

# 高蛋氨酸转基因大豆的鉴定和遗传稳定性分析

韩庆梅<sup>1,2</sup>, 孙石<sup>2§</sup>, 侯文胜<sup>2</sup>, 吴存祥<sup>2</sup>, 白肖飞<sup>2</sup>, 于洋<sup>2</sup>, 周艳峰<sup>2</sup>, 韩天富<sup>1,2\*</sup>

(1. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨, 150030;

2. 中国农业科学院作物科学研究所, 农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京, 100081)

**摘要:** 为通过基因工程改善植物蛋白氨基酸组成, 在获得种子特异性表达拟南芥蛋氨酸合成途径关键基因 *AtD-CGS* 转基因大豆的基础上, 通过自交繁殖和性状鉴定, 筛选出纯合转基因株系中作 CGS-ZG11, 并利用该株系与普通大豆品种石豆 5 号杂交, 选育出中作 CGS14J890 等含有 *AtD-CGS* 基因、综合性状优良的大豆新品系。本研究通过 PCR 和 Southern blot 检测, 证明目的基因 *AtD-CGS* 整合到中作 CGS-ZG11 基因组, 以单拷贝形式存在。RT-PCR、Western blot 结果显示, *AtD-CGS* 在转录和翻译水平上稳定表达。高效液相色谱测定结果表明, 中作 CGS-ZG11 籽粒蛋氨酸含量显著高于野生型, 且含量在 T<sub>6</sub>、T<sub>7</sub> 和 T<sub>8</sub> 连续 3 代相对稳定。大豆新品系中作 CGS14J890 等蛋氨酸含量高、综合性状好, 证明 *AtD-CGS* 基因可在不同的遗传背景下稳定遗传与表达。

**关键词:** 大豆; *AtD-CGS* 基因; 蛋氨酸; 遗传稳定性; 杂交转育

**中图分类号:** S565.103 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2015)06-0789-08

## Identification and genetic stability analysis of transgenic soybean with enhanced level of methionine

HAN Qing-mei<sup>1,2</sup>, SUN Shi<sup>2§</sup>, HOU Wen-sheng<sup>2</sup>, WU Cun-xiang<sup>2</sup>,

BAI Xiao-fei<sup>2</sup>, YU Yang<sup>2</sup>, ZHOU Yan-feng<sup>2</sup>, HAN Tian-fu<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. MOA Key Laboratory of Soybean Biology (Beijing), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Soybean is one of the most important sources of plant protein, but the content of methionine (Met) in soybean protein is inadequate, which limits its value. Recent researches showed that improving the plant protein and amino acids composition of the plant protein via bio-technology method is a promising strategy. In the previous study, we transformed *AtD-CGS* (which is a key gene in Met biosynthesis and is expressed specifically in seeds) into soybean. A homozygous *AtD-CGS* transgenic soybean line, Zhongzuo CGS-ZG11, has been obtained by self-fertilization and phenotypic identification through many generations. Zhongzuo CGS-ZG11 was crossed with a conventional soybean variety of Shidou 5 which has good comprehensive characteristics, and generated progeny lines, such as Zhongzuo CGS14J890. The PCR and Southern blot confirmed that *AtD-CGS* gene was inherited from T<sub>6</sub> to T<sub>8</sub> generations of Zhongzuo CGS-ZG11. The RT-PCR and Western blot showed the expression of *AtD-CGS* was stable in Zhongzuo CGS-ZG11. The Met content in different generations of Zhongzuo CGS-ZG11 was investigated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Compared to the wild-type seeds, the content of total Met in the transgenic soybean seeds increased remarkably, and remained consistently high through generations. The high methionine content in Zhongzuo CGS14J890 further proved that *AtD-CGS* could function consistently among different genetic background and generations.

**Key words:** Soybean; *AtD-CGS* gene; Methionine; Genetic stability; Hybridization transfer

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大科技专项(2015ZX08011-003); 农业部财政部现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04); 中国农业科学院科技创新工程

作者简介: 韩庆梅(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆分子育种研究, E-mail: hanqingmei2012@163.com

§ 孙石为共同第一作者

\* 通讯作者: 韩天富(1963-), 男, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究, E-mail: hantianfu@caas.cn

蛋氨酸(Methionine, Met)又称甲硫氨酸,是人和动物不能自身合成的必需氨基酸之一,参与许多重要的生命活动过程<sup>[1]</sup>。蛋氨酸缺乏可导致人体抵抗力下降、血红蛋白含量降低,同时会影响儿童精神与身体状况<sup>[2]</sup>。动物饲料中蛋氨酸的缺乏会限制动物的生长发育,影响产品的质量与产量<sup>[3,4]</sup>。因此,蛋氨酸在人类和动物营养中占有重要地位。大豆是蛋白质含量最高的油料作物,也是动物和人类所需植物蛋白的主要来源之一。然而,大豆蛋白的氨基酸组分不平衡,含硫氨基酸尤其是蛋氨酸含量偏低,限制其利用价值的提高<sup>[5]</sup>。因此,提高大豆中蛋氨酸含量,对于改善其营养价值具有重要意义。

近年来,采用基因工程方法提高作物蛋氨酸含量,在许多作物中已取得成功。Lee等<sup>[6]</sup>将芝麻中的2S清蛋白基因转入水稻,使稻米中粗蛋白含量增加0.64%~3.54%,蛋氨酸提高29%~76%,半胱氨酸提高31%~75%。Dinkins等<sup>[7]</sup>将15kDa玉米醇溶蛋白基因导入大豆,大豆籽粒中蛋氨酸和半胱氨酸含量分别提高12%~20%和15%~35%,其他氨基酸含量没有明显变化。Hacham等<sup>[8]</sup>发现通过天冬氨酸激酶(AK)的表达,可提高烟草叶片中蛋氨酸及苏氨酸的合成量,游离蛋氨酸的含量可通过突变型AK与胱硫醚- $\gamma$ -合成酶基因(CGS, Cystathionine  $\gamma$ -synthase)的联合表达而得到显著提高。Amira等<sup>[9]</sup>将拟南芥的CGS基因导入苜蓿,使游离蛋氨酸含量明显增加。Avraham等<sup>[10]</sup>将拟南芥的CGS转入到苜蓿,使转基因苜蓿叶片中的蛋氨酸含量显著提高,且半胱氨酸含量也随之增加。Hacham等<sup>[8]</sup>在烟草叶片中分别表达氮端缺失的胱硫醚- $\gamma$ -合成酶基因(*AtD-CGS*)和全长胱硫醚- $\gamma$ -合成酶基因(*AtF-CGS*),发现这两种转基因烟草叶片中游离蛋氨酸含量都显著提高,而转*AtD-CGS*基因的植株中游离蛋氨酸表达水平更高。本实验室Song等<sup>[11]</sup>通过农杆菌介导法获得*AtD-CGS*转基因大豆,籽粒中蛋氨酸的含量显著提高,其中,未成熟种子游离蛋氨酸含量提高3.8~7.0倍,成熟种子总蛋氨酸含量提高1.8~2.3倍。

植物基因工程成功的关键之一是外源基因在转化体中可稳定遗传和表达。在转基因植物繁育过程中,外源基因可能会发生丢失、沉默等问题。Budar等<sup>[12]</sup>将T-DNA插入到烟草中,得到转基因植株,在T<sub>3</sub>转基因材料中抗潮霉素植株的百分比是38.7%~56.9%,与根据3:1分离比预测的比例(75%)有明显差异,说明在繁殖过程中存在外源基因丢失或沉默现象。Li等<sup>[13]</sup>以转 $\beta$ -葡糖醛酸酶

基因(*uidA*)烟草植株为材料,通过定量检测和Southern blot等方法分析目的基因的表达活性,发现在20株Southern blot阳性的转基因烟草中有6株无GUS活性。Northern blot证明,外源基因*uidA*的沉默发生在转录水平上。只有外源基因稳定遗传且高效表达的材料才具有利用价值。

自1988年Hinchee等<sup>[14]</sup>获得第一株转基因大豆以来,大豆遗传转化技术取得了很大进展,但作为公认的几种转化困难的作物之一,大豆的遗传转化效率仍偏低。在培育转基因大豆品种时,通常将获得的转基因株系与常规品种进行杂交转育,选育出综合性状优良、目的性状突出的材料<sup>[15]</sup>。Oard等<sup>[16]</sup>对抗草甘膦转基因水稻与常规水稻的杂交后代进行农艺性状与遗传稳定性研究发现基因沉默造成*bar*基因异常的遗传行为。Kubo<sup>[17]</sup>等将转编码抗草甘膦抗性相关酶CP4-EPSPS(5-烯醇丙酮酰-莽草酸-3-磷酸合酶)大豆与常规大豆品种进行杂交转育,发现在杂交后代中CP4-EPSPS基因能够稳定遗传并表达形成有功能的蛋白,而且杂交后代的农艺性状未受影响。因此,有必要对外源基因在不同遗传背景下的遗传稳定性和表达水平进行验证。

本研究对Song等<sup>[11]</sup>已经获得的转*AtD-CGS*高蛋氨酸转基因大豆株系中作CGS-ZG11的T<sub>6</sub>、T<sub>7</sub>和T<sub>8</sub>进行检测,从基因水平、转录水平、翻译水平和目标性状表达等方面,分析目的基因转入大豆后的遗传稳定性。同时,将中作CGS-ZG11与综合性状优良的大豆品种石豆5号进行杂交,对杂交后代进行分子检测、目标性状分析和农艺性状鉴定,创制蛋氨酸含量高、综合性状优良的大豆新材料,为培育转基因优质大豆新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

转*AtD-CGS*基因大豆(*Glycine max*(L) Merr.)株系中作CGS-ZG11的T<sub>6</sub>、T<sub>7</sub>、T<sub>8</sub>和受体品种自贡冬豆,以转基因株系中作CGS-ZG11为父本、常规大豆品种石豆5号为母本杂交选育的F<sub>10</sub>株系,以及国家黄淮海夏大豆北组区域试验对照品种冀豆12。将以上材料于2014年6月14日在北京种植,每个材料种植4行,行长5m,行距80cm,株距45cm。为保证成熟,对中作CGS-ZG11的T<sub>6</sub>、T<sub>7</sub>、T<sub>8</sub>以及受体品种自贡冬豆出苗后进行12h短日照处理,其它材料不进行人工光照处理。上述材料均由中国农业科学院作物科学研究所国家大豆产业技术研发中心

提供。材料种植和管理严格遵守《中华人民共和国农业行业标准 NY/T 719.1 - 719.3 - 2003 转基因大豆环境安全检测技术规范》进行。

## 1.2 除草剂抗性鉴定

在转基因中作 CGS - ZG11 以及中作 CGS - ZG11 与石豆 5 号杂交组合各个世代植株生长至 V<sub>3</sub> 期(第二复叶展开时)时<sup>[18]</sup>, 用 160mg/L 浓度的草胺膦均匀涂抹在大豆叶片上, 7d 后观察叶面反应。

## 1.3 PCR 鉴定

对中作 CGS - ZG11 的 T<sub>6</sub> ~ T<sub>8</sub>, 以及中作 CGS - ZG11 与石豆 5 号的杂交后代进行 PCR 鉴定。采用改良 CTAB 方法<sup>[19]</sup> 提取大豆叶片基因组 DNA, 利用 Primer 5.0 设计 PCR 检测引物对。

DBTN F: AGCAATGCTGGAAGAGTAAA

DBTN R: GAGTGTGAGTTTCGAGTATGG

PCR 反应体系(20μL): 模板 DNA 1.0μL, 10 × Buffer 2.0μL, dNTP(10 mmol/L) 2.0μL, DBTN - F 和 DBTN - R(10μmol/L) 各 1μL, DNA 聚合酶(5U/μL) 0.2μL, 无菌 ddH<sub>2</sub>O 13.8μL。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 56℃ 复性 45s, 72℃ 延伸 30s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 用紫外凝胶成像系统拍照。

## 1.4 半定量 PCR 检测

用 Trizol 试剂盒提取中作 CGS - ZG11 T<sub>6</sub> ~ T<sub>8</sub> 植株各组织 RNA。以总 RNA 为模板, 按 TransGene(北京全式金生物技术有限公司) 反转录试剂盒说明书所述步骤合成第一链 cDNA, 引物组合为 DBTN - F 和 DBTN - R, PCR 程序为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 58℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 30s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。以 CYP2 为内参基因。通过调整模板浓度, 使各时期材料中 CYP2 的 PCR 扩增产物量一致。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.5 Southern blot 检测

用 CTAB 法<sup>[19]</sup> 提取转基因大豆中作 CGS - ZG11 T<sub>8</sub> 植株的 DNA, 用 Xba I、Dra I 和 Hind III 分别进行酶切, 然后进行纯化和凝胶电泳。采用 TurboBlotter kit(Whatman) 转移 DNA 至尼龙膜(Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup>), 将尼龙膜放在紫外灯下进行紫外交联, 然后放入杂交炉进行预杂交和杂交, 最后根据 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Stater Kit II 试剂盒(德国 Roche 公司) 说明书进行尼龙膜洗液和检测。制备 DNA 探针时, 以质粒 pG-PTV - BAR - DCGS(由以色列 MIGAL Galilee 技术中心 Rachel Amir 博士惠赠) 为模板, 利用 DIG DNA

PCR 标记试剂盒(MyLab 地高辛杂交检测系列) 进行合成。

## 1.6 Western blot 检测

转基因大豆中作 CGS - ZG11 的籽粒经液氮速冻充分研磨后, 加入提取缓冲液(10mmol/L Tris - HCl, 50mmol/L EDTA, 300mmol/L 蔗糖, 100mmol/L PMSF) 提取总蛋白; 取上清液 15μL 进行 12.5% SDS - PAGE 电泳分离; 采用 Bio - Rad 公司生产的 MINI - BLOT 电转仪将蛋白质转至 PVDF 膜(GE) 上, 进行 Western blot 检测<sup>[20]</sup>, 一抗为 AtD - CGS 抗血清(1: 1000), 二抗为碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白(AP - A, 0.5mg/mL, Sigma)。用含有 NBT(330μg/mL) 和 BCIP(165μg/mL) 底物的缓冲液(100mmol/L Tris - HCl pH 9.5, 100mmol/L NaCl) 显色。

## 1.7 氨基酸含量测定

将大豆籽粒粉碎后, 进行盐酸水解处理, 用高效液相色谱仪(Agilent 1100) 进行氨基酸含量测定。用近红外光谱分析仪(Bruker, MATRIX - 1) 测定粗蛋白及粗脂肪含量。

## 1.8 杂交后代农艺性状调查

大豆成熟、收获后, 对中作 CGS - ZG11 和石豆 5 号杂交组合的 F<sub>10</sub> 材料进行取样, 调查主要农艺性状, 并收获计产。

# 2 结果与分析

## 2.1 转基因大豆株系中作 CGS - ZG11 的鉴定和遗传稳定性分析

2.1.1 除草剂抗性鉴定结果 大豆遗传转化过程中采用 *bar* 基因作为筛选标记, 可通过草胺膦涂抹鉴定阳性转基因植株。对转 AtD - CGS 基因大豆中作 CGS - ZG11 的 T<sub>6</sub>、T<sub>7</sub>、T<sub>8</sub> 代和自贡冬豆进行草胺膦涂抹, 发现自贡冬豆植株叶片出现褐色斑点, 茎生长点也受到抑制, 显现轻微枯萎状。转基因植株则无明显变化(图 1)。



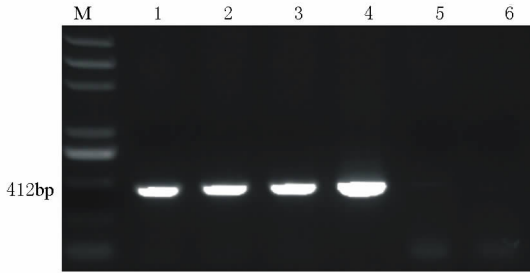
野生型植株 Wild type plants 转基因植株 Transgenic plants

图 1 转 AtD - CGS 大豆中作

CGS - ZG11 的草胺膦抗性

Fig. 1 Glyphosate resistance of AtD - CGS transgenic soybean Zhongzuo CGS - ZG11

2.1.2 PCR 和 Southern blot 检测结果 提取中作 CGS-ZG11 的  $T_6 \sim T_8$  的基因组 DNA 进行 PCR 检测,从图 2 可以看出,连续 3 代转基因植株均可扩增出 412bp 的 DNA 片段,非转化植株则没有扩增出任何条带,表明外源基因 *AtD-CGS* 整合到转基因大豆中作 CGS-ZG11 中并稳定遗传。为进一步确定外源基因的整合情况,对转化事件  $T_8$  植株进行 Southern blot 检测,发现转基因植株的酶切产物均出现单个条带(图 3),说明外源基因 *AtD-CGS* 以单拷贝形式整合到大豆基因组中。

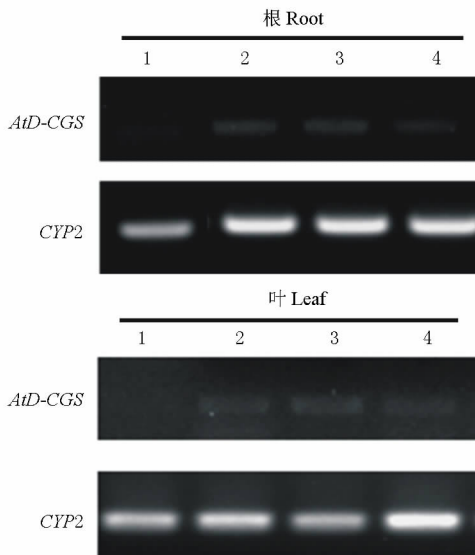


注: M: DL2000 Marker; 1: 中作 CGS-ZG11  $T_6$  植株;  
2: 中作 CGS-ZG11  $T_7$  植株; 3: 中作 CGS-ZG11  $T_8$  植株;  
4: 质粒阳性对照; 5: 自贡冬豆; 6: 空白对照

Note: M: DL2000 Marker; 1:  $T_6$  generation plants of transgenic soybean;  
2:  $T_7$  generation plants of transgenic soybean;  
3:  $T_8$  generation plants of transgenic soybean;  
4: Plasmid control; 5: Zigongdongdou; 6: Blank control

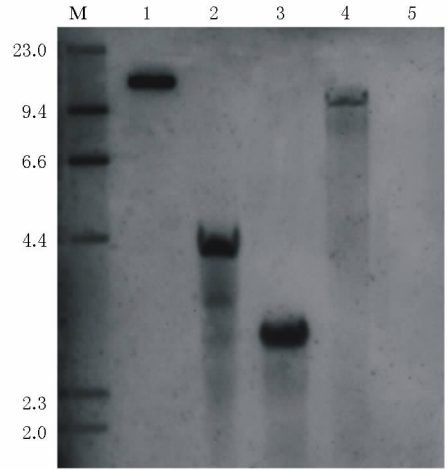
图 2 转 *AtD-CGS* 大豆中作 CGS-ZG11  $T_6 \sim T_8$  代植株的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR of *AtD-CGS* transgenic soybean Zhongzuo CGS-ZG11 at  $T_6 \sim T_8$  generations



注: 1: 阴性对照(自贡冬豆); 2:  $T_6$  中作 CGS-ZG11; 3:  $T_7$  中作 CGS-ZG11; 4:  $T_8$  中作 CGS-ZG11  
Note: 1: Negative control (ZGDD); 2:  $T_6$  plants of Zhongzuo CGS-ZG11;  
3:  $T_7$  plants of Zhongzuo CGS-ZG11; 4:  $T_8$  plants of Zhongzuo CGS-ZG11

图 4 转基因大豆中作 CGS-ZG11  $T_6 \sim T_8$  植株根、茎、叶和籽粒中 *AtD-CGS* 的半定量 RT-PCR 分析结果  
Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR of *AtD-CGS* in root, stem, leaves and seeds of  $T_6 \sim T_8$  plants of transgenic soybean Zhongzuo CGS-ZG11



注: M: 地高辛标记的 DNA 分子量标准 II; 1: 质粒对照;  
2: *Xba* I 酶切产物; 3: *Dra* I 酶切产物;  
4: *Hind* III 酶切产物; 5: 阴性对照

Note: DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker II;  
1: Plasmid control; 2: *Xba* I digested product;  
3: *Dra* I digested product; 4: *Hind* III digested product; 5: Negative control

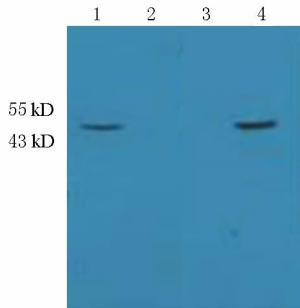
图 3 转 *AtD-CGS* 大豆中作 CGS-ZG11  $T_8$  植株的 Southern blot 检测结果

Fig. 3 Southern blot of  $T_8$  plants of *AtD-CGS* transgenic soybean Zhongzuo CGS-ZG11

2.1.3 目的基因在转录水平上的表达情况 采用半定量 PCR 方法检测  $T_6$ 、 $T_7$  和  $T_8$  转基因株系中作 CGS-ZG11 根、茎、叶和籽粒中目的基因 *AtD-CGS* 和内参基因 *CYP2* 的表达量。图 4 显示,在大豆籽粒中,外源基因 *AtD-CGS* 稳定表达,且在  $T_6$ 、 $T_7$  和

T<sub>8</sub> 稳定遗传,但在根、茎、叶中,外源基因 *AtD - CGS* 在转录水平上表达量很低甚至难以检出。

2.1.4 目的基因在翻译水平上的表达情况 从转基因植株中作 CGS - ZG11 T<sub>8</sub> 成熟籽粒中提取蛋白质,利用 Western blot 对目的基因 *AtD - CGS* 的表达进行检测。



注:1:T<sub>8</sub> 中作 CGS - ZG11;2:阴性对照(自贡冬豆);  
3:CGS 阴性对照(无 *AtD - CGS* 的原核表达载体 pB 21);  
4:CGS 阳性对照(含有 *AtD - CGS* 的原核表达载体 pB 21)  
Note:1:T<sub>8</sub> of Zhongzuo CGS - ZG11;  
2:Negative control (ZGDD); 3:CGS Negative control  
(Prokaryotic expression vector without *AtD - CGS*);  
4:CGS Positive control(Prokaryotic expression vector with *AtD - CGS*)

图5 T<sub>8</sub> 转基因大豆中作 CGS - ZG11 成熟种子中 *AtD - CGS* 蛋白 Western blot 检测结果

Fig.5 Western blot of mature seeds of T<sub>8</sub> plants of transgenic soybean Zhongzuo CGS - ZG11

从图5可以看出,转化植株和阳性对照(含有 *AtD - CGS* 的原核表达载体 pB 21)都出现了在 43 -

55 kD 之间的杂交条带,而未转化植株没有发现杂交条带,表明目的基因 *AtD - CGS* 在翻译水平上稳定表达。

2.1.5 转基因株系中作 CGS - ZG11 的总蛋氨酸含量 对转基因大豆中作 CGS - ZG11 连续3个世代和转化受体品种自贡冬豆成熟籽粒中的总蛋氨酸含量进行测定。从表1可以看出,转基因大豆中作 CGS - ZG11 连续3个世代的蛋氨酸含量均比自贡冬豆显著增加 ( $P < 0.05$ )。中作 CGS - ZG11 中总蛋氨酸含量约为野生型自贡冬豆的1.5倍,说明导入目的基因 *AtD - CGS* 能够提高大豆的蛋氨酸含量。T<sub>6</sub> ~ T<sub>8</sub> 蛋氨酸含量相近,显示目的基因 *AtD - CGS* 可稳定遗传和表达。

## 2.2 高蛋氨酸转基因大豆转育新材料的鉴定

2.2.1 除草剂抗性鉴定结果 对转 *AtD - CGS* 基因大豆中作 CGS - ZG11 与石豆5号的杂交后代进行草铵膦涂抹,非抗性植株真叶出现褐色斑点,生长点受到抑制,显现轻微枯萎状。抗性植株则无明显变化。

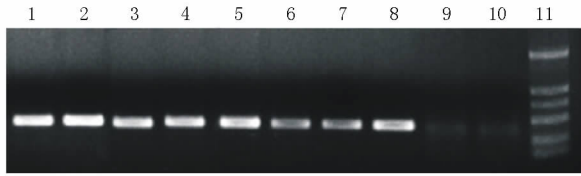
2.2.2 分子鉴定结果 根据除草剂抗性和 PCR 检测结果(图6),在转 *AtD - CGS* 高蛋氨酸大豆中作 CGS - ZG11 与石豆5号的杂交后代材料中得到中作 CGS14J890、中作 CGS14J892 等含目的基因 *At - DCGS* 的株系。

表1 T<sub>6</sub> - T<sub>8</sub> 转基因大豆中作 CGS - ZG11 和自贡冬豆成熟籽粒中总氨基酸含量测定结果  
Table 1 Total amino acid content in mature dry seeds of wild - type Zigongdongdou (ZGDD) and T<sub>6</sub> - T<sub>8</sub> plants of transgenic soybean Zhongzuo CGS - ZG11/(μmol/g)

氨基酸 Amino acid	自贡冬豆 ZGDD	T <sub>6</sub> 中作 CGS - ZG11 T <sub>6</sub> of Zhongzuo CGS - ZG11	T <sub>7</sub> 中作 CGS - ZG11 T <sub>7</sub> of Zhongzuo CGS - ZG11	T <sub>8</sub> 中作 CGS - ZG11 T <sub>8</sub> of Zhongzuo CGS - ZG11
天冬氨酸 Asp	277.84 ± 10.08b	307.3 ± 8.66a	296.57 ± 8.30a	298.54 ± 5.19a
苏氨酸 Thr	99.47 ± 3.61b	109.32 ± 2.91a	105.03 ± 2.68a	105.43 ± 1.70a
丝氨酸 Ser	130.31 ± 4.73b	139.08 ± 3.48a	132.95 ± 3.83ab	131.99 ± 1.91ab
谷氨酸 Glu	412.8 ± 14.97b	449.11 ± 14.32a	431.89 ± 12.03ab	435.62 ± 8.96ab
甘氨酸 Gly	207.71 ± 7.53c	234.78 ± 5.63a	226.47 ± 5.31ab	223.32 ± 3.40b
丙氨酸 Ala	186.21 ± 6.75d	200.94 ± 3.91a	195.50 ± 5.02ab	195.42 ± 2.63abc
半胱氨酸 Cys	21.11 ± 5.69a	24.89 ± 0.61a	23.95 ± 1.55a	23.90 ± 0.25a
缬氨酸 Val	55.49 ± 2.43b	92.15 ± 22.69a	76.46 ± 9.93ab	89.90 ± 0.91a
蛋氨酸 Met	16.71 ± 0.80b	25.03 ± 0.40a	24.58 ± 1.47a	24.62 ± 0.41a
异亮氨酸 Ile	107.80 ± 5.53b	120.11 ± 2.86a	116.93 ± 3.16a	117.23 ± 2.00a
亮氨酸 Leu	205.58 ± 12.93b	230.48 ± 5.87a	224.51 ± 5.66a	225.47 ± 3.81a
酪氨酸 Tyr	64.45 ± 5.11b	72.16 ± 1.01a	69.23 ± 2.59ab	69.06 ± 1.06ab
苯丙氨酸 Phe	10.89 ± 0.64b	12.11 ± 0.31a	11.75 ± 0.32a	11.70 ± 0.22a
赖氨酸 Lys	146.62 ± 1.03b	161.52 ± 3.73a	156.16 ± 3.91a	156.04 ± 2.59a
组氨酸 His	62.95 ± 4.24a	64.59 ± 1.82a	63.00 ± 1.44a	62.99 ± 1.00a
精氨酸 Arg	178.26 ± 12.00a	180.45 ± 4.19a	175.49 ± 5.95a	177.23 ± 3.47a
脯氨酸 Pro	225.17 ± 16.60a	219.83 ± 2.73a	210.37 ± 7.27a	212.21 ± 3.28a

注:表中同行数据后跟不同字母表示处理间有显著差异 ( $P < 0.05$ )  
Note: Values within a line followed by different letter mean significant difference at 0.05 level





注:1:pGPTV-Bar-DCGS 质粒;2-8:中作 CGS14J890, 中作 CGS14J892, 中作 CGS14J893, 中作 CGS14J894, 中作 CGS14J895, 中作 CGS14J897, 中作 CGS14J898; 9:自贡冬豆;10:石豆 5 号;11:DL2000 marker

Note:1:pGPTV-Bar-DCGS plasmid; 2-8:Zhongzuo CGS14J890, Zhongzuo CGS14J892, Zhongzuo CGS14J893, Zhongzuo CGS14J894, Zhongzuo CGS14J895, Zhongzuo CGS14J897, Zhongzuo CGS14J898; 9:Zhongzuo CGS14J890; 10:Shidou 5; 11:DL2000 marker

图 6 转 *AtD*-CGS 大豆中作 CGS-ZG11 与石豆 5 号杂交组合的 PCR 检验结果

Fig. 6 PCR tests of plants derived from the cross of *AtD*-CGS transgenic soybean Zhongzuo CGS-ZG11 and Shidou 5

### 2.2.3 农艺性状 经过目的基因检测、目标性状表

表 2 转基因大豆中作 CGS-ZG11 与石豆 5 号杂交后代的农艺性状调查结果  
Table 2 Agronomic traits of transgenic lines derived from the cross between transgenic line Zhongzuo CGS-ZG11 and an elite cultivar Shidou 5

大豆株系 Soybean line	生育期 Growth period/d	株高 Plant height/cm	底荚高度 Height of the bottom pod/cm	主茎节数 Node number of main stem	分枝数 Branches of main stem	单株荚数 Pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	单株粒重 Seed weight per plant/g	百粒重 100-seed weight/g	产量 Yield / (kg/hm <sup>2</sup> )
CGS 14J890	120 ± 1.22a	65.9 ± 7.50a	21.0 ± 2.74a	17.2 ± 2.65ab	2.6 ± 0.69ab	27.5 ± 6.96cd	51.8 ± 16.2c	5.71 ± 1.79d	20.30 ± 0.51b	1588.97 ± 153.73d
CGS 14J892	118 ± 1.87a	74.8 ± 7.88a	20.6 ± 4.90a	18.9 ± 1.96a	2.4 ± 1.33ab	28.7 ± 8.12bcd	66.9 ± 16.2bc	9.89 ± 3.85cd	20.50 ± 0.42b	1800.09 ± 237.50cd
CGS 14J893	118 ± 1.09a	69.0 ± 11.42a	16.9 ± 2.33ab	17.1 ± 3.38ab	3.5 ± 1.43a	38.4 ± 10.1ab	80.3 ± 24.4b	11.22 ± 3.41bc	20.40 ± 0.27b	2192.70 ± 113.48ab
CGS 14J894	119 ± 1.09a	69.1 ± 9.44a	20.1 ± 4.53a	18.6 ± 2.27ab	2.8 ± 1.03ab	34.1 ± 6.64abc	80.1 ± 18.5b	13.55 ± 3.13ab	21.90 ± 0.50ab	2133.44 ± 104.35ab
CGS 14J895	119 ± 1.41a	71.6 ± 2.75a	19.4 ± 3.23ab	19.8 ± 0.78a	1.7 ± 0.94b	23.0 ± 4.69d	51.1 ± 10.3c	8.12 ± 1.64cd	20.90 ± 0.38b	1666.75 ± 97.78cd
CGS14J897	120 ± 2.16a	66.4 ± 15.1a	17.6 ± 2.87ab	19.0 ± 3.80a	3.1 ± 1.37a	32.6 ± 11.6bcd	77.0 ± 25.6bc	10.63 ± 3.53bc	21.10 ± 0.18b	1955.65 ± 82.42bc
CGS 14J898	117 ± 1.78ab	73.9 ± 9.29a	15.8 ± 4.46b	18.6 ± 2.54ab	3.3 ± 1.33a	43.5 ± 13.0a	113.4 ± 41.7a	15.04 ± 5.54a	23.10 ± 0.15a	2444.57 ± 89.83a
冀豆 12(对照品种) Jidou 12 (CK)	115 ± 1.47b	74.5 ± 1.15a	15.6 ± 2.92b	15.7 ± 0.62b	2.9 ± 0.15ab	43.3 ± 2.7a	89.8 ± 2.80ab	15.30 ± 3.76a	21.80 ± 2.49ab	2211.22 ± 263.10ab

注:表中同列数据后小写字母表示处理间有显著差异(P < 0.05)。下同

Note: Values within a column with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level. Same as below

表 3 转基因大豆中作 CGS-ZG11 与石豆 5 号杂交后代的品质分析结果  
Table 3 Quality traits of soybean lines derived from the cross between transgenic line Zhongzuo CGS-ZG11 and an elite cultivar Shidou 5

大豆株系 Soybean line	粗蛋白含量 Crude protein content/%	粗脂肪含量 Crude oil content/%	蛋氨酸含量 Methionine content/(μmol/g)
CGS 14J890	47.10 ± 0.22ab	17.69 ± 0.15c	22.13 ± 3.35ab
CGS 14J892	45.75 ± 0.28c	18.90 ± 0.49a	22.33 ± 0.13a
CGS 14J893	47.09 ± 0.41ab	19.07 ± 0.18a	22.47 ± 0.201a
CGS 14J894	47.46 ± 0.48a	18.44 ± 0.19b	22.00 ± 0.07b
CGS 14J895	47.23 ± 0.25ab	18.37 ± 0.28b	19.72 ± 0.40c
CGS 14J897	46.87 ± 0.23b	18.29 ± 0.21b	21.73 ± 0.20b
CGS 14J898	47.11 ± 0.32ab	18.16 ± 0.45b	18.98 ± 0.13c
石豆 5 号 Shidou 5	41.08 ± 0.26d	19.38 ± 0.35a	17.64 ± 0.20d
冀豆 12(对照品种) Jidou 12(CK)	42.9 ± 0.24d	18.2 ± 0.32b	17.91 ± 0.34d

## 3 讨论

大豆籽粒中蛋氨酸和半胱氨酸含量的总和约占大豆蛋白的 1.3%<sup>[21]</sup>, 低于 WHO 公布的人类所需含硫氨基酸含量占蛋白 3.5% 的营养指标<sup>[22]</sup>。采用常规育种手段提高大豆中蛋氨酸含量, 进展较为

缓慢。近年来的研究表明, 生物技术是提高大豆植物中含硫氨基酸含量的有效手段<sup>[5]</sup>。本实验室 Song 等<sup>[11]</sup>将 *AtD*-CGS 基因转入大豆中, 得到高蛋氨酸转基因大豆中作 CGS-ZG11, 证明利用转基因技术提高大豆中总蛋氨酸含量是可行的, 为大豆品质育种提供了有益的经验与材料。

型鉴定和常规育种程序, 获得转基因大豆中作 CGS-ZG11 与石豆 5 号的杂交后代 F<sub>10</sub> 材料。对上述材料的主要农艺性状进行调查, 结果表明杂交后代 F<sub>10</sub> 的株高、单株荚数、单株粒重、单株粒数、百粒重分别分布在 65.9 ~ 74.8 cm、23 ~ 43.5 个、57.1 ~ 150.4 g、51.1 ~ 113.4 个、20.3 ~ 23.1 g 之间(表 2)。其中, 中作 CGS14J898 产量高于对照品种冀豆 12。

2.2.4 品质分析 通过转基因大豆中作 CGS-ZG11 与石豆 5 号杂交选育的 F<sub>10</sub> 材料, 粗蛋氨酸的含量在 45.7% ~ 47.5% 之间, 高于对照品种冀豆 12; 粗脂肪含量在 17.7% ~ 19.1% 之间, 与对照品种相近(表 3)。从表 3 可以看出, 杂交后代中蛋氨酸含量均比石豆 5 号显著增加(P < 0.05), 说明杂交后代中外源基因 *AtD*-CGS 提高蛋氨酸含量的作用得以保持。

本研究对 Song 等<sup>[11]</sup>获得的转 *AtD - CGS* 基因高蛋氨酸大豆中作 *CGS - ZG11* 进行遗传稳定性分析,证明该目的基因 *AtD - CGS* 整合到大豆基因组中,且在  $T_6$ 、 $T_7$  和  $T_8$  材料中都可以正常稳定地表达;Southern blot 结果表明,在转基因大豆中作 *CGS - ZG11* 中,外源基因以单拷贝形式存在;RT - PCR 和 Western blot 结果显示,目的基因 *AtD - CGS* 在转录和翻译水平上稳定表达;高效液相色谱法测定蛋氨酸含量表明中作 *CGS - ZG11* 的籽粒中蛋氨酸含量显著高于野生型,且在  $T_6$ 、 $T_7$  和  $T_8$  代中含量相对稳定。以上结果显示,*AtD - CGS* 基因成功转入自贡冬豆中,目的基因能够稳定遗传和表达,未发生外源基因丢失与沉默等现象。

基因的表达不仅受遗传背景的控制,还受环境的影响,同一基因在不同遗传背景下的效应值不同。王英等<sup>[23]</sup>的研究表明,不论在短日照还是长日照条件下,大豆生育期主基因(*E1 - E7*)的效应均受到背景基因型的影响。因此,在不同遗传背景下对目的基因进行鉴定与遗传稳定性分析对转基因材料的利用是很有必要的。本研究检测外源基因在杂交后代中作 *CGS14J890* 等材料中的表达与遗传情况,发现目的基因 *AtD - CGS* 在杂交转育过程中依然稳定表达,从侧面说明 *AtD - CGS* 在不同环境、不同遗传背景下能够稳定遗传和表达。

本研究中所用的表达载体为 *pGPTV - Bar - DCGS*,在该载体中含有种子特异性启动子 *Legumin B4*,该启动子是从蚕豆球蛋白基因中分离获得的,具有种子特异表达特性<sup>[24]</sup>。本研究通过分析 *AtD - CGS* 基因在中作 *CGS - ZG11* 不同组织的转录情况,发现转基因大豆植株籽粒中 *AtD - CGS* 基因高效表达,而在转基因植株其他部位表达量很低,进一步证明 *Legumin B4* 启动子具有很强的组织表达特异性。

## 参考文献:

[1] Giglione C, Vallon O, Meimel T. Control of protein life - span by N - terminal methionine excision[J]. The EMBO Journal,2003,22(1):13 - 23.

[2] Pickering F S, Reis P J. Effects of abomasal supplements of methionine on wool growth of grazing sheep[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture,1993,33:7 - 12.

[3] Tabe L, Higgins T J V. Engineering plant protein composition for improved nutrition[J]. Trends in Plant Science, 1998,3(7):282 - 286.

[4] Xu S, Harrison J H, Chalupa W, et al. The effect of ru-

minal bypass lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows[J]. Journal of Dairy Science,1998,81(4):1 062 - 1 077.

[5] Sun S S M, Liu Q Q. Transgenic approaches to improve the nutritional quality of plant proteins[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant,2004,40(2):155 - 162.

[6] Lee T T T, Wang M M C, Hou R C W, et al. Enhanced methionine and cysteine levels in transgenic rice seeds by the accumulation of sesame 2S albumin[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2003,67(8):1 699 - 1 705.

[7] Dinkins R D, Reddy M S S, Meurer C A, et al. Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15kDa zein protein[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant,2001,37:742 - 747.

[8] Hacham Y, Matityahu I, Schuster G, et al. Over expression of mutated forms of aspartat kinase and cystathionine - synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine[J]. The Plant Journal,2008,54:260 - 271.

[9] Amira G, Ifat M, Tal A, et al. Soluble methionine enhanced the accumulation of 15 kDa zein, a methionine rich storage protein, in BY2 cells and in alfalfa transgenic plants but not in transgenic tobacco plants[J]. Journal of Experimental Botany,2005,56(419):2 443 - 2 452.

[10] Avraham T H, Galili B S, Amir R. Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over - expressing the Arabidopsis cystathionine  $\gamma$  - synthase gene[J]. Plant Biotechnology Journal,2005,3:71 - 79.

[11] Song S, Hou W, Godo I, et al. Soybean seeds expressing feedback - insensitive cystathionine  $\gamma$  - synthase exhibit a higher content of methionine[J]. Journal of Experimental Botany,2013,64(7):1 917 - 1 926.

[12] Budar F, Thia - Toong L, Montagu M V, et al. Agrobacterium - mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T - DNA as a single Mendelian factor[J]. Genetics,1986,114:303 - 313.

[13] Li X G, Chen S B, Lu Z X, et al. Impact of copy number on transgenic expression in tobacco[J]. Acta Botanica Sinica,2002,44(1):120 - 123.

[14] Hinchee M A W, Connor - Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium - mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology,1988,6(8):915 - 922.

[15] Pilacinski W, Crawford A, Downey R, et al. Plants with genetically modified events combined by conventional breeding: An assessment of the need for addition-

- al regulatory data [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(1): 1-7.
- [16] Oard J, Cohn M A, Linscombe S, et al. Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*) [J]. Plant Science, 2000, 157: 13-22.
- [17] Kubo A, Aono M, Nakajima N, et al. Characterization of hybrids between wild and genetically modified glyphosate-tolerant soybeans [J]. Plant Biotechnology, 2013, 30(4): 335-345.
- [18] Fehr W R, Caviness C E. Stages of soybean development [R]. Special Report 80, Cooperative Extension Service, Agriculture and Home Economic Experiment Station [M]. USA, Ames: Iowa State University, 1977. 1-11.
- [19] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide [J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2320-2325.
- [20] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd eds [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 213-219.
- [21] Black M, Bewley J D. Seed technology and its biological basis [M]. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000. 42-84.
- [22] World Health Organization. Protein and amino acid requirements in human nutrition [R]. Geneva: World Health Organization Press, 2007, 144-146. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_935\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_935_eng.pdf).
- [23] 王英, 吴存祥, 张学明, 等. 不同光周期条件下大豆生育期主基因的效应 [J]. 作物学报, 2008, 34(7): 1160-1168.
- [24] Baumlein H, Nagy I, Villarroel R, et al. Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene [J]. The Plant Journal, 1992, 2(2): 233-239.

(责任编辑: 王丽芳)