

利用淀粉凝胶电泳技术鉴定 外源 DNA 导入后代*

李希臣 卢翠华 雷勃钧
钱 华 吕云波

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨, 150086)

摘 要

利用淀粉凝胶电泳技术, 对外源 DNA 直接导入栽培大豆的变异后代, 进行了磷酸己糖异构化酶(GPI)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)和葡糖磷酸变位酶(PGM)的同工酶酶谱分析。实验结果表明: 将向日葵的 DNA 导入栽培大豆后, 三种酶的谱带清楚, 后代与受体及供体间谱带存在差异。有的出现了供体特异带, 有的出现了供体和受体所不含有的新型带, 有的酶谱带加强或减弱, 这说明外源 DNA 已导入到受体基因组中, 并在不同程度和不同方式上得到了表达。

关键词 大豆; 淀粉凝胶; GPI; IDH; PGM; 谱带; 受体; 供体

前 言

近年来, 国内外许多研究都以同工酶为“生化指标”来探讨高等植物中的许多理论和实践问题, 在农作物上研究较多的酶是过氧化物酶, 酯酶及超氧化物歧化酶。而对磷酸己糖异构化酶(GPI), 异柠檬酸脱氢酶(IDH)和葡糖磷酸变位酶(PGM)的研究较少, 尤其是利用淀粉凝胶电泳技术鉴定通过外源 DNA 直接导入栽培大豆的后代更属罕见。

从遗传学角度讲, 酶是基因与性状的联接物, 为此本研究试图从酶谱的变化来证实基因的变化, 从而判断外源供体 DNA 片断是否整合到受体基因组中, 在后代中是否得到表达, 从而为大豆的基因转移及分子育种技术提供理论依据。

材料和方法

1. 供试材料

供试材料为 D9105 组合, 见表 1。

* 本文于 1995 年 8 月 4 日收到。

This paper was received on Aug. 4, 1995.

表 1 大豆同工酶试验供试材料
Table 1 Test materials of soybean isozyme

编 号 No.	材 料 Materials	组 合 Combination	编 号 No.	材 料 Materials	组 合 Combination
1	黑农 33 Heinong 33	受 体 Receptor	6	93—574	D9105
2	向日葵 Sunflower	供 体 Donor	7	93—575	D9105
3	93—571	D9105	8	93—576	D9105
4	93—572	D9105	9	93—577	D9105
5	93—573	D9105	10	93—578	D9105

2. 试验方法

- (1)样品的制备:将大豆种子洗净,用清水浸泡 24 小时,去掉种皮,取子叶约 9mg,放入点滴板中,加入缓冲液 40μl,研磨后,置于-20℃冰箱中冷冻,备用。
- (2)淀粉凝胶的制备:取水解马铃薯淀粉 44g,加蔗糖 12g,加入凝胶缓冲液 250ml,加热煮沸,排出气泡,倒入电泳槽中,室温下放置 2 小时,凝固。
- (3)电泳:用手术刀片在凝胶板上部,垂直切割,用一小滤纸(2×5mm)吸取溶化了的样品,夹入切割的缝中,在 4℃冰箱中,20mA,75V 条件下,电泳 15 小时。电泳结束后,将胶平切 3 片,分别染色。三种酶的染色液成份,见表 2。

表 2 三种酶的染色液成份
Table 2 Staining compositions of three enzymes

酶 Enzyme	染色液成份 Staining composition	
磷酸己糖异构化酶 (GPI)	50ml 0.05M Tris-HCl ₁	1ml G-6-PDH ₁
	1ml MTT ₁	0.3ml PMS ₁
	1ml MgCl ₂ ₁	0.5ml NADP ₁
	1ml fructose-6-phosphate	
异柠檬酸脱氢酶 (IDH)	50ml 0.1M Tris-HCl ₁ 1ml MgCl ₂ ₁	
	2ml ISA ₁ 1ml MTT ₁ 0.3ml PMS	
葡萄糖磷酸变位酶 (PGM)	50ml 0.05M Tris-HCl ₁	
	250mg glucose-1-phosphate ₁	
	10mg EDTA ₁ 1ml MgCl ₂ ₁ 0.5ml NAD ₁	
	1.5ml G-6-PDH ₁ 1ml MTT ₁ 0.3ml PMS	

结果与讨论

1. 磷酸己糖异构化酶(GPI)

GPI 含有 3—8 条谱带,所分析的材料在中下部都有两条活性很强的谱带,这是它们

的共同带。差别发生在中部,受体含有 5 条带,供体含有 7 条带,后代中除 7 号材料外,都含有供体所特有的 2 条带;5 号和 6 号材料含有 8 条谱带,在最上部各有一条较宽的带,这是供体和受体都不具有的带。见图 1。

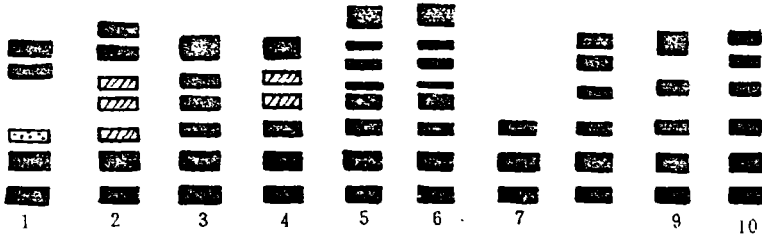


图 1 GPI 同工酶酶谱

Fig. 1 Patterns of GPI isozyme

2. 异柠檬酸脱氢酶(IDH)

IDH 的谱带有两种类型,受体含有一条谱带,供体含有 2 条谱带。所分析的 8 份后代材料有 4 份与受体基本一致,4 份与供体基本一致,但谱带的迁移率和供体不同,见图 2。

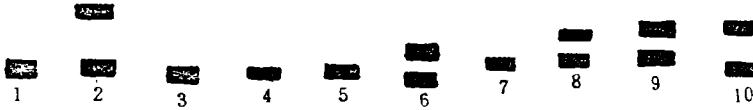


图 2 IDH 同工酶酶谱

Fig. 2 Patterns of IDH isozyme

3. 葡萄糖磷酸变位酶(PGM)

PGM 含有 1—2 条谱带,所分析的 10 份材料中,4 份含有 1 条谱带,6 份含有 2 条谱带,虽然受体与供体均含 1 条谱带,但它们的迁移率不同。后代谱带的带型与受体、供体皆不相同,3 号和 9 号材料虽均为 1 条带,但其迁移率与 4、5、6、7、8 和 10 号材料的下部一条带一样都大于受体和供体,4、5、6、7、8 号的上部一条带与供体向日葵的谱带相同,10 号材料上部一条带的迁移率小于受体和供体。美国 MB. Gorman 等人 1983 年研究纯合型大豆 PGM 同工酶谱有 2 条谱带,本实验结果与其相似。见图 3。

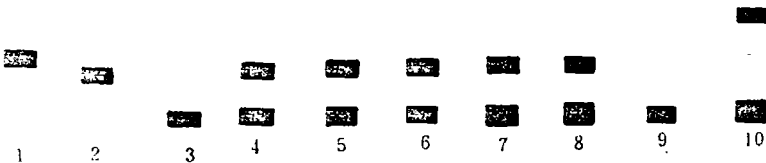


图 3 PGM 同工酶酶谱

Fig. 3 Patterns of PGM isozyme

在所分析的三种酶中,有些后代含有供体所特有的谱带,有些后代增加供体和受体所不具有的谱带,有些谱带的酶活性增强或减弱。这些酶谱的变化与该组合后代材料在某些不同性状的变异较吻合。这说明,利用花粉管通道技术,可以将外源基因引入受体材料,并在某些同工酶谱上有所反映,初步从酶谱与性状的变化推断出:外源基因已进入受体基因组中,并在不同程度上得到了整合、表达和遗传。

参 考 文 献

- [1] Griffin J D et al. , Inheritance and Linkage Studies with Five Isozyme Loci in Soybean, Crop. Sci. 1987 (27): 885-892
- [2] 卢翠华等,1990,黑龙江省主要大豆品种同工酶酶谱分析,大豆科学,(2):145~148
- [3] 卢翠华等,1991,外源 DNA 导入栽培大豆其后代过氧化物酶同工酶酶谱分析,中国油料,(3):35~36

EXAMINATION OF PROGENIES OF SOYBEAN RECEIVED EXOGENOUS DNA WITH STARCH GEL ELECTROPHORESIS

Li Xichen Lu Cuihua Lei Bojun Qian Hua Lu Yunbo

(Bio. Res. Center, Heilongjiang Acad. of Agr. Sci. Harbin 150086)

Abstract

With the method of starch Gel Electrophoresis, analysis of patterns of GPI, IDH and PGM were made in variant progenies of soybean cultivars which exogenous DNA was introduced directly. The results showed that in soybean received DNA of sunflower, patterns of three enzymes were clear, and there were differences among patterns of the progeny, receptor and donor. Some of the progenies had the special bands from donor, some had new bands that didn't belong to donor or receptor and some had stronger or weaker bands. These indicate that the fragments of exogenous DNA have inserted into the genome of the receptor and expressing.

Key words Soybean; Starch Gel; GPI; IDH; PGM; Pattern; Receptor; Donor