

早熟大豆外源 DNA 导入的 RAPD 分子验证^{*}

李希臣 雷勃钧 卢翠华 钱 华
周思君 吕云波

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心 哈尔滨 150086)

谢纬武 王 斌

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要

利用花粉管通道技术直接导入外源总 DNA,从而进行农作物品种改良,在国内外许多作物上已得到了广泛的应用。但外源总 DNA 是否能够通过花粉管通道进入受体,后代的变异是不是由于外源总 DNA 片段与受体基因组整合、表达所引起的,一直没有得到直接的分子生物学证据,本文报道了利用 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)这一分子生物学技术,对通过花粉管通道导入外源总 DNA 所获得的大豆早熟后代进行了分子验证。结果表明:在后代基因组中找到了供体具有而受体没有的特异性 DNA 片段,直接从 DNA 分子水平上证明了外源总 DNA 片段可以通过花粉管通道导入受体,并与其基因组 DNA 整合,在后代中得到表达和遗传。

关键词 大豆;花粉管通道;早熟;RAPD

利用花粉管通道技术,将外源总 DNA 或目的基因的重组分子直接导入农作物,从而实现农作物品种改良,自 70 年代周光宇先生提出后^[1],相继在许多科研和育种单位作为一种方法进行应用,并已在多种作物上取得了一定的成效,如抗病棉花^[2]、抗旱水稻^[3]以及大豆等^[4],我们利用含有早熟血缘的栽培大豆绥农 8 号为供体,提取其总 DNA,通过花粉管通道技术直接导入推广品种黑农 26 中,获得比黑农 26 熟期提早 10 天左右的变异后

^{*} 本研究为国家自然科学基金资助。

本文于 1993 年 11 月 2 日收到。

This paper was received on Nov. 2, 1993.

代,其早熟性状迅速稳定,该变异后代已作为品系进入黑龙江省区域试验。

尽管该技术已在多方面取得了成绩,但多年来一直未能从分子生物学上得到直接有力的证据,没有能够证明利用该方法所获的转化后代是由于供体 DNA 片段整合到受体基因组中引起的变异,还是由于外界刺激而导致后代发生变异。为了能从分子水平得到直接的证据,我们利用含早熟血缘的绥农 8 号大豆总 DNA 片段导入推广品种黑农 26 的早熟转化后代及其供体绥农 8 号、受体黑农 26 为试材,对其进行了 RAPD 分子水平的 DNA 多态性分析。RAPD 技术是一项新发展起来的分子生物学技术^[5,6,7],现已广泛用于植物种属鉴定、基因定位及外源导入基因的追踪等,国内已有人将此技术用于小冰麦易位系的鉴定,并已获得满意结果^[8]

本文将报道 RAPD 分析的结果。

材 料 和 方 法

1. 植物材料

供体:绥农 8 号,含有早熟血缘的栽培大豆品种,生育期 115~120 天。

受体:黑农 26,黑龙江省推广品种,生育期 125 天。

后代:D92-1072、D92-1035 为绥农 8 号 DNA 导入黑农 26 的稳定早熟转化后代。

2. RAPD 检测

(1)模板 DNA 的提取采用苯酚-氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法,制备微量植物材料的 DNA^[9]。

(2)RAPD 扩增

RAPD 是 Randomly Amptified Polymorphic DNA 的缩写,其核心技术是通过 PCR 扩增来检测 DNA 的多态性,所用为 10bp 的寡聚核苷酸随机引物,此技术方法已广泛用于植物种属鉴定、外源导入基因的追踪等^[10]。

RAPD 扩增所用的引物是由美国 Operon 公司生产的随机引物试剂盒。

RAPD 反应中,供体、后代和受体以每个引物为一组,分别扩增。

反应体系为 25μl,	反应混合物
组成	最终浓度
超纯水	*
10×PCR 反应缓冲液	1×
Tag DNA 聚合酶	1. 25 单位/25μl
dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	各 200μM
引物	0. 2μM
模板 DNA	25ng/25μl

* 各样品按最终浓度加好后,加超纯水至 25ul。

反应体系各样品加好后,混匀,用 40 μ l 石蜡油覆盖。在 DNA 热循环仪(DNAThermal Cycler 480, PEKIN ELMER CENTUS)固体加热块的反应孔中加两滴石蜡油,插入反应体系的 0.5ml 的小离心管,然后开机进行 RAPD 扩增,扩增程序如下:

94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟; 37 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟。

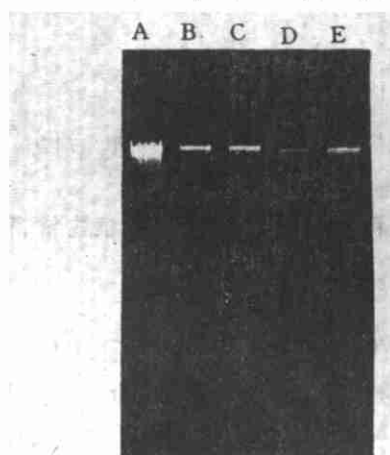
进行 40 个循环,然后在 72 $^{\circ}$ C 保持 5 分钟。

反应结束后,吸出水相,加 1/5 体积的溴酚蓝,混匀,用 1.4% 的琼脂凝胶电泳检测扩增片段多态性结果,在紫外检测仪下观察、记录。

结 果

一、模板 DNA 提取

用苯酚-氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法提取的大豆 DNA,经紫外光吸收测定,0.6% 的琼脂糖凝胶电泳检测,其纯度和浓度及片段长度均符合 RAPD 实验的要求。见图 1。



A、DNA 分子量标记、 λ -DNA 长度为 50kb

B、绥农 8 号

C、D90-1035

D、D90-1072

E、黑农 26

图 1 提取的模板 DNA

二、RAPD 扩增结果

本实验共用 132 个引物进行了 DNA 片段扩增,供体、受体及后代以每个引物为一组,扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外检测仪下观察、照相。在所用这些引物中四个样品扩增产物完全相同的有 117 个引物,占 88.6%,而在 15 个有差异的引物中,有两个引物即 OPA11、OPY07 在供体和后代中有明显相同的片段,而该片段在受体中不存在,实验结果经三次重复,结果稳定。见图 2。

图 2-1 中在 1900、1080、320bp 处,后代与供体有三条十分清晰的相同带,而在受体中不存在这三条带。

图 2-2 中在 2250、1130bp 处,后代与供体有两条清晰的相同带,而在受体中没有这两条带。

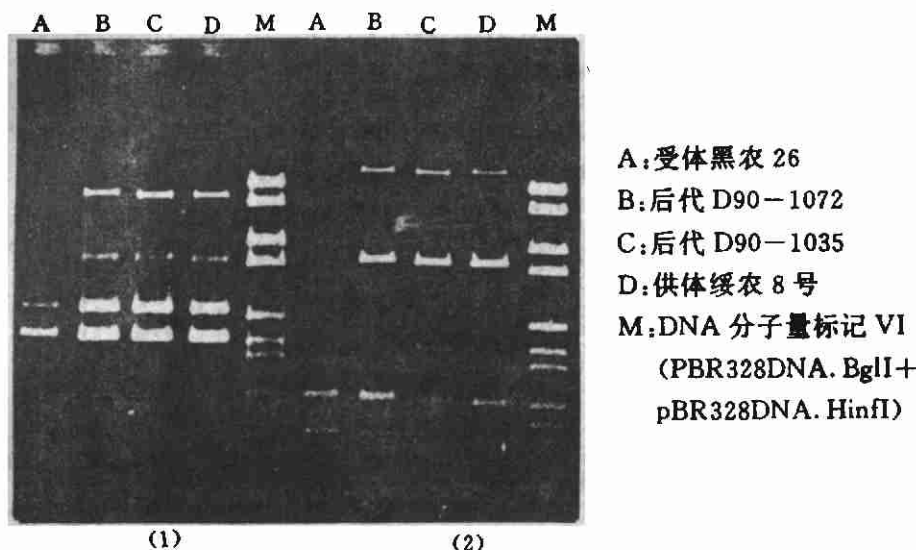


图 2 引物 OPY 07, OPA 11 的扩增产物

2-1 为引物 OPY 07 的扩增产物其序列为: 5'-AGAGCCGTCA-3'

2-2 为引物 OPA 11 的扩增产物其序列为: 5'-CAATCGCCGT-3'

讨 论

RAPD 分析结果表明:在每组 4 个材料用于 RAPD 扩增的 132 个引物中,有 117 个引物的扩增产物表现高度的一致性,这是由于两种栽培大豆及其转化后代,遗传基础十分相近,基因组 DNA 有高度的同源性,所以许多引物的结合位点相同,扩增产物也相同。剩余 15 个引物中有 2 个引物的差异重复性良好,由于这两种栽培大豆及其导入后代,各具特点及栽培特性,在遗传上存在一定的差异,所以后代中有两个引物所扩增出的片段在供体绥农 8 号中存在,而在受体黑农 26 中没有检测到。这就从 DNA 水平上直接证明了供体绥农 8 号基因组 DNA 片段通过花粉管通道进入了受体基因组中,并且在后代中得到表达和遗传。被检测出的片段是否与早熟性状有关,或者哪个或哪几个片段与早熟性状有关,目前尚不清楚,还需做许多工作,但 D90-1035, D90-1072 在田间确实表现比黑农 26 早熟 10 天。这项研究实验第一次从 DNA 水平上得了外源 DNA 导入的直接分子生物学证据,为未来的研究奠定了一定的基础。

虽然我们目前还没有直接将基因与性状的检测有机地结合起来,但利用花粉管通道技术进行外源 DNA 导入的方法简便、快速,不需制备特定的 DNA 片段,在实践中,特别是在基层育种单位有一定的应用价值,这项技术已在分子生物学角度得到证实,该技术与常规育种方法相结合,定能在作物育种上,十分有效果,培育出突出的新种质资源。

参 考 文 献

- [1] 周光宇, 1977, 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论, 中国农业科学, (2): 16~20

- [2] 黄骏麒等, 1986, 外源抗枯萎病 DNA 导入感病棉的抗性转移, 中国农业科学, (3)32~36
- [3] 段晓岚等, 1985, 外源 DNA 导入水稻引起的性状变异, 中国农业科学, (3)6~10
- [4] 雷勃钧等, 1989, 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异, 中国油料, (3)11~13
- [5] Welsh, J. et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(24), 7231~7281
- [6] Williams, J. G. K. et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(22), 7531~7535
- [7] Wang Bin, et al., 1992, RAPD and its application in plant molecular biology, in "Selected Paper on RICE BIOTECHNOLOGY", B. Wang and K. W. Yuan ed: China Science and Technology Press, Beijing 110~122
- [8] 施晓明等, 1992, 用 RAPD 技术鉴定小冰变易位系, 遗传学报, 20(1), 31~37
- [9] 陈璋等, 1990, 三种快速提取植物 DNA 改良方法的比较, 遗传, 12(2), 10~12
- [10] 惠东威等, 1992, RAPD 技术及其应用, 生物工程进展, Vol. 12, No. 6

MOLECULAR VERIFICATION OF SOYBEAN FOREIGN DNA INTRODUCTION TO INDUCE EARLINESS THROUGH RAPD TECHNIQUE

Li Xichen Lei Bojun Lu Cuihua Qian Hua Zhou Sijun Lu Yunbo

(Bio. Res. Center, Heilongjiang Academy of Agri. Sci., Harbin, 150086)

Xie Weiwu Wang Bin

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, 100101)

Abstract

The technology of introduction foreign total DNA through pollen tube channel had been widely used on many kinds of crops' improvements. But this technology had never been verified through molecular biology. The question was whether total DNA can get into recipient through pollen tube channel or not, and whether the variations were caused by foreign total DNA fragments inserting into recipient and brought into expressing or not. Soybean early maturing progenies derived from introduction of foreign total DNA verified through molecular biology techniques—RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) is reported in this paper. The result denote that: The specific DNA fragments of donor have been found in genome of progenies and these fragments didn't exist in the original recipient. Foreign total DNA fragments can insert into recipient through pollen tube channel and perform phenotypic expression can be inherited in progenies. This have been directly verified through technique of molecular level of DNA.

Key words Soybean; Pollen tube channel; Early maturity; RAPD