

# 大豆 *fad* 基因反义表达载体构建及转化烟草研究

田苗苗, 刘艳菊, 李敏, 周延清\*, 姚换灵, 邢延豪

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 使用 PCR 方法从大豆基因组 DNA 中扩增出大豆油酸脱饱和酶基因 *fad2-1*, 连接到 pMD18-T 载体中, 转化大肠杆菌 JM109 菌株。测序后, 用 DNASTAR 软件进行同源性比对。然后将正确的序列反向克隆到表达载体 pBt, 并转化农杆菌菌株 LBA4404, 经双酶切鉴定和 PCR 扩增检测, 获得具有该基因反向序列的农杆菌工程菌, 转化烟草无菌苗叶片外植体, 经过组织培养和卡那霉素抗性筛选, 获得抗性烟草转化植株共 75 株, PCR 扩增出 *npt-II* 基因, RT-PCR 检测到大豆反义油酸脱饱和酶基因转录产物和 GC-MS 测定其油酸含量增加而亚油酸含量降低。结果表明, 克隆的 *fad2-1* 基因为 1196bp, 基因序列与 NCBI 中已发表的基因 *fad2-1* 序列蛋白质相似性达到 96.7%, 反义大豆 *fad2-1* 基因在烟草基因组中整合表达。

**关键词:** 大豆; 反义油酸脱饱和酶基因; 根癌农杆菌; 烟草; 遗传

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)01-0111-06

## Study on the construction of antisense expression vector of *Glycine max* oleic acid desaturase gene and its transfer to *Nicotiana tabacum*

TIAN Miao-Miao, LIU Yan-Ju, LI Min, ZHOU Yan-Qing\*,

YAO Huan-Ling, XING Yan-Hao

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** The *Glycine max* oleic acid desaturase gene *fad2-1* was cloned from its genomic DNA by PCR. The amplicon was linked to pMD18-T vector and transformed into *E. coli* JM109. After sequencing, the correct gene was reversely inserted in pBt expression vector in order to construct plant antisense expression vector, which was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 by freeze-thawing method. The modified strain LBA4404 was confirmed by double enzyme digestion and PCR detection. The antisense *fad2-1* was introduced into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation, and 75 kanamycin-resistant tobacco plantlets were regenerated. PCR, RT-PCR methods and GC-MS analysis were used to detect the *npt-II* gene, the transcript of antisense *fad2-1* and oleic acid content to get the positive transgenic plants. The results indicated that the size of the isolated gene was 1196bp, bearing 96.7% identity with the published data in NCBI database. The antisense *fad2-1* expression vector was successfully constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and tobacco cells, and antisense *fad2-1* gene was successfully integrated into the genomes of tobacco cells and expressed in transgenic tobacco plantlets.

**Key words:** *Glycine max*; antisense oleic acid desaturase gene; *Agrobacterium tumefaciens*; tobacco (*Nicotiana tabacum*); genetic transformation

收稿日期: 2010-04-26 修回日期: 2010-08-24

基金项目: 国家“863”项目(2006AA100104-15); 河南省自然科学基金项目(2008A208018)[Supported by Hi-tech Research and Development Program of China(2006AA100104-15); Natural Science Basic Research Program of Education Department of Henan, China(2008A208018)]

作者简介: 田苗苗(1981-), 女, 河南临颍人, 博士研究生, 研究方向为植物遗传学, (E-mail) miaomiao912@126.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: yqzhou@htu.cn)

大豆(*Glycine max*)是世界上重要的油料、食用和饲料作物。其主要营养成分是蛋白质和脂肪(油)等。大豆中含脂肪大约 15%~20%, 不饱和脂肪酸含量高, 占 85%, 其中多不饱和脂肪酸亚油酸含量最高达 50%以上, 油酸达 30%以上。大豆油用量占全世界食用油的 31%(Kim & Krishnan, 2004), 主要由棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等 5 种脂肪酸组成; 其中棕榈酸、硬脂酸为饱和脂肪酸, 油酸、亚油酸以及亚麻酸为不饱和脂肪酸。其脂肪酸的组成和配比种类决定种子油的品质(Gunstone & Pollard, 2001; Thelen & Ohlrogge, 2002)。大豆油在贮存过程中极易氧化, 严重影响了油的味道和稳定性。因此, 大豆油的油酸含量需要提高, 而亚油酸和亚麻酸等的含量需要降低。迄今为止, 提高大豆油酸含量的育种技术有杂交育种、诱变育种和基因工程育种等技术。其中, 采用基因修饰即抑制或降低催化油酸转化成亚油酸的关键酶——大豆油酸脱饱和酶的基因表达技术是提高大豆种子油中的油酸含量的有效的技术之一(李海燕, 2007)。我们 2004 年从大豆基因组 DNA 克隆了大豆油酸脱饱和酶基因 *fad2-1*, 并构建了它的反义植物表达载体和根癌农杆菌工程菌(周延清, 2005), 以期通过反义基因技术改良大豆脂肪酸品质。目前, 大豆转基因研究主要采用农杆菌介导法、基因枪法和种质系统法, 各有优缺点。其中最有效的、最成熟的、最有成果的方法是农杆菌介导法。但是, 它也受到大豆基因型和转化受体、农杆菌菌株、筛选剂、酚类化合物、筛选策略和诱导条件等诸多因素的影响(陈喜风等, 2008)。因此, 把反义大豆 *fad* 导入大豆改良其脂肪酸成分是比较难的, 有必要在开展此研究工作之前, 将该反义基因转入模式植物烟草, 探索其转基因技术, 鉴定其表达和功能。本研究克隆了大豆油酸脱饱和酶基因(*fad2-1*), 构建了其反义表达载体, 并且将其转入根癌农杆菌, 获得了工程菌。并将该基因导入模式植物烟草中, 鉴定其表达和功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

烟草(*Nicotiana tabacum* 'Xanthi')种子由西北大学王美娟博士提供, 大豆品种周豆 12(*Glycine max* 'ZhouDou No. 12')种子由河南省周口市农业科学研究所苑保军研究员鉴定与提供, 植物表达载

体 pBt、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 由西北大学步怀宇博士后馈赠, pMD18-T 载体、PCR 产物克隆试剂盒、*Bam*H I、*Sal* I、T4 连接酶等购自大连宝生物公司, 质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒、氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素和利福平购自上海基康生物公司, *Taq*DNA 聚合酶、RNaseA 购自天为时代公司,  $\lambda$ DNA (*Eco*RI + *Hind*III) Marker 和 2000D marker 购自 IBM 公司, 100bp Ladder 和 200bp Ladder 购自华美生物工程公司。植物组织培养基感染培养基 T1(MS+100  $\mu$ mol/L AS)、共培养培养基 T2(MS+1.0 mol/L 6-BA+0.05 mol/L IBA)、抑菌筛选培养基 T3(附加 50~80 mol/L Kan 和 500 mol/L Cef 的 T2 和生根培养基 T4(附加 50~80 mol/L Kan 和 500 mol/L Cef 的 MS))。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆基因组 DNA 的提取及大豆 *fad2-1* 基因扩增 大豆基因组 DNA 的提取参见文献(田苗苗等, 2005)。基于 NCBI 发表的大豆 *fad2-1* 基因(登录号为 L48320)序列和植物表达载体 pBt 的酶切位点, 利用 DNAMAN 软件设计引物, 其中上游引物含有 *Sal* I 位点, 下游引物含有 *Bam*H I 位点(下划线表示酶切位点): 上游引物: 5'-TTT TTG TCG ACA CTA GGC ATG GGT CTA GC-3'; 下游引物: 5'-TTT TTG GAT CCC CAT CAA TAC TTG TTC-3'。PCR 反应体系 30  $\mu$ L, 包含 1  $\mu$ L 模板 (0.3  $\mu$ g), 3  $\mu$ L 的 10X PCR 缓冲液, 1.8  $\mu$ L 的 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ L 的 10 mmol/L dNTP, 1.0  $\mu$ L 7.5 U *Taq* 酶, 300 pmol/ $\mu$ L 的上、下引物各 1.0  $\mu$ L, 1.0  $\mu$ L 9  $\mu$ g/ $\mu$ L DNA 模板。94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 59  $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下照相记录, 观察并切下扩增的条带。

1.2.2 PCR 产物的纯化与连接和转化大肠杆菌 使用上海基康生物公司的 PCR 产物纯化回收试剂盒对 PCR 产物进行回收和纯化。然后, 使用大连宝生物公司 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒把纯化 PCR 产物连接到 pMD18-T Vector 上, 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。按照王关林等(2001)的方法制备 *E. coli* JM109 感受态细胞, 使用上述连接产物转化感受态 *E. coli* JM109 细胞, 用碱解法提取白色菌落的质粒 DNA,

并对质粒进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切和 PCR 鉴定。

1.2.3 基因序列分析和同源性比较 将上述鉴定好的重组子编号送上海基康生物公司测序。采用 DNA star 软件对所测序列编码的氨基酸序列与 NCBI 中公布的 *fad2-1* 基因编码的氨基酸进行同源性比对。

1.2.4 反义表达载体的构建 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别双酶切质粒 DNA 和植物表达载体 pBt, 回收目的基因片段后后者的大片段。用 T4 连接酶将二者在 16 °C 连接过夜, 获得重组质粒命名为 pBt-FFAD。

1.2.5 根癌农杆菌的转化和鉴定 用上述 pBt-FFAD 质粒和冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 筛选抗卡那霉素根癌农杆菌 L-Bt-FFAD。然后, 提取其质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切检测及 PCR 检测。

1.2.6 烟草无菌苗的培养 将烟草种子放到培养皿中, 用 10% NaClO 溶液浸泡 20 min, 无菌水冲洗 4 次, 用无菌滤纸吸去多余水份, 接种在 1/2MS 培养基上, 放于暗处培养。3 d 后种子萌发, 待芽长至两幼小叶片时, 让其光照生长。

1.2.7 根癌农杆菌浸染液的制备 从平板上挑取单菌落转接于 YEB 液体培养基(含 Kan 50 mg/L, Str 100 mg/L), 于 28 °C, 240 r/min 振荡培养, 活化菌体。取 1 mL 菌液接种于 50 mL YEB 液体培养基, 振荡培养至  $A_{600}$  为 1.0 左右, 5 000 r/min 离心 6 min, 收集菌体, 重悬于 T1 液体培养基, 使其  $A_{600}$  为 0.8, 备用。

1.2.8 烟草转化及转基因植株的培养 采用叶盘共培养法进行烟草的遗传转化(Horsch 等, 1985)。将切割的烟草叶片预培养 2 d 后, 置于含有重组质粒的根癌农杆菌浸染液 T1 中浸泡 30 min, 期间不断轻轻摇晃, 使叶盘切面充分接触菌液。取出叶盘, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 将叶盘置于 T2 培养基上, (26±2)°C, 黑暗培养 2~3 d。然后将上述共培养叶片转移至选择培养基 T3 上, 每日光照 16 h, 光照强度 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 25 °C 培养。10 d 左右愈伤组织长出丛生芽, 每两周换一次新鲜的培养基, 待小芽长至 4 cm 左右时, 切下并转入含卡那霉素(70  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及头孢霉素(500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 T4 培养基。每隔两周左右换 1 次培养基, 筛选出生根苗。待根系生长完整(约 30 d), 将再生植株移栽至花盆中, 于温室培养。

1.2.9 抗卡那霉素烟草植株的 PCR 鉴定 取抗性烟草植株和未转化烟草植株的叶片, 用 CTAB 方法(Doyle JJ & Doyle JL, 1987)提取植物的基因组 DNA。用 PCR 方法检测 *fad2-1* 基因。其循环参数为: 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 1 min, 69.3 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 10 min, 终止反应, 4 °C 保温。取 15  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 经 1.0% 琼脂糖凝胶在 TAE 缓冲液中电泳, 电压 5 V/cm, 紫外检测并用凝胶成相系统照相。

1.2.10 抗卡那霉素烟草植株的 RT-PCR 鉴定 利用 BIOZOL 试剂提取转基因烟草叶片 RNA, 反转录为 cDNA 后, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 正反向引物均为 0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (1  $\mu\text{L}$ ), dNTP10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (0.4  $\mu\text{L}$ ), 10×buffer(2.0  $\mu\text{L}$ ), DNA 模板 20 ng(1.0  $\mu\text{L}$ ), Taq 酶 1U(0.2  $\mu\text{L}$ ), ddH<sub>2</sub>O 补齐 20  $\mu\text{L}$ 。RT-PCR 扩增程序为: 94 °C 下预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 58.0 °C, 退火 60 s, 72 °C, 延伸 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增反应完成后, 取样 10  $\mu\text{L}$ , 用琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察结果并照相。

1.2.11 转基因烟草植株叶油酸含量测定 烟草幼叶样品在 45 °C 下烘 1 h, 粉碎, 过 100 目筛, 置于干燥广口瓶密封保存。称取 100 mg 粉末烟叶样品, 放入 20 mL 带旋塞的试管中, 加入适量己二酸内标溶液, 加入 2 mL 10%(V/V)硫酸甲酯溶液, 振荡 5 min, 室温下放置过夜, 进行甲酯化反应, 然后再加入去离子水和氯仿各 5 mL 进行萃取。萃取液经 2 000 r/min 离心, 取下层清液进样。油酸甲酯和亚油酸为标准

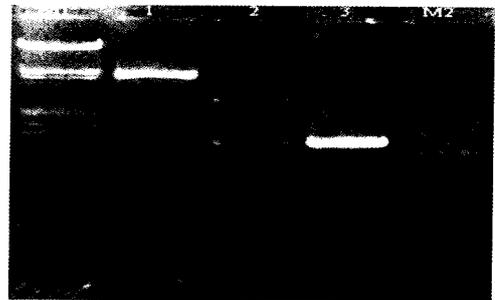


图 1 重组质粒 pMTFFAD 中基因 *fad2-1* 的 PCR 和双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR and double RE digestion product of *fad2-1* in recombinant plasmid pMTFFAD

M1:  $\lambda$ DNA/*Eco*R I+*Hind* III; M2: 200bp Ladder; 1: 被克隆基因 *fad2-1* 的 pMD18-T 载体; 2: 克隆基因 *fad2-1* 的 pMD18-T 载体的 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切产物; 3: 克隆于 pMD18-T 载体的基因 *fad2-1* 的 PCR 产物。

样。色谱柱和 GC 条件同文献(杨式华等,2008)。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆油酸脱饱和酶基因克隆

大豆基因组 DNA 的 PCR 扩增产物约为 1.2 kb, 连接到 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 JM109, 对白色单菌落的质粒酶切后得到与 PCR 产物大小相同的片段, 表明 PCR 扩增序列已连接到 pMD18-T 载体上(图 1)。

### 2.2 大豆油酸脱饱和酶基因序列分析和同源性比对

长度为 1 196 bp。用 DNA star 软件大豆油酸脱饱和酶基因序列的开放阅读框(Open Reading Fragment, ORF)编码的氨基酸进行分析可知, 该序列共编码 387 个氨基酸残基, 分子量为 44 479.44 Daltons。其中强碱性氨基酸残基(K, R)共 34 个; 强酸性氨基酸残基(D, E)共 28 个; 疏水性氨基酸残基(A, I, L, F, W, V)共 151 个; 极性氨基酸残基共(N, C, Q, S, T, Y)100 个。该序列与 NCBI 中的已发表的基因 *fad2-1* 所编码蛋白质的氨基酸比对结果表明, 两者相差了 17 个氨基酸, 相似性达到 96.7% (图 2), 这说明克隆的基因是大豆 *fad2-1* 基因。从 NCBI 中查到大豆 *fad2-1* 基因(登录号 AY611472)

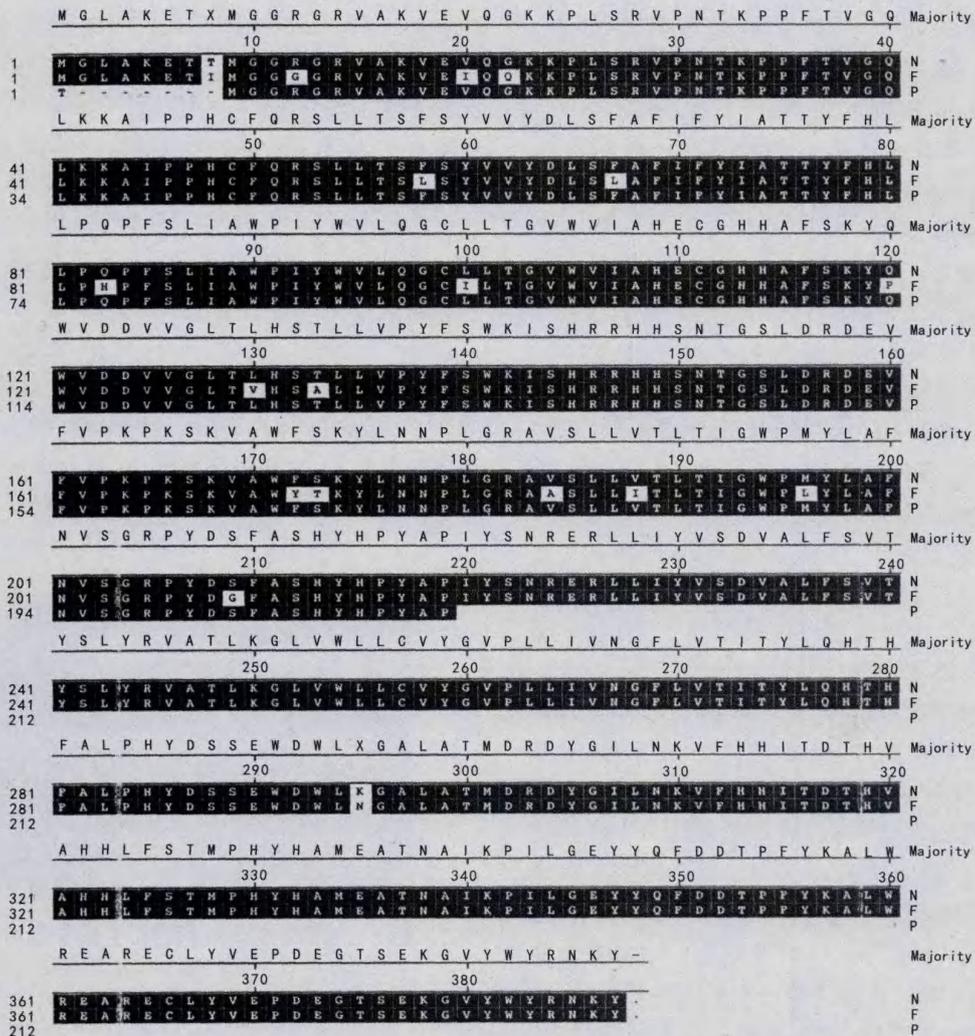


图 2 大豆油酸脱饱和酶基因及其片段序列和 NCBI 中大豆油酸脱饱和酶基因序列的比对  
 Fig. 2 Alignment of full gene *fad2-1* and its fragment sequences with that from NCBI  
 N: NCBI 中 *fad2-1* 氨基酸序列; F: *fad2-1* 基因全长序列编码的氨基酸序列; P: *fad2-1* 基因片段编码的氨基酸序列。

和烟草 *fad* 基因(登录号 AY660024)的碱基序列, 用 DNAMAN 软件比对知其相似性为 68.77%。

### 2.3 反义表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性内切酶分别双酶切重组质粒 pMTFFAD 和表达载体 pBt, 分别回收和纯化 *fad2-1* gene 与表达载体 pBt 的大酶切片段。然后, 将前者反向克隆入后者, 获得反向表达载体 pBt-FFAD(图 3), 用冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404 菌株, 对所获得的阳性克隆随机挑取几个菌落, 分别提取质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定和 PCR 扩增检测, 均能够获得目的基因片段。同时, 也获得转 *fad* 基因的根癌农杆菌工程菌。

### 2.4 农杆菌转化与转化植株再生

本试验共接种 150 块外植体, 在含有 50 mg/L 卡那霉素的分化培养基上筛选, 得到 100 个左右的不定芽, 而后将其转移至含 70 mg/L 卡那霉素的生根培养基上, 诱导根的形成, 最终获得 75 棵具有良好根系的烟草植株。转化各个时期如图 4。

基因的整合情况。经 PCR 检测, 发现 75 株抗卡那霉素植株中, 有 67 株基因组 DNA 扩增出约 1 200 bp 的目的基因片段(*fad-1* 基因), 为阳性转化植株。8 株卡那霉素抗性植株的基因组 DNA 和阴性对照的基因组 DNA 一样没有扩增出约 1 200 bp 的目的基因片段, 为假阳性转化植株。

2.5.2 抗卡那霉素烟草的 RT-PCR 鉴定 对 PCR 检测为阳性的转化烟草植株进行 RT-PCR 分析, 进一步检测外源基因在转化植株的表达情况。从 67 株 PCR 阳性植株中, 随机选择 2 株, 进行 RT-PCR 分析。从图 5 可以看出, 转基因植株和阳性对照的 RNA 均扩增出约 1 196 bp 的目的基因片段, 而阴性对照 RNA 没有扩增出该大小的条带。说明目的基因在转基因烟草中成功地表达。

2.5.3 转基因烟草植株叶油酸与亚油酸含量 用标准品绘制的标准曲线可得到: 油酸, 相关系数  $r = 0.99991$ , 回归方程为  $AR = 1.95CR - 0.0931$ ; 亚油酸, 相关系数  $r = 0.99998$ , 回归方程为  $AR = 1.49CR - 0.0589$ 。测出下列三种样品的峰面积, 代入上述公式, 计算出 1 株对照(未转化)烟草幼叶和 2 株转基因烟草幼苗幼叶的油酸含量分别为 0.087%、0.090% 和 0.091%, 亚油酸含量分别为 0.211%、0.198% 和 0.192%。因此, 转基因烟草幼叶油酸含量比对照增加 3.41%~4.6%, 而亚油酸含量却比对照减少 6.16%~9%。

## 3 讨论

反义基因在调控果实成熟、改良作物品质、获得作物雄性不育系、改变植物花色、增强植物抗病性和研究未知基因的功能等方面具有重要的作用(刘俊杰等, 2008)。利用反义基因技术进行植物高油育种是当前国际上植物基因工程研究的热点之一。烟草生长快, 离体培养再生能力强, 遗传转化效率高, 因此, 很多克隆基因的功能鉴定都在转基因烟草中进行(王全伟等, 2008)。本研究结果表明, 反义 *fad2-1* 基因转入且整合到烟草的基因组中, 而且一定程度上抑制了烟草 *fad2-1* 基因的表达。但转基因表达的水平受空间和时间的限制以及转基因组织特异性表达及亚细胞定位限制了转基因在油料种子作物中改变脂肪酸成分的操作。因此, 选择合适的植物启动子和改进其活性是增强外源基因表达首要考虑的问题。本研究使用的植物载体中所含 CaMV35S

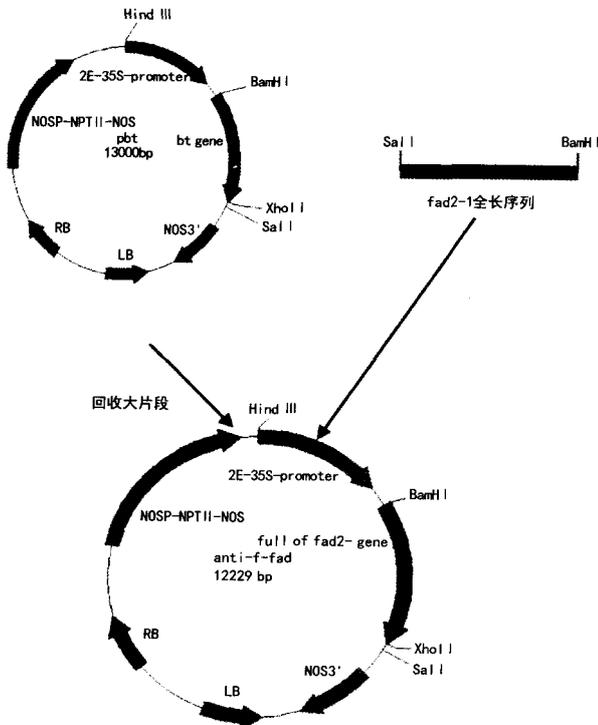


图 3 植物反义表达载体 pBt-FFAD 的构建

Fig. 3 Construction of plant expression vector pBt-FFAD

### 2.5 转化烟草的分子鉴定

2.5.1 抗卡那霉素烟草的 PCR 鉴定 以转化烟草基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 技术快速检测外源

启动子是组成型启动子,可以使外源基因在转基因植物的所有部位和所有的发育阶段都表达。因为外源基因在转基因植物内高效且持续表达会造成浪

费,有时还会导致植物形态发生改变,从而影响植物生长发育,因此,为了让外源基因在植物体内有效发挥作用且减少对植物的不利影响,可选用组织特异

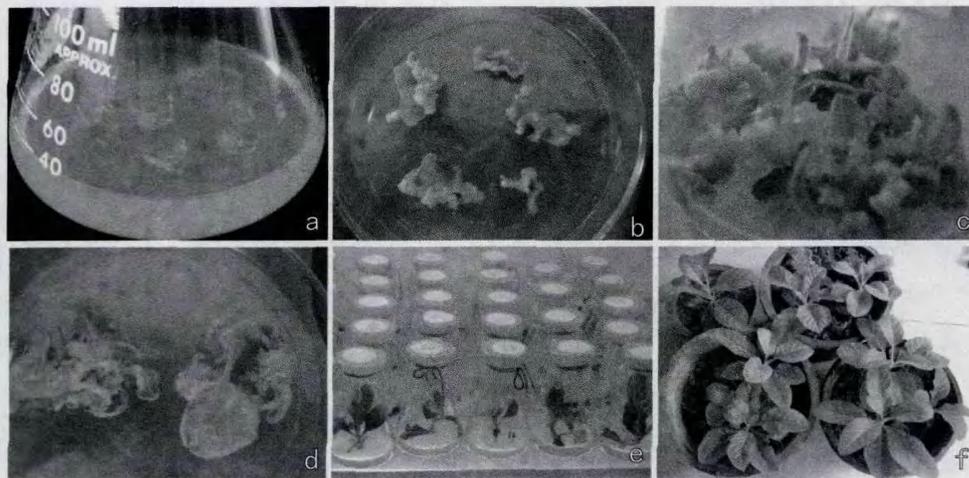


图4 烟草转化和再生过程

Fig. 4 Procedure for tobacco plant transformation and regeneration

a. 培养 5 d 感染叶片; b. 培养 10 d 产生的愈伤组织; c. 培养 20 d 愈伤组织分化 kan 抗性芽; d. 培养 30 d kan 抗性愈伤组织和芽; e. 培养 20 d 的生根 kan 抗性转化芽; f. 移栽 20 d 转基因植株。

a. tobacco leaves section cocultured for 5 days; b. kanamycin-resistant calluses induced from the tobacco leaves section cocultured for 10 days; c. kanamycin-resistant calluses-derived shoots from the tobacco leaves section cocultured for 20 days; d. kanamycin-resistant calluses-derived shoots from the tobacco leaves section cocultured for 30 days; e. kanamycin-resistant regenerated plantlets with good roots and leaves; f. kanamycin-resistant transgenic plants transplanted into flower pots and grown in green house for 20 days.

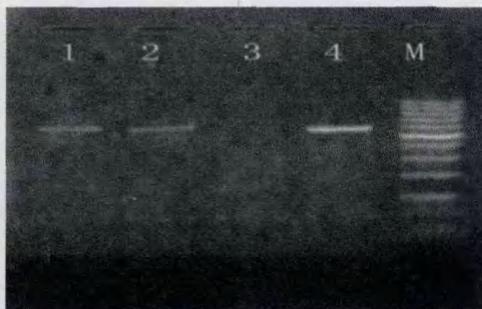


图5 抗卡那霉素烟草的 RT-PCR

Fig. 5 RT-PCR analysis of kanamycin-resistant tobacco plantlets

M. 200bp Ladder; 1-2. 抗卡那霉素烟草植株; 3. 未转化烟草植株(CK); 4. 农杆菌 pBt-FFAD.

M. 200 bp Ladder; 1-2. kanamycin-resistant tobacco plantlets; 3. Non-transformed tobacco plantlets(CK); 4. pBt-FFAD harboring soybean antisense *fad2-1* gene.

性启动子。对于通过植物转基因技术改良油品质而言,最好选用种子特异性启动子,使脂肪酸的变化集中在种子中,有效达到品质油改良的目的(李明春等,2003)。

#### 参考文献:

- Chen XF(陈喜凤), Zhu JB(祝建波), Zhang YX(张焜新), *et al.* 2008. Cloning of *Glycine max FAD2* gene and construction of plant expression vector(大豆微粒体油酸盐脱饱和酶 *FAD2* 基因克隆及其植物表达载体的构建)[J]. *J Shihezi Univ; Nat Sci Edi*(石河子大学学报·自然科学版), 26(2): 216-219
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 19(1): 11-15
- Gunstone FE, Pollard M. 2001. Vegetable oils with fatty acid changed by plant breeding or genetic modification[M]. New York; Marcel Dekker: 155-184
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 227: 1 129-1 131
- Kim WS, Krishnan HB. 2004. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cell[J]. *Plant Biotech*, 2: 199-210
- Li HY. (李海燕). 2007. Research progress on transgenic soybean (大豆转基因的研究进展)[J]. *Biotechnology(生物技术)*, 17(6): 83-86
- Liu JJ(刘俊杰), Wei XC(魏小春), Qi SS(齐树森), *et al.* 2008. An-

(下转第 123 页 Continue on page 123)