

大豆铁蛋白基因 *GmFerritin* 在玉米中的遗传转化

李晓丽^{1,2}, 王建军^{2,4}, 崔瑞洁², 谢传晓^{2*}, 段运平^{1,3*}

(1. 山西大学生物工程学院, 太原 030006; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

3. 山西农业科学院作物科学研究所, 太原 030031; 4. 山西省农业科学院玉米研究所, 忻州 034000)

摘要: 使用 In-Fusion 试剂盒构建表达载体 pCUB-*Zein::ferritin-35s::bar*, 以玉米自交系齐 319 茎尖分生组织为受体, 采用农杆菌介导法, 将玉米胚乳特异启动子基因 15 kD β -*Zein* 驱动的大豆铁蛋白 *ferritin* 基因转入玉米, 共筛选出 272 株除草剂(草铵膦)抗性植株, 其中 108 株 PCR 检测呈阳性, 转化率达 3.6%, 初步判断 *Zein::ferritin* 基因已转入玉米基因组中。

关键词: 表达载体; 农杆菌; 大豆铁蛋白 *ferritin* 基因; 玉米

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)02-0263-06

Genetic transformation of *GmFerritin* in maize (*Zea mays* L.)

LI Xiao-li^{1,2}, WANG Jian-jun^{2,4}, CUI Rui-jie², XIE Chuan-xiao², DUAN Yun-ping^{1,3}

(1. College of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006;

2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

3. Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031;

4. Shanxi Academy of Agricultural Sciences Maize Institute, Xinzhou 034000)

Abstract: The plant expression vector pCUB-*Zein::ferritin-35s::bar* was constructed by In-Fusion kit. The soybean *ferritin* gene was transferred into the shoot apical point of maize inbred line of maize inbred line Qi319 by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The soybean *ferritin* gene was expressed under the control of a maize seed storage protein prolamin promoter 15kD β -*Zein*. 272 transgenic plants were obtained after selecting with glufosinate and 108 of them were confirmed positive by PCR amplification. The frequency of transformation reached about 3.6%. This study showed that the soybean *ferritin* gene was integrated into maize genome.

Key words: expression vector; *Agrobacterium tumefaciens*; soybean *ferritin* gene; maize (*Zea mays* L.)

铁是人体正常生理代谢的必需元素之一, 也是不可缺少的营养元素。调查结果显示, 以贫血症作为人体缺铁的衡量指标, 发展中国家大部分妇女、儿童和发达国家至少 30%~40% 的妇女、儿童都受到了严重的铁缺乏困扰^[1]。人体对铁营养元素的吸收, 主要来源于蔬菜、谷类等植食性食物。但这些食物由于自身铁含量较低或铁的生物有效性低导致以它们为主要食物来源的人体缺铁^[2]。玉米(*Zea mays* L.) 是世界主要粮食作物之一, 其胚乳占籽粒重量的 80%~85%, 是主要的食用部位。因此, 通过基因工程技术培育胚乳中富含铁微量元素的玉米品

种, 是解决缺铁性贫血的一种有效途径。

铁蛋白是植物体内铁贮藏蛋白, 调节铁的生物吸收和释放^[2]。Ragland, Lobreaux, Spen, Wicks and Entsch 等分别从大豆^[3-4]、豌豆^[5]、菜豆^[6]、豇豆^[7]等多种豆类植物中分别克隆了铁蛋白基因。研究表明, 铁蛋白是一类多聚体蛋白, 由 24 个同源或异源亚基结合成一个 450 kD 的大蛋白复合物; 这些亚单位排列形成一个中空的蛋白外壳, 直径为 12~13 nm, 其中每个亚单位包括 1 个由 4 股长螺旋组成的束、5 个短的螺旋和 1 个长的突出环; 壳内含 1 个复合体状的无机铁核, 由细胞中过量铁聚合形成,

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 国际合作项目 HarvestPlus China (HPC #8235) 资助。

作者简介: 李晓丽, 女, 硕士研究生。E-mail: lixiaoli617@163.com

* 通讯作者: 段运平, 男, 研究员。E-mail: duanyp61@163.com

谢传晓, 男, 副研究员。E-mail: cxxie@caas.net.cn

内径 7~8 nm; 铁蛋白结构中最多可储存 4 500 个铁原子, 这些铁原子以可溶性形式存在, 不具毒性, 是具有生物利用价值的铁源^[8-10]。此外, 铁结合蛋白作为一种胁迫反应蛋白, 还可促进过剩铁原子的储存, 可提高植物的抗胁迫能力^[11-12]。

豆类植物是含铁量高的富铁植物, 其铁蛋白中贮藏的铁占种子铁含量的 90% 以上^[13-14]。Goto 等^[15]将大豆铁蛋白基因转入水稻, 与非转基因植株相比, 铁含量平均提高 3 倍左右。Wirth 等^[16]在水稻 globulin 启动子调控下, 将大豆铁蛋白基因和烟酰胺合成酶基因共同转入水稻, 发现转基因植株胚乳中的铁含量比非转基因植株提高了 6 倍。刘巧泉^[17]等将菜豆的铁蛋白基因导入到水稻的胚乳, 结果水稻种子的铁含量提高 64%。Lucca 等^[18]将菜豆铁蛋白基因转入水稻, 发现水稻种子中的铁含量提高了 2 倍。

本研究使用 In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit 试剂盒构建表达载体, 将连接有玉米特异表达的胚乳启动子基因 15 kD β -Zein 的大豆铁蛋白 *ferritin* 基因插入质粒 pCUB 中。以玉米自交系齐 319 茎尖为受体, 采用农杆菌介导法将 *Zein::ferritin* 基因导入玉米, 使铁蛋白 *ferritin* 基因在转基因玉米胚乳中高效表达, 提高籽粒中微量元素铁的含量, 为强化玉米营养品质和解决人体缺铁问题提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

材料: 用于研究的玉米受体材料为齐 319, 由中国农业科学院玉米优质抗逆课题实验室提供。

菌株及质粒: 大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 感受态细胞(购自 TIANGEN 公司); 含有 pBI121-*Zein::ferritin* 的大肠杆菌菌株由本实验室提供; 质粒 pCUB 为本实验室保存质粒 DNA; 农杆菌 LBA4404 感受态细胞由本实验室提供。

试剂与酶: 限制性内切酶 FastDigest Xba I (购自 Fermentas 公司), KOD FX DNA 聚合酶 (购自 TOYOBO 公司)、In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit 试剂盒(均购自 TaKaRa 公司), *Taq* DNA 聚合酶、凝胶回收试剂盒、DNA Marker DL2000 (均购自 TIANGEN 公司), 草铵膦 (购自 Bayer 公司) 等。

1.2 植物表达载体的构建

1.2.1 线性 pCUB 的制备 使用碱裂解法提取 pCUB 质粒 DNA, 100 μ L *Xba* I 酶切及去磷酸化反应体系为: 10 \times FastDigest Buffer 10 μ L, pCUB 质粒 DNA 10

μ L, *Xba* I 3.0 μ L, Fast APTM 5 μ L, ddH₂O 72 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min, 75 $^{\circ}$ C 变性 10 min。

酶切产物加等体积预冷的异丙醇沉淀 30 min 后离心, 弃上清用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 晾干后加 10 μ L ddH₂O 溶解并检测浓度。

1.2.2 *Zein::ferritin* 基因目的片段获得 根据线性载体 pCUB 两端的序列和载体 pBI121-*Zein::ferritin* 中的 *Zein::ferritin* 基因序列设计 In-Fusion 特异性引物:

正向引物 (ZF-InF): 5'-cgtgccctctctagaGCAGTACTATCCAAGGCATCCTAACAACACT-3'

反向引物 (ZF-InR): 5'-ccggggatcctctagaCTACAGGTTCTTCTCGGAGATCAGTTTCTGTTCATCAAGAAGTCTTTGATCAAAGTGC-3'。

使用 KOD FX DNA 聚合酶进行 PCR 扩增获得 *Zein::ferritin* 基因插入片段, 50 μ L PCR 反应体系组分如下: 2 \times GC Buffer I 25 μ L, dNTP(2.5 mmol \cdot L⁻¹ each)10 μ L, 上下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 1.5 μ L, 附有 pBI121-*Zein::ferritin* 的大肠杆菌菌液 1.0 μ L, KOD FX 1.0 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物检测后回收长约 1 225 bp 的片段, 即为 *Zein::ferritin* 基因, 并检测回收浓度。

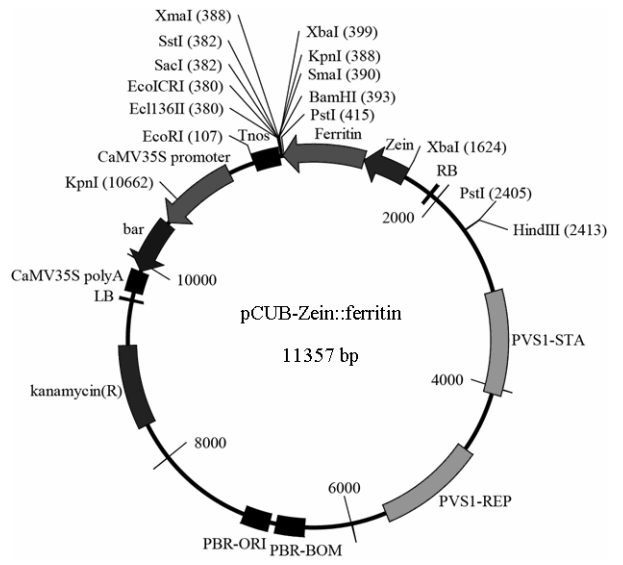


图 1 植物表达载体 pCUB-*Zein::ferritin*-35s::*bar* 结构示意图
Figure 1 Map of construction of pCUB-*Zein::ferritin*-35s::*bar* expression vector

1.2.3 pCUB-*Zein::ferritin* 的连接、转化与验证 将准备好的目的片段和线性载体用 In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit 进行连接, 构建成表达载体

pCUB-*Zein::ferritin* (如图 1)。连接体系为 10 μL : 5 \times In-Fusion Reaction Buffer 2.0 μL , In-Fusion enzyme 1.0 μL , 线性 pCUB 2.5 μL (243 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), *Zein::ferritin* DNA 1.5 μL (60 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), ddH₂O 3.0 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 然后放于冰上, 用 ddH₂O 稀释至 50 μL , 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL 连接产物转化 50 μL 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 活化菌体并涂平板 (含卡那霉素), 挑单克隆摇菌。用扩增引物 ZF-InfF/ ZF-InfR 进行菌液 PCR 检测; 取 PCR 检测阳性的菌液提取质粒 DNA, 进行质粒 PCR 和 *Xba* I 酶切鉴定; 选取质粒 PCR 和 *Xba* I 酶切鉴定的性样品送由中国农业科学院公共实验室进行测序验证, 检测 *Zein::ferritin* 基因是否正确连接到质 pCUB 中。

1.3 植物表达载体转化农杆菌

构建好的表达载体经冻融法导入根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 接种到含有利福平 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和卡那霉素 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 YEB 固体培养基平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1~2 d。挑选单菌落接种到含有利福平 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和卡那霉素 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 YEB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 用引物 ZF-InfF/ZF-InfR 进行菌液 PCR 扩增。将经过 PCR 检测正确的菌液进行扩繁与 50% 甘油按 1:1 的比例混合均匀后保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.4 农杆菌介导的玉米茎尖遗传转化

1.4.1 制备工程农杆菌 将保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 的附有载体质粒的农杆菌 LBA4404 菌液在含有利福平 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和卡那霉素 (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 YEB 固体培养基平板上划线培养 2 d。挑取单菌落接种于有相应抗生素的 YEB 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养, 培养至对数生长期, A_{600} 值大约为 0.8~1.0, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后倒掉上清, 菌体用重悬培养基悬浮至 A_{600} 值为 0.6, 在侵染前向重悬液中加入乙酰丁香酮 (AS, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.4.2 农杆菌介导法转化玉米茎尖 挑选整齐饱满的玉米自交系齐 319 种子, 用 70% 乙醇灭菌 8 min、0.1% 氯化汞水溶液灭菌 6 min、无菌水洗涤 3 次, 无菌水浸泡 6 h, 再用 0.1% 氯化汞水溶液灭菌 10 min、无菌水洗涤 5 次, 放入底部垫有滤纸并加无菌水浸湿的萌发盒, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下萌发。种子发芽后转到萌发培养基上继续生长, 待苗长到 4~6 cm 时剥去胚芽鞘和幼叶露出茎尖生长点, 用手术刀轻微挫伤茎尖, 摆放到灭过菌的培养皿上; 加入重悬的菌液, 50 kPa 压力下侵染茎尖 10 min。侵染结束后, 用无菌吸水纸吸干多余的菌液, 将茎

尖放在萌发培养基上, 然后置于 23 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下继续培养直至长出新叶。

将长出新叶的转化苗用室温下的自来水洗掉培养基和菌体后移栽到花盆中, 在上面覆盖一层塑料薄膜防止水分蒸发, 黑暗条件下生长。待到花盆中的玉米苗长到 3 叶期时喷洒 1% 草铵膦。经过 2~3 周除草剂筛选的部分植株死亡, 部分植株存活, 将存活的植株移栽到大的花盆中, 置于温室中。

1.5 转基因植株 PCR 检测

CTAB 法提取抗性植株基因组 DNA 进行 PCR 检测。根据 *Zein::ferritin* 序列设计特异引物,

正向引物 (zff):

5' - GCAACGCAACATTCCAAAAC-3'

反向引物 (zfr):

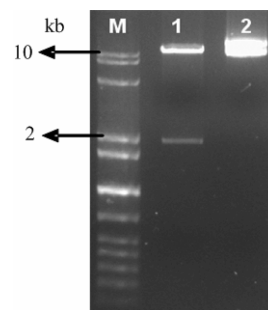
5'-TGAAGAAGCTTGGCAAATCCCT-3'

预期扩增片段大小为 552 bp。20 μL PCR 反应体系组分如下: 10 \times Buffer 2.0 μL , dNTP (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1.0 μL , 抗性植株基因组 DNA 1.0 μL , *Taq* 0.2 μL , ddH₂O 13.8 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建和鉴定

2.1.1 线性 pCUB 的获得 使用碱裂解法提取 pCUB 质粒 DNA, 经 *Xba* I 单酶切后, 异丙醇沉淀回收, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 与对照 (未经 *Xba* I 消化的 pCUB 质粒) 相比, 经 *Xba* I 消化的 pCUB 质粒得到了 2 条 DNA 条带, 大小约 12 kb 的片段为所需线性 pCUB, 与预期结果一致。



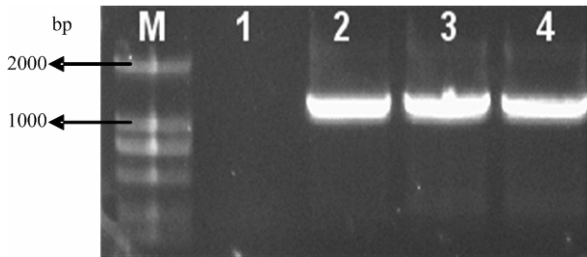
M: 1 kb plus marker; 1: Product of pCUB digested with *Xba* I; 2: Control of pCUB plasmid

图 2 pCUB 质粒 *Xba* I 酶切结果

Figure 2 Plasmid of pCUB digested with *Xba* I

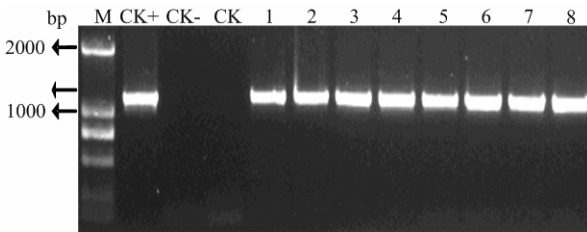
2.1.2 *Zein::ferritin* 基因目的片段的获得 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 扩增到大小约 1 225 bp

的 *Zein::ferritin* 基因目的片段 (图 3), 与预期结果相一致。从琼脂糖凝胶上切下含有目的基因片段的凝胶, 使用回收试剂盒, 回收纯化扩增产物。



M: D2000 marker; 1: Blank control (ddH₂O); 2: Positive control (Plasmid pBI 121*Zein::ferritin*); 3,4: PCR product of *E. coli* carried with plasmid pBI121*Zein::ferritin*

图 3 *Zein::ferritin* 插入片段 PCR 扩增结果
Figure 3 PCR test of *Zein::ferritin* gene

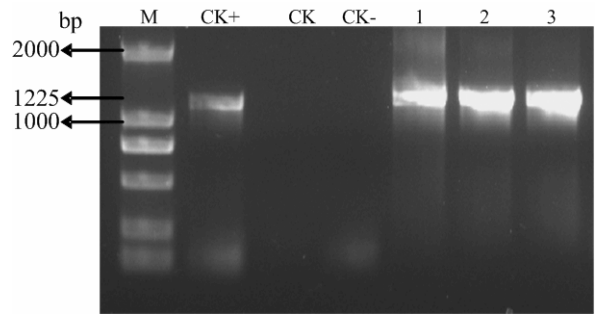


M: D2000 marker; CK+: Positive control; CK: Blank control (ddH₂O); CK-: Negative control (CUB plasmid); 1-8: PCR product of *E. coli* carried with plasmid pCUB-*Zein::ferritin-35s::bar*

图 4 pCUB-*Zein::ferritin* 重组载体转化 E. coli 后菌液 PCR 鉴定结果

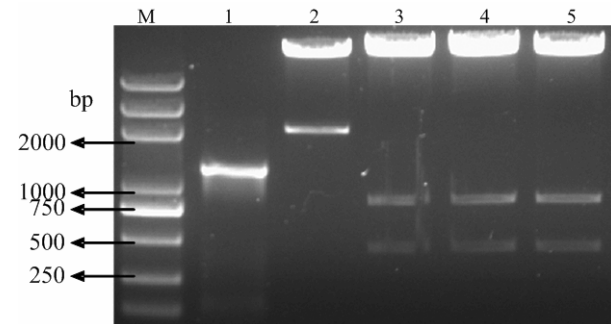
Figure 4 Recombinant vectors of pCUB-*Zein::ferritin* validated by PCR of *E. coli* after transformation

2.1.3 表达载体 pCUB-*Zein::ferritin* 的构建及鉴定 表达载体 pCUB-*Zein::ferritin* 转化后挑取单克隆摇菌进行菌液 PCR 检测, 扩增出 1 225 bp 的特异性条带 (图 4), 与预期结果一致。取 PCR 检测阳性的菌液提取质粒 DNA, 经质粒 PCR 鉴定 (图 5), *Xba* I 酶切鉴定 (图 6), 初步证明 *Zein::ferritin* 片段已插入质粒 pCUB 中。选取质粒 PCR 及酶切鉴定的阳性样品进行测序, 得到的序列与已知 pBI121-*Zein::ferritin* 中的 *Ferritin* 基因序列有 3 个碱基的差异。使用 DNAMAN 软件将本实验所克隆的序列翻译为蛋白序列, 与铁蛋白 *ferritin* 基因蛋白序列比对, 3 个碱基差异导致丙氨酸变为缬氨酸, 推断这种氨基酸变异并不影响其编码功能, 铁蛋白 *ferritin* 基因仍具有完整的表达功能, 初步证明 *Zein::ferritin* 基因已正确插入到载体 pCUB 中。



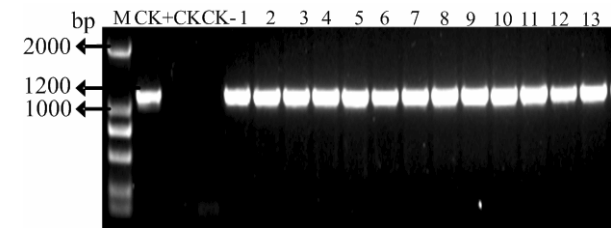
M: D2000 marker; CK+: Positive control; CK: Blank control (ddH₂O); CK-: Negative control (CUB plasmid); 1-3: PCR product of recombinant plasmid pCUB-*Zein::ferritin-35s::bar*

图 5 pCUB-*Zein::ferritin* 重组载体的质粒 PCR 鉴定结果
Figure 5 Recombinant vectors of pCUB-*Zein::ferritin* validated by PCR of plasmid DNA



M: D2000 marker; 1: The *Zein::ferritin* fragment; 2: Negative control (PCR product of CUB plasmid digested by *Xba* I); 3-5: Recombinant plasmid pCUB-*Zein::ferritin-35s::bar* digested by *Xba* I

图 6 pCUB-*Zein::ferritin* 重组质粒 *Xba* I 酶切检测结果
Figure 6 Test of plasmid pCUB-*Zein::ferritin* after *Xba* I digestion



M: D2000 marker; CK+: Positive control; CK: Blank control (ddH₂O); CK-: Negative control; 1-13: PCR product of monoclonal *Agrobacterium*

图 7 pCUB-*Zein::ferritin* 重组载体转化农杆菌菌液检测结果
Figure 7 Recombinant vectors of pCUB-*Zein::ferritin* validated by PCR of *Agrobacterium* after transformation

2.2 植物表达载体转化农杆菌

采用冻融法转化农杆菌感受态 LBA4404 后挑

取单克隆摇菌进行菌液 PCR 检测, 结果如图 7 所示: 阳性对照(载体质粒)和单克隆农杆菌菌液扩增出 1 225 bp 的 *Zein::ferritin* 基因片段, 而 (H₂O)和阴性对照(农杆菌 LBA4404 空菌株)无扩增条带, 初步证明 1~13 号农杆菌 Ti 质粒已转入载体 pCUB-*Zein::ferritin*。

2.3 农杆菌介导转化玉米茎尖

灭菌的齐 319 种子在 28℃ 黑暗条件下萌发, 待苗长到 4~6 cm 时剥去胚芽鞘和幼叶露出茎尖生长点, 用手术刀轻微挫伤茎尖, 摆放到灭过菌的培养皿上, 加入含有乙酰丁香酮液体的重悬培养基, 50 kPa 压力下侵染茎尖 10 min。侵染结束后, 用无菌吸水纸吸去多余的菌液, 将茎尖放在萌发培养基上, 置于 23℃ 黑暗条件下继续培养, 直至长出新叶, 共

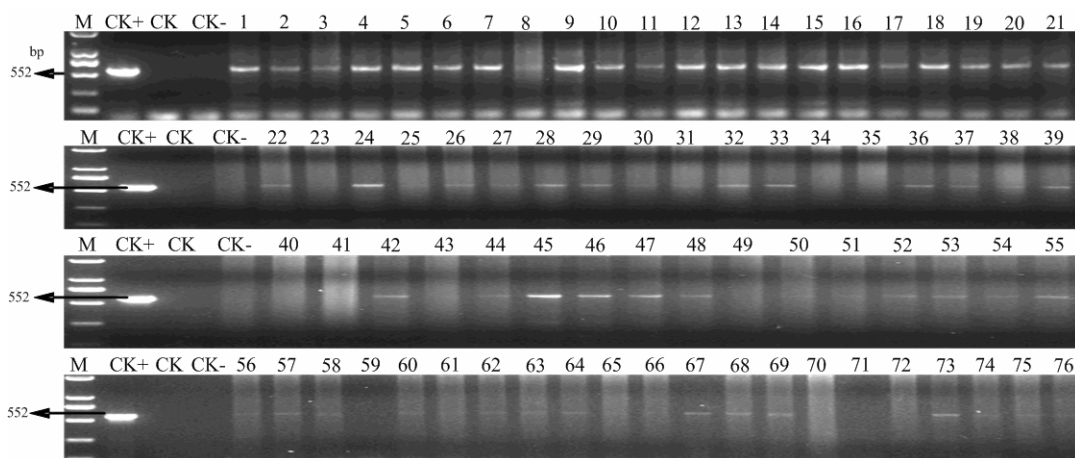
获得约 3 000 株转化苗。

2.4 转花苗的除草剂筛选

将获得的 3 000 株转化苗移栽到花盆中, 在上面覆盖一层塑料薄膜防止水分蒸发, 黑暗条件下生长 2~3 d。待到花盆中的玉米苗长到 3 叶期时, 喷洒 1% 草铵膦, 共有 272 株幼苗存活。

2.5 转基因植株的 PCR 检测

取除草剂抗性植株的叶片, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 检测。结果显示, 108 株植株 PCR 检测呈现阳性, 扩增出 552 bp 与阳性对照相同的目的片段, 阴性对照和空白对照未扩增出条带(图 8-11 为部分植株 PCR 检测结果), 初步证明 *Zein::ferritin* 基因已转入玉米基因组中。根据 PCR 检测结果显示转化率达 3.6%。



M: D2000 marker; CK+: Positive control; CK: Blank control (ddH₂O); CK-: Negative control (PCR product of DNA from non-transgenic plant); 1-76: PCR product of DNA from some transgenic plants

图 8 转基因植株 PCR 检测

Figure 8 PCR test of transgenic plants

3 讨论

本试验使用 In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit 试剂盒构建表达载体 pCUB-*Zein::ferritin*, 采用农杆菌介导的转化方法, 以玉米茎尖为受体, 将 *Zein::ferritin-35s::bar* 基因转入玉米, 对除草剂抗性植株的基因组 DNA 进行 PCR 检测, 108 株植株 PCR 检测结果呈现阳性, 初步证明 *Zein::ferritin* 序列已导入到玉米基因组中。有关大豆铁蛋白基因在转基因玉米中的功能验证及玉米胚乳的特异表达尚在研究中。

自 1987 年 Grimsley^[19]第一次证实农杆菌可以侵染玉米以来, 农杆菌介导的方法广泛的应用于玉米遗传转化。本试验选用农杆菌 LBA44044 转化齐 319 的茎尖, 转化效率为 3.6%, 与孙传波等^[20-21]

的研究结果基本一致。玉米茎尖是近几年遗传转化中广泛使用的一种受体材料, 与幼胚及其胚性愈伤组织等受体材料相比, 该方法具有简单易行、周期短、效率高、取材不受季节限制等优点。但是, 通过茎尖转化法所获得的转基因植株后代的嵌合体比较多, 加大了筛选稳定纯合的转基因株系工作的困难。

豆类植物的铁蛋白中贮藏的铁占其种子中铁含量的 90% 以上, 是含铁量较高的富铁植物。因此, 通过转基因技术将豆科作物的铁结合蛋白基因转入作物中, 可以提高作物的铁含量。目前, 利用豆科植物的铁结合蛋白基因可以提高水稻、小麦、玉米、等作物的铁含量。Qu 等^[22]在水稻球蛋白基因启动子 *Glb-1* 驱动下, 将大豆铁结合蛋白基因转入水稻, 发现转基因最高铁含量比未转化对照提高 3

倍。Drakakaki 等^[23]在水稻球蛋白基因启动子 *Glb-1* 驱动下,将大豆铁蛋白和植酸酶基因共同转入玉米,结果转基因植株的铁含量普遍增加,同时也提高了铁的生物利用率。因此,利用种子胚乳特异性的启动子来驱动铁结合蛋白基因在转基因作物种子中的表达,是培育高铁含量转基因作物的有效途径。本实验将连接有玉米特异表达的胚乳启动子基因 15 kD β -*Zein* 的大豆铁蛋白 *ferritin* 基因导入玉米,有望提高玉米胚乳中铁营养元素的含量,为强化玉米营养品质和解决人体缺铁问题提供帮助。

参考文献:

- [1] Unicef, University U N, Organization W H. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control: a guide for programme managers [R]. WHO, 2001.
- [2] 谢传晓, 王康宁, 张德贵, 等. 玉米铁微营养生物有效性与生物强化的研究进展[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 81-84.
- [3] Lescure A M, Proudhon D, Pesey H, et al. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(18): 8222.
- [4] M R, Jf B, J G. Evidence for a conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265: 18339-18344.
- [5] Lobreaux S, Yewdall S J, Briat J F, et al. Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin.[J]. Biochemical Journal, 1992, 288(Pt 3): 931.
- [6] Spence M J, Henzl M T, Lammers P J. The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(3): 499-504.
- [7] Wicks R E, Entsch B. Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume, *Vigna unguiculata* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 192(2): 813-819.
- [8] Theil E C. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms [J]. Annual Review of Biochemistry, 1987, 56(1): 289-315.
- [9] Andrews S C, Harrison P M, Yewdall S J, et al. Structure, function, and evolution of ferritins[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1992, 47(1): 161-174.
- [10] Goto F, Yoshihara T, Saiki H. Iron accumulation in tobacco plants expressing soyabean ferritin gene[J]. Transgenic Research, 1998, 7(3): 173-180.
- [11] Briat J F. Roles of ferritin in plants [J]. Journal of Plant Nutrition, 1996, 19(8/9): 1331-1342.
- [12] Briat J F, Lobréaux S. Iron transport and storage in plants [J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(5): 187-193.
- [13] Ambe S, Ambe F, Nozaki T. Mössbauer study of iron in soybean seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(3): 292-296.
- [14] Marentes E, Grusak M A. Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.)[J]. Seed Science Research, 1998, 8: 367-376.
- [15] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(3): 282-284.
- [16] Wirth J, Poletti S, Aeschlimann B, et al. Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin[J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(7): 631-644.
- [17] 刘巧泉, 姚泉洪, 王红梅, 等. 转基因水稻胚乳中表达铁结合蛋白提高稻米铁含量[J]. 遗传学报, 2004, 31(005): 518-524.
- [18] Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2002, 21(suppl 3): 184S-190S.
- [19] Grimsley N, Hohn T, Davies J W, et al. Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants.[J]. Nature, 1987, 325(7000): 177-178.
- [20] 孙传波, 曲文利, 姜志磊, 等. 农杆菌介导向玉米茎尖导入 HAL1 基因的初步研究[J]. 玉米科学, 2009, 17(6): 32-34.
- [21] 孙传波, 李海华, 郭嘉, 等. 农杆菌介导法向玉米茎尖导入抗草甘膦 EPSPS 基因的研究[J]. 生物技术通报, 2011(3): 91-93.
- [22] Qu L Q, Yoshihara T, Ooyama A, et al. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds[J]. Planta, 2005, 222(2): 225-233.
- [23] Drakakaki G, Marcel S, Glahn R P, et al. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(6): 869-880.