

研究论文

Research Article

叶酸生物合成途径中调控基因 *folB* 表达载体的构建及在大豆中的转化

张原宇¹ 张玲¹ 王玉民¹ 邢国杰¹ 邢彬² 李海云^{1*}

¹ 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春, 130033; ² 辽河农垦管理区, 四平, 136507

* 通讯作者, hyl512@126.com

摘要 叶酸是一种水溶性 B 族维生素,是维持人体正常活动所必需的营养元素之一,也是植物体内参与一碳单元反应的重要辅酶。*folB* 基因是叶酸调控基因,来源于拟南芥,调控叶酸合成途径中的关键酶 DHNA 的生成。本研究将人工合成的 *folB* 基因转入大豆受体材料 Williams82 中。共侵染 200 个大豆外植体,得到 26 株转化苗。通过对转化苗的草丁膦(浓度 150 mg/L)涂抹鉴定,获得 16 株除草剂抗性转化苗。通过 PCR 检测,得到 12 株 PCR 阳性转化苗。经过 *bar* 试纸条检测,其中 10 株为阳性。Southern 杂交结果表明,9 株转化苗为 Southern 杂交阳性。研究结果表明,外源功能基因 *folB* 和筛选标记基因 *bar* 已经整合到大豆基因组中。相应的转基因后代表现出除草剂抗性和 *folB* 基因 Southern 杂交阳性。本研究通过将 *folB* 基因转入大豆,获得了转基因后代,以此为基础可进一步选育高叶酸含量的转基因大豆品种。

关键词 转基因大豆, 叶酸, *folB*, 农杆菌介导

Construction of the Folate Biosynthetic Pathway Regulatory Gene *folB* and Transformation of Soybean

Zhang Yuanyu¹ Zhang Ling¹ Wang Yumin¹ Xing Guojie¹ Xing Bin² Li Haiyun^{1*}

¹ Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033; ² Liaohe Agricultural reclamation Authority, Siping, 136507

* Corresponding author, hyl512@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.013.002416

Abstract Folate is one of the necessary nutrient elements which is water-soluble B-vitamins supported human body normal activities. Also is an important coenzyme involved in one carbon unit reaction in the plant. The *folB* is a key gene of folate pathway, which regulated production of a key enzyme for DHNA and derived from *Arabidopsis thaliana*. In this study, we expressed the *folB* by employing the soybean cotyledonary nodes method. We co-cultivated about 200 explants, and got 26 transgenic plants. Stock of Basta (150 mg/L) was painted on half the upper surface of tested soybean leaves, and we got 16 transgenic plants. PCR analysis showed that 12 of 14 transgenic plants were positive. Strip analysis show that 10 of 12 transgenic plants were positive. Southern blot analysis of PCR-positive plants indicated the integration of the *folB* gene into the soybean genome, and we also got 9 transgenic lines. Acquired transgenic plants provide the basis for high folate transgenic soybean varieties.

Keywords Transgenic soybean, Folate, *folB*, Agrobacterium-mediated

叶酸(Folate)是一类生化特征相近,化学结构相似的化合物统称,是一种水溶性 B 族维生素,又称维生素 M、维生素 Bc 或蝶酰谷氨酸,由蝶啶、对氨基苯甲酸和 1 个或多个谷氨酸结合而成(图 1) (Hao et al., 1999; 李莎等, 2012)。

叶酸是维持生物体正常生命过程所必需的一类有机物质,是大多数生物体内一碳单元的供体,是参与核酸、氨基酸等生物代谢所必需的元素(汪锦邦等, 2000)。人类和其他动物不能自身合成叶酸(Cossins and Chen, 1997; Rébeillé and Douce, 1999),需要通过

基金项目 本研究由国家 863 高技术研究发展计划(2012AA101106-3)、吉林省 2012 年度博士后科研项目(20120010407)和转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08004)共同资助

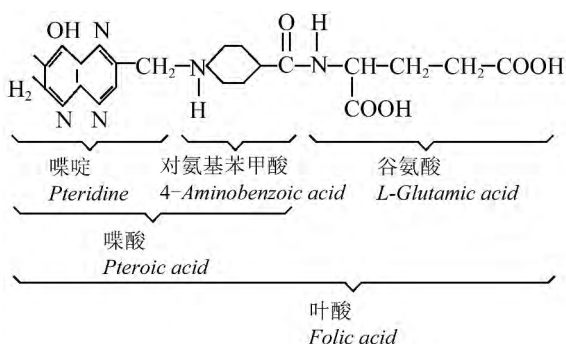


图1 叶酸的化学结构
Figure 1 The structure of folate

植物这种饮食来源来摄取 (de Bree et al., 1997)。成年人每天应摄取至少 200 μg 叶酸，孕妇和乳母为 400 μg 叶酸 (Scott et al., 2000)。人体缺乏叶酸时，会导致贫血、神经系统疾病，心血管病以及癌症等发病率也会显著增加 (Hossain et al., 2004)。叶酸量摄取不足是一个全球化的健康问题 (Bekaert et al., 2007)。发达国家通过在食品中添加人工合成的叶酸来改善人们的叶酸供给水平，但过量地摄入叶酸也会引起一些不良的反应，并间接地促进肿瘤的生长 (Scott et al., 2000)。通过食用蔬菜、豆类等，补充叶酸是十分安全有效的方式。近几十年，随着生物技术的日益发展，广大科研工作者成功将参与叶酸代谢合成的一些基因通过生物技术手段对主要农作物进行叶酸强化育种工作，在当代育种工作中受到广泛关注。

Dihydroneopterin (DHN) 醛缩酶是参与调控叶酸合成的一种酶，这种酶催化 7,8-dihydroneopterin (DHN) 转换为 6-羟甲基-7,8-二氢喋呤酸化酶，由 *folB* 基因在大肠杆菌中编码。*folB* 已经在多种细菌和卡氏肺囊虫中克隆鉴定，在肺炎链球菌中 *folB* 是调控蛋白，具有 DHNA 和二羟甲基二氢喋呤焦磷酸酶的作用。而在卡氏肺囊虫中的 *folB* 为三功能蛋白酶，除具备 DHNA 和二羟甲基二氢喋呤焦磷酸酶功能外，还具有二氢喋呤合酶的活性 (Goyer et al., 2004; Ditttrich et al., 2008)。Goyer 等 (2004) 首先对植物中的 *folB* 蛋白进行了报道。拟南芥中克隆得到 3 个与 *folB* 同源的基因序列，编号为 *AtfolB1-3*。番茄中也得到一种与 *folB* 类似的蛋白 *LefolB*。Goyer 等 (2004) 在大肠杆菌中过表达了 *AtfolB1-3* 和 *LefolB1*，除 *AtfolB3* 没有以活性形式表达外，其他 3 种蛋白都具有 DHNA 活性。

豆类作物，本身叶酸含量较高，但受到储存方式、食品加工方式等客观因素影响，最终提供给人利用的叶酸却很少。本研究采用拟南芥来源的叶酸合成途径调控基因 *folB*，构建在植物表达载体中，并

通过转基因技术将叶酸调控基因 *folB* 整合到大豆基因组中，旨在生产出高叶酸含量的大豆品种，以满足人们对叶酸日益增长的需求。

1 结果与分析

1.1 目的基因的克隆

以人工合成的 *folB* 基因为模板，以 *folB*-FR 为引物，在左右引物中分别引入 *BamH* 和 *Sac* 酶切位点，通过 PCR 扩增得到 *folB* 基因全长 441 bp，然后克隆到 pTF101-35S 载体中 (图 2A)，构建好的质粒经过测序和酶切检测 (图 2B) 正确后转入农杆菌 EHA101 中，用于大豆遗传转化。

1.2 大豆子叶节的遗传转化

将带有基因 *folB* 的表达载体，通过液氮冻融法转化在农杆菌菌株 EHA101 中，通过农杆菌介导的

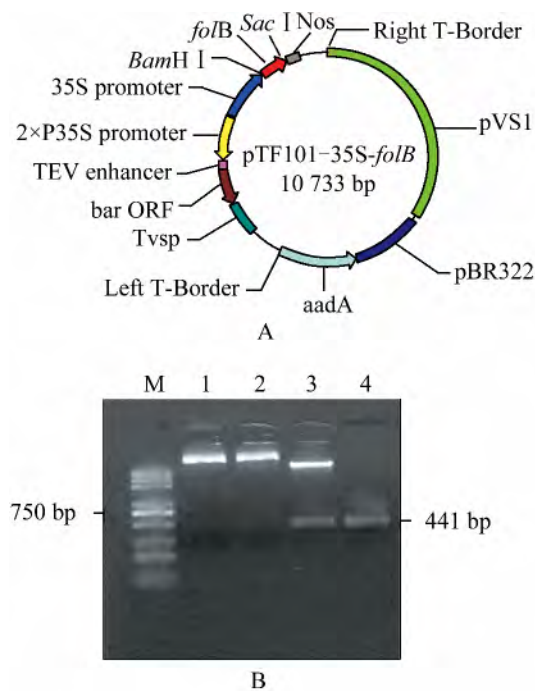


图2 *folB* 基因质粒载体图谱及电泳检测
注: A: pTF101-35S-*folB* 载体图谱; B: 载体酶切电泳检测图; M: Trans2K™ Plus DNA Marker; 1: pTF101-35S 空载体; 2: 未经酶切的 pTF101-35S-*folB* 载体; 3: 经 *BamHI* 和 *SacI* 双酶切的 pTF101-35S-*folB* 载体; 4: *folB* 编码区全长片段

Figure 2 The map of plasmids vector pTF101-35S-*folB* and electrophoresis detection

Note: A: The map of pTF101-35S-*folB*; B: The result of electrophoresis detection; M: Trans2K™ Plus DNA Marker; 1: plasmid pTF101-35S; 2: plasmid pTF101-35S-*folB*; 3: Digested; 4: full-length *folB*

大豆子叶节遗传转化法, 对大豆受体品种 Williams82 进行转化(图 3)。共切取 200 个大豆外植体, 经过继代筛选, 生根成苗, 最终得到 T₀ 代转基因再生植株 26 株, 转化率接近 13%。

1.3 转基因阳性植株筛选鉴定

转化苗通过草丁膦涂抹鉴定得到 15 株表现除草剂抗性的转化苗(图 4), 通过 PCR 检测目的基因 *folB*, 检测出 12 株呈阳性的 T₀ 代转基因植株(图 5)。通过 Southern 杂交方法对得到的 12 株 PCR 呈阳性的转基因植株进行了拷贝数的分析。经过 *bar* 试纸条检测

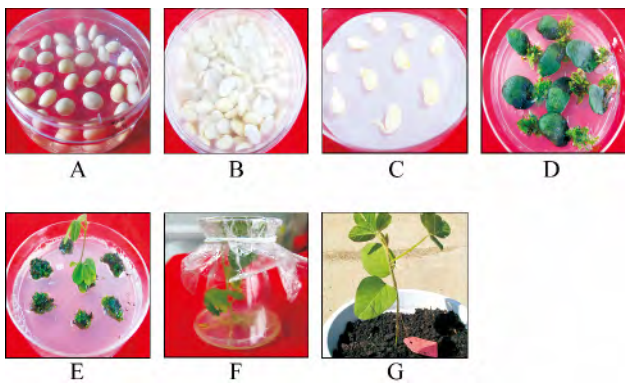


图 3 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法

注: A: 灭菌后的种子放入萌发培养基中发芽; B: 切开的子叶节, 放入工程菌液中侵染; C: 为侵染后的子叶节放入共培养基中培养; D: 子叶节在分化培养基中, 长出丛生苗; E: 丛生苗在伸长培养基中, 伸长成转化苗; F: 将伸长至少 4 cm 的转化苗切下, 在生根培养基中生根; G: 生根的转化苗, 经炼苗后, 移栽温室管理

Figure 3 *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node as explants

Note: A: Sterile seeds germination; B: Explants were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*; C: Explants were inoculated with co-cultivated in co-cultivation medium; D: Explants were embedded into solid shoot induction medium; E: Explants were embedded into shoot elongation medium; F: After shoot elongated to at least 4 cm in length, they placed in rooting medium; G: Rooted shoots were directly transferred to a greenhouse and grown to maturity



图 4 T₀ 代转基因阳性植株的草丁膦抗性分析

Figure 4 BASTA resistance of T₀ transgenic plants

得到 10 株(图 6)试纸条阳性转化苗。Southern 杂交结果表明, 在 10 个转基因植株中得到 9 个株系为 *folB* 全长 cDNA 插入到基因组中(图 7)。经过内切酶 *EcoR* 酶切, 转基因植株 4~12 有杂交带出现, 3 号 13 号没有杂交带出现, 而 3 号为非转基因植株对照。这说明目的基因已经整合到植物基因组中。13 号转基因

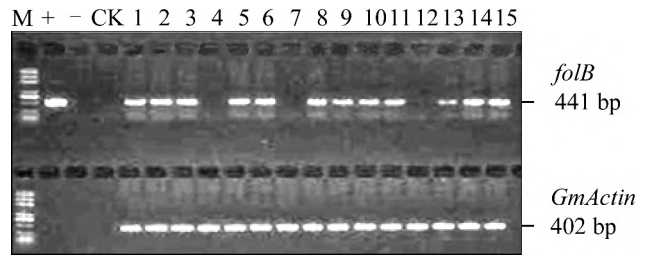


图 5 T₀ 代转化植株的 PCR 法鉴定转基因苗, 上排为目的基因检测结果, 下排为相应单株 DNA 用 *GmActin* 引物检测
 注: M: Trans2K™ Plus DNA Marker; “+”: 质粒阳性对照; “-”: 阴性对照; 1~15: 依次为经过除草剂涂抹法筛选的 T₀ 代转基因材料
 Figure 5 PCR analysis of the T₀ transgenic plants, one is for *folB*, and the other is *GmActin*

Note: M: Trans2K™ Plus DNA Marker; “+”: Plasmid; “-”: The negative control; 1~15: The transgenic plants from T₀ lines after BASTA test

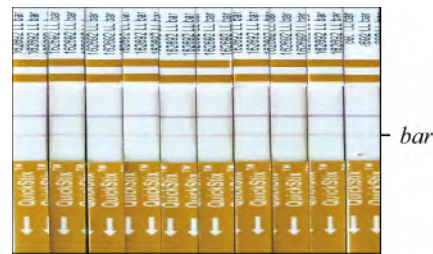


图 6 *bar* 基因试纸条检测

Figure 6 Strip the identification of the *bar* gene

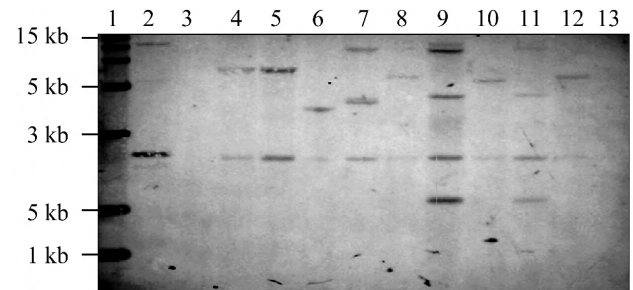


图 7 转基因 T₀ 植株的 Southern blot 杂交, *EcoR* 酶切

注: 1: Marker Trans 15 K; 2: 质粒 DNA; 3: 阴性对照; 4~13: 经过 PCR 检测的转基因植株

Figure 7 Southern blot analysis of T₀ transgenic plants, digested by *EcoR*

Note: 1: Marker Trans 15 K; 2: Plasmid; 3: The negative control; 4~13: Transgenic plants from T₀ after PCR

植株在图4中没有条带,说明是假阳性,目的基因并没有真正地整合到植物基因组中。杂交带大小有所不同,说明外源基因整合位点不同。

2 讨论

随着转基因技术的发展,转基因辅助育种成为现代育种工程重要手段之一。大豆子叶节遗传转化法是比较快捷的,从切子叶节到得到阳性苗,仅需4个月左右的时间就能完成。但转化苗存在一定数量的嵌合体和高拷贝数,这一点对日后的育种工作不利。转化苗的阳性率和外源基因的整合性与转化过程中所用的表达载体,受体基因型,农杆菌毒性等因素有关。Olhoft等(2004)研究表明培养基中适当添加银离子可以增加外源基因的插入效率和获得更多的单拷贝植株。本研究的生苗率接近13%,阳性率为4.5%,阳性率较低,因此如何提高大豆转基因阳性率和单拷贝数量,是有待解决的问题。

提高植物体内叶酸的含量主要有三种方式:第一种是通过合成途径的限速酶来改造合成途径;第二种是减少叶酸的分解;第三种是提高叶酸的稳定性。三种方式可以共同协作,也可单独加强。当叶酸与其依赖蛋白结合时,稳定性大大提高。因此过量表达叶酸依赖蛋白或调控蛋白,有可能提高叶酸的含量。在本研究中我们已将高叶酸 $folB$ 调控基因成功导入到大豆受体材料中,并且获得了southern杂交阳性的转基因株系,但对叶酸含量还未进行测定。在后期工作中将对初世代材料加代繁殖,测定材料中的不同组织内的叶酸含量。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 受体材料

受体材料为大豆品种Williams82,由农业生物技术研究所转基因大豆课题组提供。

3.1.2 菌种和质粒

大肠杆菌菌株为*E. coli* Trans10,农杆菌菌株为EHA101,植物表达载体pTF101-35S,高叶酸调控基因 $folB$ 均由农业生物技术研究所大豆课题提供。

3.1.3 生物试剂

聚合酶2×Easy Tag PCR SuperMix购自北京全式金公司;限制性内切酶、 T_4 -DNA连接酶等生物酶试剂购自NEB试剂公司,胶回收DNA小片段试剂盒购

自爱思进试剂生物公司,Southern杂交试剂盒购自罗氏试剂公司,其他生化试剂均为国产分析纯产品。

3.2 方法

3.2.1 植物表达载体的构建

根据NCBI上大肠杆菌 $folB$ 基因(基因编号:BT030075)序列,按照密码子偏爱性,人工合成 $folB$ 基因。在 $folB$ 基因上游引入内切酶BamH酶切位点,下游引入内切酶Sac酶切位点。通过DNA胶回收试剂盒回收PCR产物,把 $folB$ 基因片段经BamH和Sac酶切后连接在pTF101-35S载体上形成pTF101-35S- $folB$ 。同时针对 $folB$ 基因,利用Primer Premier 5.0软件设计PCR分子检测扩增特异性引物如下: $folB$ -F 5'-TAGAAACAGAGGATCCATGCATAGCTCACTGGAGACCAC-3', $folB$ -R 5'-GATCGGGGAAATTCGAGCTCTCAGTTCTTTGAACTAGTGTTCGC-3'。

3.2.2 农杆菌介导的大豆遗传转化

以农杆菌株EHA101作为工程菌株,将pTF101-35S- $folB$ 通过大豆子叶节方法转入大豆受体材料Williams82中。农杆菌介导大豆子叶节转化法基本流程如下:(1)菌液制备:农杆菌28℃培养16h后收集单克隆菌体,转入YEP液体培养基中,放入摇床28℃,180rpm培养12h左右至菌液OD₆₀₀值0.5~0.7备用。(2)受体准备:选取大豆受体品种Williams82成熟无破损的种子,氯气灭菌16h。灭菌后种子放入萌发培养基(Olhoft et al., 2003)弱光萌发16h。(3)子叶节法:切子叶节,从胚轴处将大豆种子一分为二,切时刀尖蘸工程菌液,用手术刀轻刮下胚轴,制造小创口。将切开后的子叶节放入工程菌液中,轻柔晃动30min后转入共培养基中,避光培养(23℃, 3~5d)。(4)共培养后,将伸长的胚轴切去约3/4,保留约5mm的胚轴,插入加筛选剂的分生培养基中,诱导丛生芽生长,培养条件25℃,光照16h·d⁻¹,光照强度2000lx。(5)在分生培养基中培养7d后,转入筛选培养基中,间隔15d继代1次,筛选3~4轮,得到伸长生长的分生苗。(6)将已经伸长的分生苗从外置体上切下,转入生根培养基中生根,生根10d左右,得到转化苗。(7)生根健全的转化苗,经炼苗(3~5d)后移入盆中栽培,温室正常管理。

3.2.3 转基因植株的草丁膦抗性检测

植物表达载体以 bar (草丁膦)作为筛选标记,因此在转基因后代中可采用草丁膦涂抹叶片的方法快速检测转基因苗。具体方法:选取健康叶片,用棉签蘸取适

量草丁膦(浓度为 150 mg/L)溶液,轻柔涂抹转化苗半片叶子,并做好标记,同叶未涂抹的叶子作为对照,在自然光照情况下 3~6 d 后观察叶片生长和变色情况。

3.2.4 转基因植株 T_0 代的 PCR 检测

利用 *folB* 基因引物对 T_0 代转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 检测。使用 CTAB 法提取 T_0 代转化植株及对照 Willimas82 的 DNA。PCR 反应体系(25 μ L): DNA 模板 100 ng, 2 \times Easy Tag PCR SuperMix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, 加 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 并拍照和分析。

3.2.5 *bar* 试纸条检测

取少量嫩绿叶子(约小指甲大小)放入 1.5 mL 的离心管中,加入 200 μ L 提取缓冲液,用研磨棒捣碎混匀,将试纸条按箭头方向插入混合液中,静止 5 min 后观察结果。若试纸条出现 2 条带表明该植株是 *bar* 阳性植株,若出现 1 条带说明是 *bar* 阴性植株,如果没有条带说明操作有误或提取缓冲液不对。

3.2.6 T_0 代植株的 Southern 分析

为了检测 *folB* 全长基因是否插入到大豆基因组全长中及相对应的拷贝数,选取 *bar* 试纸条检测呈阳性的 10 个 T_0 代植株,进行基因组 DNA 的 Southern blot 分析。Southern blot 分析使用的是 Roche 地高辛试剂盒 Kit 型,实验具体流程参照 Roche Southern blot Kit 型试剂盒说明书。以克隆到载体上的 *folB* 基因的全长作为 Southern 杂交探针,使用 *EcoR* 内切酶进行基因组 DNA 酶切。

作者贡献

张原宇和张玲是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成论文初稿的写作;汪玉民和邢国杰参与实验设计及论文修改;邢彬参与材料种植和数据整理;李海云是项目的构思及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101106-3)、吉林省 2012 年度博士后科研项目(20120010407)和转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08004)共同资助。

参考文献

- Bekaert S., Storozhenko S., and Mehrshahi P., 2007, Folate biofortification in food plants, *Trend in Plant Science*, 13: 1360-1385
- Cossins E.A., and Chen L., 1997, Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi, *Phytochemistry*, 45: 437-452
- de Bree A., van Dusseldorp M., and Brouwer I.A., 1997, Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake, *Eur J., Clin Nutr.*, 51: 643-660
- Dittrich S., Mitchell L., and Blagborough A.M., 2008, An atypical orthologue of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase can provide the missing link in the folate biosynthesis pathway of malaria parasites, *Mol. Microbiol.*, 67(3): 609-618
- Goyer A., Illarionova V., and Roje S., 2004, Folate biosynthesis in higher plants cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases, *Plant Physiol.*, 135: 103-111
- Hossain T., Rosenberg I., and Selhub J., 2004, Enhancement of folates in plants through metabolic engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 5158-5163
- Hao L., Tang Y., and Li Z., 1999, Research progress of folate detection method, *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi (Chinese Journal of Preventive Medicine)*, 33(3): 177-179 (郝玲, 唐仪, 李竹, 1999, 叶酸检测方法研究进展, *中华预防医学杂志*, 33(3): 177-179)
- Li S., Jiang L., Wang C.Y., and Zhang C.Y., 2012, Research advances in the functions of plant folates, *Zhiwu Xuebao (Chinese of Bulletin Botany)*, 47(5): 525-533 (李莎, 姜凌, 王崇英, 张春义, 2012, 叶酸在植物体内功能的研究进展, *植物学报*, 47(5): 525-533)
- Olhofs P.M., Flangel L.E., and Donovan C.M., 2003, Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method, *Planta*, 216(5): 723-735
- Olhofs P.M., Flangel L.E., and Somers D.A., 2004, T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method, *Plant Biotechnol.*, 2: 289-300
- Rébeillé F., and Douce R., 1999, Folate synthesis and compartmentation in higher plants, In: Kruger N.J., Hill S.A., and Ratcliffe R.G. (eds), *Regulation of Primary Metabolic Pathways in Plants*, Kluwer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 42: 53-99
- Scott J., Rébeillé F., and Fletcher J., 2000, Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 795-824
- Wang J.B., Gu P., Zhang D.H., and Li D., 2000, The research progress in analysis methods of folate, *Zhongguo Shipin Tianjiaji (China Food Additives)*, (3): 49-54 (汪锦邦, 顾鹏, 章德宏, 李东, 2000, 叶酸分析方法的研究进展, *中国食品添加剂*, (3): 49-54)