

文章编号 :1003-8701(2010)03-0018-03

抑制大豆 *Le1* 基因表达的 RNAi 载体构建

魏益凡,马建,付永平,王丕武*

(吉林农业大学生物技术中心,长春 130118)

摘要: 本研究采用 RT-PCR 克隆大豆子粒 *Le1* 基因核心保守序列 515bp 片段,以植物表达载体 pCAMBIA1301 为基本载体,构建了抑制大豆 *Le1* 基因表达的 RNAi 载体。通过酶切检测及测序,证明表达载体构建正确。本研究为通过 RNAi 技术降低大豆中凝集素含量,改良大豆品质奠定了基础。

关键词: 大豆;大豆凝集素;RNA 干扰

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

Construction of RNAi Vector Inhibit Expression of Soybean *Le1* Gene

WEI Yi-fan, MA Jian, FU Yong-pin, WANG Pi-wu*

(Bio-Technology Center, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The consensus sequence of *Le1* 515 bp in soybean seeds was cloned in this study by RT-PCR. A RNAi expression vector was constructed on the substructure of the plant expression vector pCAMBIA1301, that could inhibition the expression of *Le1* gene. Restriction enzyme analysis and DNA sequencing showed that all the recombinant plasmids were according with our design. This study created the foundation for decreasing the activity of soybean agglutinin and improving the quality of soybeans by RNAi.

Keywords: Soybean; Soybean agglutinin; RNAi

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术通过将双链 RNA(dsRNA)导入细胞后,在 Dicer 酶的作用下产生有活性的小干扰 RNA (siRNA),与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解,引起基因转录后沉默(post transcriptional gene silencing PTGS)^[1-3]。凝集素是大豆主要的营养抑制因子之一,是影响大豆品质的主要因素之一,在成熟的种子中其含量高达蛋白质总量的 10%左右。大量研究证明,大豆凝集素对动物的生长有明显的抑制作用,并且呈剂量依赖性的降低大鼠体增重^[4-5]。本研究应用 RT-PCR 克隆大豆凝集素 *Le1* 基因核心保守序列 515bp 片段,构建了能够干扰大豆凝集素基因(*Le1*)表达的 RNAi 载体,为降低大豆凝

集素含量,改良大豆品质奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

大豆品种吉农 18,大肠杆菌 DH5 α 菌株,质粒 pCAMBIA1301 均由吉林农业大学生物技术中心提供。pMD18-T Simple Vector、Taq DNA Polymerase、dNTPmix、限制性内切酶 *Xba*、*Pst*、*Hind* III、*BstE*、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA Marker、mRNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司,质粒小量纯化试剂盒购自 OMEGA 公司。其它生化试剂北京鼎国公司国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

实验以大豆品种吉农 18 为材料,提取鼓粒 30 d 的大豆种子总 RNA,并将其反转录成 cDNA。总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成,参照 TaKaRa 公

收稿日期:2010-04-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:30971805)

作者简介:魏益凡(1984-),女,硕士研究生,从事大豆分子育种研究。

通讯作者:王丕武 教授,博士生导师 E-mail: peipuw@yahoo.com.cn

司 RNAiso Reagent 试剂盒操作说明进行。

1.2.2 *Le1* 基因片段的获得

依据 GeneBank 中已知大豆凝集素基因序列 (K00821), 设计人工寡核苷酸扩增引物 $P_1: 5'ATC-CACATTTGGGACAGC3'$ 、 $P_2: 5'TGGCAAATTGGAA GAAAA3'$ 。以获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系: 模板 cDNA 0.5 μ L (<1 μ g), 10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, P_1 、 P_2 引物混合液 1.0 μ L (20 μ mol/L), dNTPmix 5.0 μ L (2.5mM), Taq DNA Polymerase 0.2 μ L, ddH₂O 37.8 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52.8 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环。PCR 产物经电泳分离, 回收后与 pMD18-T 载体连接得到克隆载体 pMD18-T-*Le1*、转化大肠杆菌 DH5 α 、挑取单克隆测序。

1.2.3 *Le1* 基因 RNA 干扰片段的获得

以 pMD18-T-*Le1* 为模板 *Le1* 基因 RNA 干扰正义片段引物两端分别添加 *Xba*I 和 *Pst*I 酶切位点, 反义片段引物两端分别添加 *Hind*III 和 *Bst*EII 酶切位点。正义片段引物 $P_3: 5'TTTTCTAGAATCCAC ATTTGGGACAGC3'$ 、 $P_4: 5'TTTCTGCAGTGGCA AATTGGAAGAAA3'$, 反义片段引物 $P_5: 5'TTT GGTGACCATCCACATTTGGGACAGC3'$ 、 $P_6: 5'TTT AAGCTT TGGCAAATTGGAAGAAA3'$ 。正义片段、反义片段 PCR 程序同 1.2.2, PCR 产物经电泳分离, 回收后分别与 pMD18-T 载体连接, 得到克隆载体 pMD18-T-*Le1S* 和 pMD18-T-*Le1AS*, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆测序。

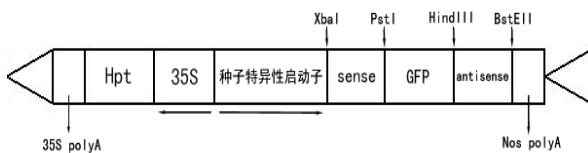


图 1 表达载体 pCSBARI 载体结构

1.2.4 *Le1* 基因 RNA 干扰表达载体的构建

将正义片段克隆载体 pMD18-T-*Le1S* 和已经构建的带有大豆种子特异启动子和以 GFP 基因片段作为功能性间隔序列的大豆子粒特异表达载体 pC-xRi (由本实验室提供) 分别用 *Xba*I 和 *Pst*I 酶切。回收目的片段条带和载体 DNA 片段, 用 T₄DNA 连接酶将载体大片段与正义片段以 1:3 的比例进行连接反应。质粒转化大肠杆菌, 在含卡那霉素 (*Kan*, 100 μ g/mL) 的 LB 固体培养基上培养进行初步筛选, 得重组质粒 pC-xRi-*Le1AS*。酶切反义片段克隆载体 pMD18-T-*Le1AS* 和重组质粒 pC-xRi-*Le1AS*, 回收反义片段条带和载体 DNA

片段, 用 T₄DNA 连接酶将载体大片段与反义片段以 1:3 的比例进行连接反应, 并转化大肠杆菌, 在含卡那霉素 (*Kan*, 100 μ g/mL) 的 LB 固体培养基上培养进行初步筛选, 得到大豆 *Le1* 基因 RNAi 表达载体 pC*Le1*Ri。载体结构如图 1。

2 结果与分析

2.1 *Le1* 基因片段的检测

以获得的 cDNA 为模板, 通过引物 P_1 、 P_2 进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 得到 515bp 大小的扩增条带。结果与预期一致。与 Genebank 中报道的序列相比较, 无碱基差异, 同源性达到 100% (测序由北京三博远志公司完成), 可以肯定克隆到的序列就是大豆 *Le1* 基因片段。结果见图 2。

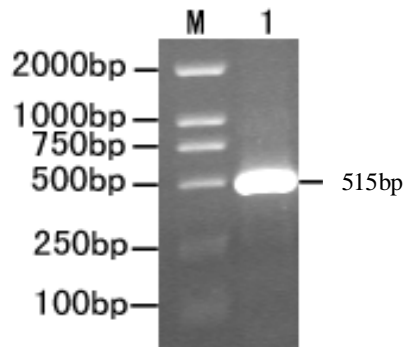


图 2 *Le1* 基因片段的 PCR 检测

M: DNA 分子量标准 (DL2000); 1: *Le1* 基因片段 PCR 产物

2.2 大豆凝集素基因 RNA 干扰片段的检测

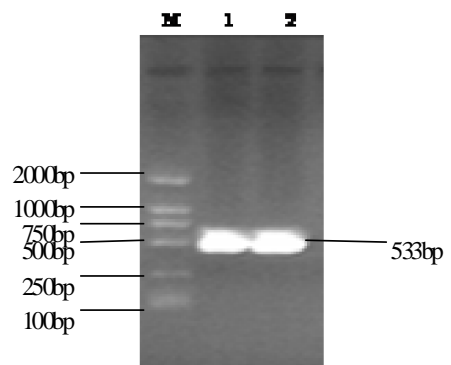


图 3 大豆凝集素基因 RNA 干扰正义、反义片段 PCR 结果
M: DL2000 标准分子量 Marker; 1: 正义片段 PCR 结果; 2: 反义片段 PCR 结果

分别以重组克隆载体 pMD18-T-*Le1S* 和 pMD18-T-*Le1AS* 为模板, 引物 P_3 、 P_4 和 P_5 、 P_6 分别进行 PCR 扩增, 正、反义片段在添加酶切位点和保护碱基后大小为 533 bp, PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 得到与预期大小相符的

533bp 的特异条带,结果见图 3。

2.3 表达载体 pCLe1Ri 的检测

对表达载体 pCLe1Ri 进行酶切检测。以 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切表达载体 pCLe1Ri, 得到 527bp 大小的正义片段条带; 以 *Hind* III 和 *Bst* EII 双酶切表达载体 pCLe1Ri, 得到 527 bp 大小的反义片段条带; 以 *Pst* I 和 *Hind* III 双酶切表达载体 pCLe1Ri, 得到 750bp 大小的内含子片段条带; 以 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切表达载体 pCLe1Ri, 得到 1396bp 大小的启动子片段条带。酶切检测结果显示, 其含有种子特异表达启动子、正义片段、内含子片段和反义片段序列, 符合实验设计要求。酶切检测结果见图 4。

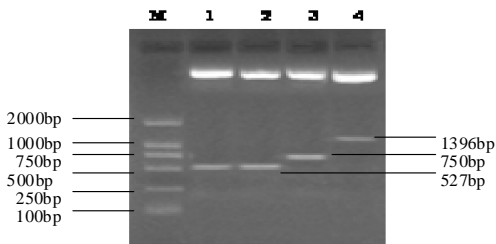


图 4 表达载体 pCSBARi 酶切检测结果

M:DL2000 标准分子量 Marker; 1: 正义片段; 2: 反义片段; 3: GFP 基因片段; 4: 种子特异启动子

3 讨论

大豆凝集素约占大豆总含量的 3%, 是大豆主要营养抑制因子之一, 极大地影响着豆制品的质量。在大豆凝集素的改良中, 人们多采用传统的杂交、回交等方法, 由于受到育种方法和种质资源的限制, 育种时间长, 效果有限。RNA 干扰作用 (RNAi) 是近年来新发现的一种通过 dsRNA 介导的特异性高效抑制基因表达的途径, 其在基因功能研究和生物品质改良中具有广阔应用前景, 越来越受到广大科研工作者的重视^[6-7]。在作物品

质改良中, 如水稻、小麦、玉米中已有一些成功应用 RNA 干扰改良品质的报道^[8-11]。本项研究应用基因工程手段, 克隆了大豆凝集素基因 (*Le1*) 核心保守序列 515bp 片段, 并且构建了在特定器官进行调控大豆凝集素基因的 RNAi 表达载体, 为研究大豆凝集素的基因功能和作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [2] Li J R, Zhao W, Li Q X. RNA Silencing of Waxy Gene Results in Low Levels of Amylose in the Seeds of Transgenic Wheat [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(8): 846-854.
- [3] GUO Zhi-hong, ZHANG Jin-wen, WANG Di, et al. Using RNAi Technology to Produce High-Amylose Potato Plants [J]. *SCIENTIA AGRICULTURA SINICA*, 2008, 41(2): 494-501.
- [4] Zang J. J., Li D. F., Piao X. S., et al. Effects of soybean agglutinin on body composition and organ weights in rats [J]. *Arch Anim Nutr*, 2006a(60): 245-253.
- [5] Li Z. T., Li D. F., Qiao S. Y., et al. Anti-nutritional effects of a moderate dose of soybean agglutinin in the rat [J]. *Arch Anim Nutr*, 2003b(57): 267-277.
- [6] 马建, 刘艺苓, 王丕武, 等. 植物 RNA 干扰的研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(2): 252-259.
- [7] 白描, 杨国顺, 陈石, 等. 植物 RNAi 的特点及其应用研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(8): 6-10.
- [8] 李加瑞, 赵伟, 李全梓, 等. Waxy 基因的 RNA 沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(8): 846-854.
- [9] Kusaba M, Miyahara K, Iida S, et al. Low glutelin con2tent1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice [J]. *Plant Cell*, 2003(15): 1455-1467.
- [10] Pinto Y M, Kok R A, Baulcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes [J]. *Nature Biotechnology*, 1999 (17): 702-707.
- [11] 刘仲齐, 王宁宁, 白艳玲. 利用反义技术和 RNA 干扰技术改良番茄品质特性的研究 [J]. *天津农业科学*, 2006, 12(2): 1-4.

(上接第 8 页)

- [2] 万贤国. 我国植物激光诱变育种的概况 [J]. *激光生物学报*, 1996, 5(3): 865-869.
- [3] 庞伯良, 万贤国. 湘早籼 21 号的选育与激光育种 [J]. *激光生物学报*, 1998, 7(1): 45-46.
- [4] 朱新军, 岳明. 激光对植物的作用及其机理 [J]. *科技情报开发与经济*, 2006(16): 182-184.
- [5] M I Fu shun. Sensitization of HPD to different phases of ra-

dio therapy treatment [J]. *Chinese Journal of Radiation Oncology*, 1990(4): 282 (in Chinese).

- [6] 张俊国, 张三元, 张学臣, 等. 水稻激光育种的研究 I. 种子及减数分裂期幼穗激光处理诱发变异分析 [J]. *吉林农业科学*, 2005, 30(2): 17-20.
- [7] LIU Y. J. Study on the Laser 2induced Hereditary Breeding of Rice [J]. *Applied Laser*, 1991, 11 (2): 88-92.