CHR)的生成。研究还发现,大豆苷元对植物的抗病性等有影响^[14-15]。

目前所知的植物中大豆苷元的含量较低,利用传统育种技术提高大豆苷元含量所需周期长,效率低,而且种质资源有限,难以满足生产的需要。通过对大豆苷元生物合成途径的研究发现,大豆苷元是由大豆苯丙氨酸代谢途径代谢合成的。首先苯丙氨酸在苯丙氨酸裂解酶(PAL)的作用下生成肉桂酰胺,肉桂酰胺被 4-羟基肉桂酰胺酶(C4H)催化生成对香豆酸,又在香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)的作用下转化成对香豆醛辅酶 A,然后由查尔酮还原酶与查尔酮合成酶(CHS)共同作用,催化丙二酰基辅酶 A 与对香豆醛辅酶 A 合成 4,2',4'-三羟基苯基苯乙烯酮(异甘草素),而异甘草素在查尔酮异构酶(CHI)的催化下生成甘草素,甘草素再被异黄酮合成酶(IFS)催化,最终合成了大豆苷元^[16]。通过对比大豆苷元与另一种异黄酮主要组分染料木素的生物合成途径发现,查尔酮还原酶仅存在于大豆苷元的合成途径中,是大豆苷元与染料木素合成途径中的一个重要分支点,查尔酮还原酶对大豆苷元的合成起着重要作用。

目前,常用的植物表达载体有 pCAMBIA3301 和 pBI121。pCAMBIA3301 是一种常见的植物表达载体,已在植物基因工程中被广泛采用。pCAMBIA3301 植物表达载体在大肠杆菌中拷贝数高,能在农杆菌中稳定复制,其载体上含有除草剂筛选标记,在大豆遗传转化中的筛选体系稳定、成熟,能提高筛选速度和效率。所以本试验选择植物表达载体 pCAMBIA3301 为基础载体,在克隆大豆查尔酮还原酶 1(CHR1)基因的基础上,构建了 CHR1 基因过表达载体,采用农杆菌介导法转入大豆,使 CHR1

基因在大豆中得以增量表达,获得含有 CHR1 基因的转基因植株,以期研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物受体材料 大豆品种“吉农 28”由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 EHA105、植物表达载体 pBI121、改造过的植物表达载体 pCAMBIA3301,均由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

1.1.3 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶以及 DNA Marker DL2000、DL8000,均购自 MBI;植物基因组 DNA 提取试剂盒、Total RNA Extraction Kit 提取试剂盒、AU-in-One™ First-Strand cDNA 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq,均购自 TaKaRa 公司;高纯质粒小量提取试剂盒购自威格拉斯生物技术公司;Southern 杂交试剂盒购自罗氏公司;引物由北京三博远志公司合成;其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 CHR1 基因的克隆 利用 CTAB 法对大豆叶片进行基因组 DNA 的提取。根据 GenBank 中发表的 CHR 基因(X55730.1)序列,利用引物设计软件 Primer 5.0 设计 CHR1 特异性引物,CHR1-PS: 5'-GGG TCTAGAATGGCTGCTGCTATTGAA-ATCC-3', CHR1-PAS: 5'-TTTGAGCTCTATTT-GATCATCCCAGAGATCAGC-3'。使用特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系:10 $\times$ buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.6 μ L, CHR1-PS、CHR1-PAS (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA 1.1 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 36 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。将扩增出的 CHR1 基因经 Xba I、Sac I 双酶切后连入 pMD18-T Vector* 1(购自 MBI)中,酶切体系 20 μ L;2 μ L Tango Buffer, 8 μ L 模板(重组克隆载体 pMD18-T-CHR1 的质粒), 1 μ L Xba I 和 Sac I, ddH₂O 补足至 20 μ L。在孵育器中 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h。然后进行大肠杆菌 DH5 α 的转化,在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上筛选出阳性克隆,对转化得到

的阳性克隆进行 PCR 和酶切鉴定,琼脂糖凝胶回收并测序。

1.2.2 亚克隆载体 pBI121-CHR1 的构建与鉴定
通过 DNAMAN 软件对 *CHR1* 基因和 pCAMBIA3301 的限制性酶切位点进行分析,结果发现 *CHR1* 基因内存在载体上本身含有的 *Eco*91 I 酶切位点,无法直接与 pCAMBIA3301 连接,因此需先利用亚克隆技术构建 pBI121-CHR1 载体来解决这个问题。用 *CHR1* 特异性引物对构建的 pMD18-T-CHR1 载体进行 PCR 扩增,用 *Xba* I、*Sac* I 双酶切 *CHR1* 基因和 pBI121,将目的基因 *CHR1* 插入 pBI121 中,形成 pBI121-CHR1 载体,并对此亚克隆载体进行鉴定。

1.2.3 过表达载体 pCAMBIA3301-CHR1 的构建与鉴定
以载体 pBI121-CHR1 质粒为模板,利用可以同时扩增出 *CaMV35S* 与 *CHR1* 基因的特异性引物(*CaMV35S*+*CHR1*)PCR 扩增出 *CaMV35S*+*CHR1* 基因,用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切 *CaMV35S*+*CHR1* 基因和改造过的 pCAMBIA3301,酶切体系 20 μ L:2 μ L Tango Buffer,7 μ L 模板(*CaMV35S*+*CHR1* 基因和 pCAMBIA3301 回收产物),1 μ L *Eco*R I,2 μ L 的 *Bam*H I,ddH₂O 补足至 20 μ L。在孵育器中 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h。将 *CaMV35S*+*CHR1* 片段完整地插入到 pCAMBIA3301 中,构建含目的基因 *CHR1* 的重组植物表达载体 pCAMBIA3301-CHR1,对此载体进行 PCR 及酶切鉴定。

1.2.4 农杆菌介导的大豆遗传转化及 PCR 检测
(1)农杆菌介导的大豆遗传转化。具体过程参照张云月等^[17]的试验方法进行。

(2)转基因植株的 PCR 检测。利用植物基因组 DNA 提取试剂盒,对转基因植株进行基因组 DNA 提取,使用 *CaMV35S* 启动子特异性引物(*CaMV35S*-PS;*5'*-TAGAGGACCTAACAGAAC-3'、*CaMV35S*-PAS;*5'*-CCGTGTTCTCTCCAAATG-3')进行 PCR 检测。PCR 反应体系:10 $\times$ buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.6 μ L, *CaMV35S*-PS、*CaMV35S*-PAS (10 μ mol/L)各 1 μ L,转基因植株 DNA 1 μ L,阳性质粒 0.8 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

1.2.5 转基因植株的 Southern 杂交检测
对 PCR 检测为阳性的转基因植株和非转基因植株,采用 CTAB 基因组大量提取法提取基因组 DNA,使用 *Bam*H I 限制性内切酶酶切消化基因组,以 *CaMV35S* 启动子来制作探针,按照 Southern 杂交试剂盒中 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书的具体步骤来操作。

1.2.6 转基因植株的荧光定量 PCR 检测
将非转基因植株(CK)和经过 PCR、Southern 杂交检测均为阳性的 T₁ 代转基因植株,利用 Total RNA Extraction Kit 提取试剂盒提取大豆叶片 RNA,然后利用 AU-in-One™ First-Strand cDNA 试剂盒反转录 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 SYBR Premix Ex *Taq* 和特异性 QPCR 引物(QPS;*5'*-TAATAGTGACTGCGTTCT-3'、QPAS;*5'*-CTTCAGCACATCATTCTC-3')对其进行荧光定量 PCR 检测。由于 *CHR1* 为大豆的一种内源基因,因此用相对定量法检测转基因植株中 *CHR1* 的相对表达量^[18]。

2 结果与分析

2.1 大豆 *CHR1* 基因的克隆及鉴定

图 1 显示,部分检测植株(植株 1、2、3、5、6、7)出现了与目的基因 *CHR1* 大小(1 100 bp)相符的条带,将此条带进行琼脂糖凝胶回收,测序。通过 DNAMAN 软件对测序结果与 GenBank 已发表的 *CHR* 基因(X55730.1)进行比对,发现同源性的 71.36%,369—450 和 695—768 碱基处为内含子,将内含子序列去除后二者同源性为 95%。

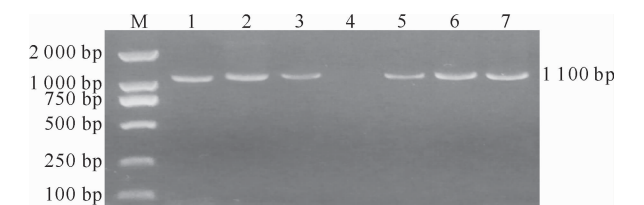


图 1 大豆 *CHR1* 基因的 PCR 检测
M, DNA Marker DL2000;1~7. *CHR1* 基因的 PCR 产物
Fig.1 PCR detection of *CHR1* gene
M, DNA Marker DL2000;1~7. PCR products of *CHR1* gene

对筛选出的克隆载体 pMD18-T-CHR1 进行 PCR 和酶切鉴定,结果见图 2 和图 3。图 2 显示,在 1 100 bp 处出现了与目的基因 *CHR1* 大小相符的条带。图 3 显示,经 *Xba* I、*Sac* I 双酶切,在 1 100 bp 处同样出现了与目的基因 *CHR1* 大小相符的条带。说明克隆载体 pMD18-T-CHR1 构建成功。

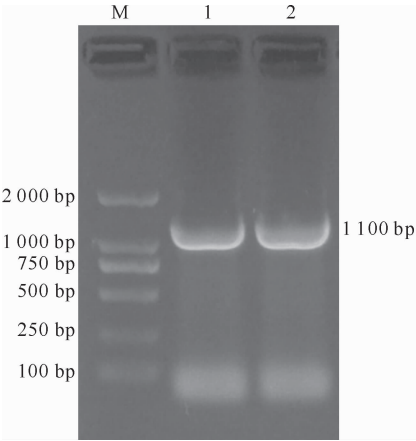


图 2 克隆载体 pMD18-T-CHR1 的 PCR 检测

M. DNA Marker DL2000;

1,2. 克隆载体 pMD18-T-CHR1 的 PCR 产物

Fig. 2 PCR detection of pMD18-T-CHR1 cloning vector

M. DNA Marker DL2000; 1,2. PCR products of pMD18-T-CHR1 cloning vector

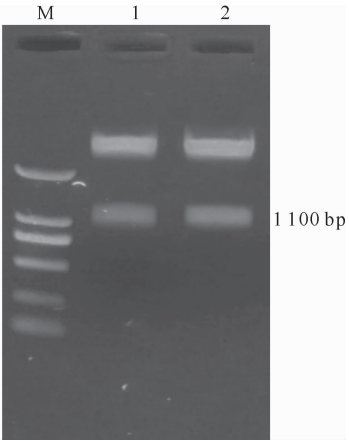


图 3 克隆载体 pMD18-T-CHR1 的双酶切鉴定

M. DNA Marker DL2000; 1,2. 克隆载体

pMD18-T-CHR1 经 *Xba* I、*Sac* I 双酶切的产物

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of pMD18-T-CHR1 cloning vector

M. DNA Marker DL2000; 1,2. Products of pMD18-T-CHR1 cloning vector digested by *Xba* I and *Sac* I

2.2 亚克隆载体 pBI121-CHR1 的构建及鉴定

pBI121-CHR1 载体 PCR 产物中出现了与目的基因 *CHR1* 大小(1 100 bp)相符的条带(图 4);经

Xba I、*Sac* I 双酶切验证,结果(图 5)显示,在 1 100 bp 处出现了与目的基因 *CHR1* 大小相符的条带,说明 pBI121-CHR1 载体构建成功。

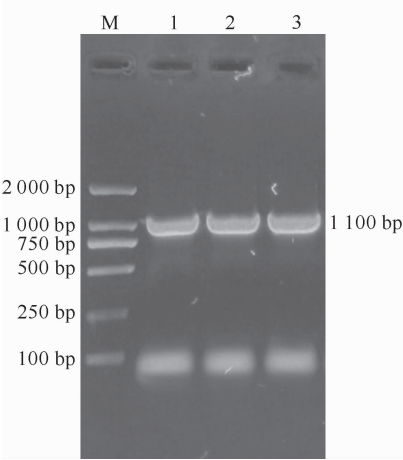


图 4 亚克隆载体 pBI121-CHR1 的 PCR 检测

M. DNA Marker DL2000;

1,2,3. pBI121-CHR1 的 PCR 产物

Fig. 4 PCR detection of pBI121-CHR1 sub-cloning vector

M. DNA Marker DL2000;

1,2,3. PCR products of pBI121-CHR1

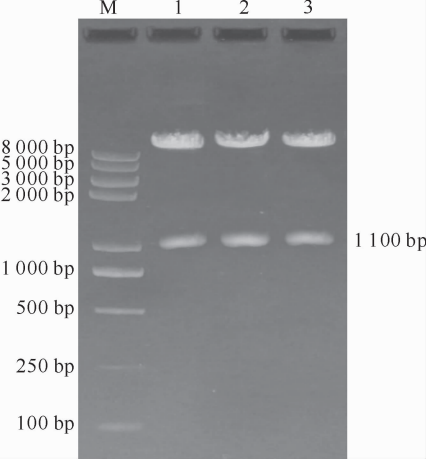


图 5 亚克隆载体 pBI121-CHR1 的双酶切鉴定

M. DNA Marker DL8000; 1,2,3. pBI121-CHR1

经 *Xba* I、*Sac* I 双酶切的产物

Fig. 5 Restriction enzyme analysis of pBI121-CHR1 sub-cloning vector

M. DNA Marker DL8000; 1,2,3. Products of pBI121-CHR1 digested by *Xba* I and *Sac* I

2.3 过表达载体 pCAMBIA3301-CHR1 的构建与鉴定

利用 *CHR1* 特异性引物对过表达载体 pCAMBIA3301-CHR1 进行 PCR 扩增,结果(图 6)显示,在 1 100 bp 处出现了与 *CHR1* 基因大小相符的条

带。经 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切后,在 1 100 bp 处出现了与 *CHR1* 基因大小相符的条带(图 7)。说明 *CHR1* 基因已插入到 pCAMBIA3301 的 *Bam*H I、*Xba* I 酶切位点之间,过表达载体 pCAMBIA3301-CHR1 构建成功。

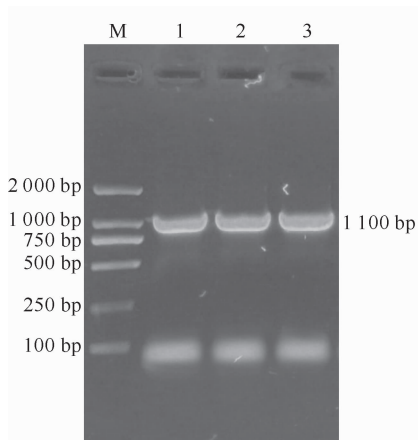


图 6 pCambia3301-CHR1 的 PCR 检测
M. DNA Marker DL2000;
1,2,3. pCambia3301-CHR1 的 PCR 产物
Fig. 6 PCR detection of pCambia3301-CHR1
M. DNA Marker DL2000;
1,2,3. PCR products of pCambia3301-CHR1

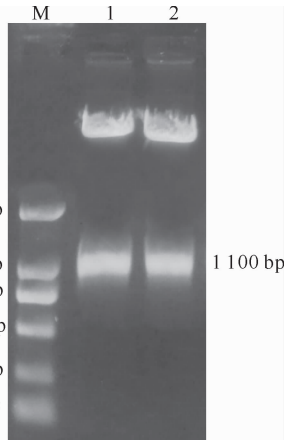


图 7 pCambia3301-CHR1 的双酶切鉴定
M. DNA Marker DL2000;1,2. pCambia3301-CHR1 经 *Bam*H I、*Xba*I 双酶切的产物
Fig. 7 Restriction enzyme analysis of pCambia3301-CHR1
M. DNA Marker DL2000;1,2. Products of pCambia3301-CHR1 digested by *Bam*H I and *Xba*I
培养基筛选后,得到 T₀ 代抗除草剂阳性植株 18 株(图 8)。

2. 4 转基因大豆的遗传转化及 PCR 检测

2. 4. 1 遗传转化 以大豆品种“吉农 28”为受体,进行大豆子叶节的遗传转化。经含除草剂的筛选培

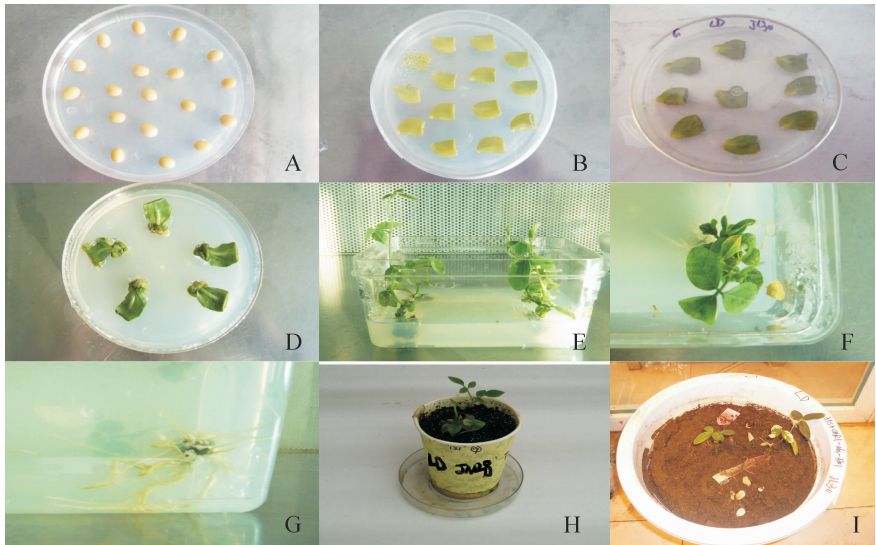


图 8 农杆菌介导大豆子叶节的遗传转化
A. 萌发培养;B. 预分化培养;C. 农杆菌与外植体共培养;D. 筛选培养;E. 伸长培养 ;F~G. 生根培养;H~I. 再生植株
Fig. 8 Transformed soybean cotyledonary node via agrobacterium-mediated method
A. Seed on germination medium;B. Cotyledonary node on pre-culture medium;C. Agrobacterium and explants on co-culture medium;D. Resistant explants on selection medium;E. Badh-resistant shoots on elongation culture medium;
F~G. Badh-resistant plantlets with healthy roots on rooting medium;H~I. Regenerated plants

2. 4. 2 PCR 检测 提取 18 株抗除草剂阳性植株的基因组 DNA,进行 *CaMV*35S 启动子的 PCR 检测,结果(图 9)显示,其中有 2 株转基因植株在 500 bp 处出现了与 *CaMV*35S 启动子大小相符的条带。

最终试验得到 5 株 T₀ 代 PCR 阳性植株,收获这 5 株植株种子进行室内种植,每株收获的种子分别种植 10 株,10 株为 1 行,共 5 行,从每行中随机挑选 7 株进行植株基因组 DNA 的提取,进行 *CaMV*35S 启

动子 PCR 检测,最终得到 T₁ 代 PCR 阳性植株 12 株。图 10 为部分 T₁ 代转基因大豆植株的 *CaMV*35S 启动子 PCR 检测结果。图 10 显示,其中

有 4 株转基因植株在 500 bp 处出现了与 *CaMV*35S 启动子大小相符的条带,而非转基因植株均无此条带。

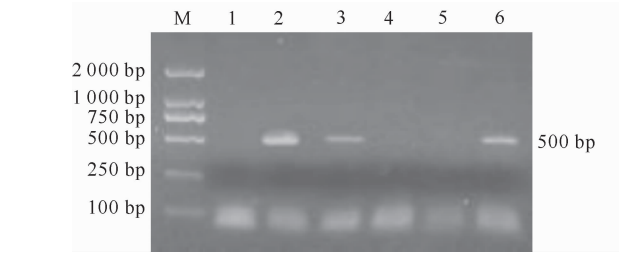


图 9 T₀ 代转基因大豆 *CaMV*35S 启动子的 PCR 检测
M. DNA Marker DL2000;1. 非转基因植株;
2. 阳性对照(过表达载体 pCambia3301-CHR1 质粒);
3~6. 以 pCambia3301-CHR1 为载体的转基因阳性植株
Fig. 9 PCR detection of T₀ generation transgenic plants with *CaMV*35S promoter
M. DNA Marker DL2000;1. Non-transgenic plant;
2. Positive control (plasmid of over-expression vector pCambia3301-CHR1);3-6. Transgenic plants with pCambia3301-CHR1 vector

2.5 转基因大豆的 Southern 杂交检测

由于 *CHR1* 基因是大豆的内源基因,因此对 *CaMV*35S 启动子进行 Southern 杂交检测,结果见图 11。

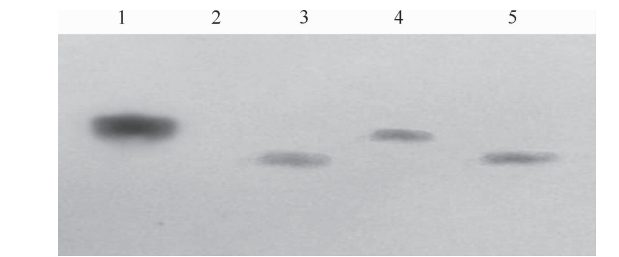


图 11 T₁ 代转基因大豆 *CaMV*35S 启动子的 Southern 杂交检测
1. 阳性对照(过表达载体 pCambia3301-CHR1 质粒);
2. 非转基因植株;3~5. 以 pCambia3301-CHR1 为载体的转基因阳性植株
Fig. 11 Southern blotting detection of T₁ transgenic plants with *CaMV*35S promoter
1. Positive control (plasmid of over-expression vector pCambia3301-CHR1);2. Non-transgenic plant;
3-5. Transgenic plants with pCambia3301-CHR1 vector

图 11 显示,PCR 检测为阳性的转基因植株均出现了单一杂交信号,且不同植株的杂交条带出现位置存在差异,同时阳性对照也有杂交信号出现,而非转基因植株中无杂交信号出现,说明该表达载体的 T-DNA 片段以单拷贝形式整合入了大豆基因组中,但整合位置不同,进一步说明 *CHR1* 基因已随

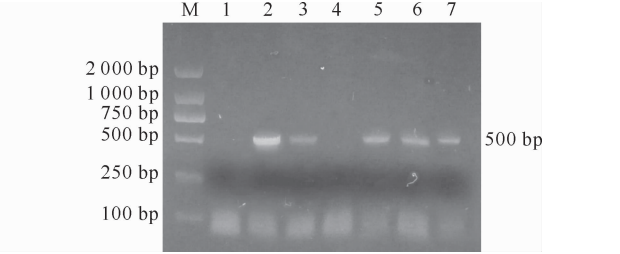


图 10 T₁ 代转基因大豆 *CaMV*35S 启动子的 PCR 检测
M. DNA Marker DL2000;1. 非转基因植株;
2. 阳性对照(过表达载体 pCambia3301-CHR1 质粒);
3~7. 以 pCambia3301-CHR1 为载体的转基因阳性植株
Fig. 10 PCR detection of T₁ generation transgenic plants with *CaMV*35S promoter
M. DNA Marker DL2000;1. Non-transgenic plant;
2. Positive control (plasmid of over-expression vector pCambia3301-CHR1);3-7. Transgenic plants with pCambia3301-CHR1 vector

机整合入大豆基因中。

2.6 转基因大豆的荧光定量 PCR 检测

图 12 显示,*CHR1* 基因在转基因大豆的叶片中成功表达,且转基因植株中 *CHR1* 基因的 mRNA 相对表达量较非转基因植株(CK)都有所提高,但各转基因植株间有所不同,1 号转基因植株的 *CHR1* 相对表达量最高,是 CK 的 38.7 倍;3、5 号转基因植株的 *CHR1* 相对表达量较低,是 CK 的 6~7 倍;2、4、6、7 号转基因植株的相对表达量是 CK 植株的 15~22 倍。

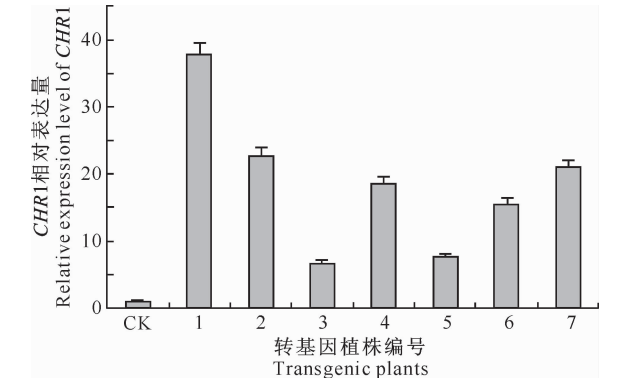


图 12 T₁ 代转基因大豆中 *CHR1* 基因的相对表达量
Fig. 12 Relative expression of *CHR1* gene in T₁ generation transgenic plants

3 结论与讨论

目前关于查尔酮还原酶(CHR)的相关研究报

道还较少,而关于其在大豆中的类型及数量尚无定论,且其是否都与大豆苷元的代谢相关也不清楚。2003 年,Dixon 等^[19]通过对大豆和甘草的 EST 数据库进行分析发现,大豆查尔酮还原酶(CHR)在 2 种植物基因组中是以多基因形式存在的;2005 年,Yu 等^[20]应用电子克隆技术克隆了查尔酮还原酶家族中的 4 个基因;2012 年,刘江^[21]研究发现,将 *GmCHR* 基因导入大豆中后,*GmCHR* 在大豆叶中表达量最高,其次为种子、花和茎,在根中的表达量最低。

本试验克隆了大豆 *CHR1* 基因,并构建了过表达载体 pCAMBIA3301-*CHR1*,通过农杆菌介导法将载体转化入大豆中,获得了 T₁ 代转基因大豆;PCR 检测结果显示,*CHR1* 已导入受体大豆中;Southern 杂交检测结果表明,该表达载体的 T-DNA 区已整合到大豆基因组中,整合位置存在差异,拷贝数是 1;荧光定量 PCR 检测发现,转基因植株的 *CHR1* 基因 mRNA 相对表达量较非转基因植株均有所提高。本试验获得了 *CHR1* 基因表达量高的转基因大豆,但 *CHR1* 基因对大豆苷元含量是否有影响需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 焦 丽. HRM 技术在大豆异黄酮合成关键酶基因 SNP 分型中的研究应用 [D]. 长春:吉林大学,2012.
Jiao L. Application of high resolution melting analysis in SNP genotyping of key enzymes genes in the biosynthesis of soybean isoflavones [D]. Changchun: Jilin University, 2012. (in Chinese)

[2] 崔旭海,李晓东,毕海丹. 大豆异黄酮生理功能的最新研究进展 [J]. 食品研究与开发,2005(4):178-181.
Cui X H, Li X D, Bi H D. Physiological function of soybean isoflavone and the research development [J]. Food Research and Development, 2005(4):178-181. (in Chinese)

[3] 郭小虎,代晓曼,张 波. 大豆异黄酮的生物活性及毒理学研究进展 [J]. 大豆科学,2011,30(4):693-696.
Guo X H, Dai X M, Zhang B. Advances on the study of soybean isoflavones in biological activity and toxicity [J]. Soybean Science, 2011, 30(4):693-696. (in Chinese)

[4] Ishimi Y, Takano Y, Yamauchi J, et al. Study on food labeling and the content of soybean isoflavones in health foods [J]. Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 2009, 67(2):49-57.

[5] Woodhouse B C, Dianov G L. Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery [J]. DNA Repair, 2008, 7:1077-1086.

[6] 曲 嘉,陈伊里,汤 楠,等. 不同光照条件下大豆幼苗和不同外植体获得愈伤组织中大豆苷元及染料木素的含量 [J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2008,26(6):555-566.

Qu J, Chen Y L, Tang N, et al. Content of daidzein and genistein in soybean seedlings under different light condition and callus from different explants [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2008, 26(6):555-566. (in Chinese)

[7] 姜伊娜. 大豆黄酮合成酶基因的克隆与 RNA 干扰调控异黄酮含量的研究 [D]. 上海:上海交通大学,2013.
Jiang Y N. Cloning of soybean (*Glycine max*) flavone synthase gene and RNA interference regulation in isoflavone production [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2013. (in Chinese)

[8] 戎 嵘. 大豆异黄酮通过激活 PPAR γ 抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的作用研究 [D]. 重庆:第三军医大学,2011.
Rong R. Soybean isoflavones inhibit the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells via the activation of PPAR γ [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2011. (in Chinese)

[9] 冉 昇,崔桂友,吴婷婷,等. 8-羟基大豆苷元的生物来源研究进展 [J]. 食品与发酵工业,2012,38(4):141-145.
Ran S, Cui G Y, Wu T T, et al. Biological source of 8-hydroxy daidzein and the research development [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(4):141-145. (in Chinese)

[10] Pedras M S C, Ahiahonu P W K. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi [J]. Phytochemistry, 2005, 66(4):391-411.

[11] Choi E J, Kim G H. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells [J]. Phytomedicine, 2008, 15(9):683-690.

[12] Welle R, Grisebach H. Phytoalexin synthesis in soybean cells: Elicitor induction of reductase involved in biosynthesis of 6'-deoxychalcone [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1989, 272(1):97-102.

[13] Welle R, Schroder J. Expression cloning in *Escherichia coli* and preparative isolation of the reductase coacting with chalcone synthase during the key step in the biosynthesis of soybean phytoalexins [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992, 293(2):377-381.

[14] Goto-Yamamoto N, Wan G H, Masak K, et al. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*) [J]. Plant Science, 2002, 162(6):867-872.

[15] Ayabe S I, Uchiyama H, Toshio A, et al. Plant phenolics: Phenylpropanoids [J]. Comprehensive Natural Products II, 2010, 1(24):929-976.

[16] 马君兰,李 成,魏 颖,等. 异黄酮的生物合成途径及其调控 [J]. 东北农业大学学报,2007,38(5):692-696.
Ma J L, Li C, Wei Y, et al. Biosynthetic pathway and regulation of isoflavone [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(5):692-696. (in Chinese)

[17] 张云月,付永平,王丕武,等. 转 *hrpZpsta* 抗病基因大豆的研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(9):86-92.
Zhang Y Y, Fu Y P, Wang P W, et al. Study on transforming

hrpZpsta gene into soybean [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2011, 39(9): 86-92. (in Chinese)

[18] 庾 蕾, 刘建平, 庄志雄, 等. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST 软件分析与 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法比较 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(10): 956-958.

Yu L, Liu J P, Zhuang Z X, et al. Quantitative analysis of real-time PCR expression production by REST and $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ [J]. Journal of Tropical Medicine, 2007, 7(10): 956-958. (in Chinese)

[19] Dixon R, Sumner L. Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 878-885.

[20] Yu O, Gonigle B M. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis [J]. Advance in Agronomy, 2005, 86: 147-190.

[21] 刘 江. 大豆查尔酮还原酶基因 *GmCHR* 的克隆及农杆菌介导的大豆遗传转化的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

Liu J. Cloning of chalcone reductase gene *GmCHR* and research on agrobacterium-mediated soybean transformation [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2012. (in Chinese)

(上接第 70 页)

[14] 吴丽君, 曾明华, 晏 苒, 等. 阿德味啉血药浓度的测定及其在鸡体内药动学研究 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 125-128.

Wu L J, Zeng M H, Yan R, et al. Determination of the plasma adprin concentrations and studies on its pharmacokinetics in chickens after oral administration [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(5): 125-128. (in Chinese)

[15] Cui H M, Wu F L. Pharmacokinetics of Eb and its hydroxyp-
ropy- β -cyclodextrin inclusion complex in rats [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2010, 19(1): 52-58.

[16] L'Escher W, Hoenack D, Richter A, et al. New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropy- β -cyclodextrin, tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurool-based formulations [J]. Epilepsia, 1995, 36: 255-2611.