

外源 DNA 导入的大豆品种 “黑生 101”的 RAPD 初探^{*}

李希臣 雷勃钧 卢翠华 钱 华
周思君 韩玉琴 刘昭军

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心 哈尔滨 150086)

摘 要

黑生 101 是利用花粉管通道技术育成的第一个大豆品种,利用 132 个随机引物对黑生 101 及其供体、受体的 DNA 进行 RAPD 扩增,其中 3 个单引物和 2 个双引物组合起来,均能在后代黑生 101 中扩增出与供体相同而与受体不同的 DNA 片段,证明黑生 101 中确有供体 DNA 片段的导入。

关键词 大豆;黑生 101; RAPD; 分子验证; 花粉管通道

黑生 101 由黑龙江省农业科学院生物技术研究中心育成,是利用花粉管通道技术将半野生大豆龙 79-3433-1 的总 DNA 直接导入受体 6296-3,所获得的品系 D89-9822,1997 年由黑龙江省品种审定委员会审定并命名为黑生 101,它集高产、优质、高蛋白于一身,是我国应用生物技术育成的第一个大豆新品种^[1 2]。多年来花粉管通道技术已在我国乃至世界的许多实验室和育种单位得到广泛的应用^[3 4 5],但外源 DNA 片段是否能够通过花粉管通道途径进入受体并得到整合,所获得的材料是不是供体 DNA 片段整合到受体基因组的转化后代等。由于所用的供体总 DNA 而非目的基因,所以无法采用常规 PCR Southern 杂交等分子生物学手段进行检测和验证,因而一直未能取得分子转化的证据。随着分子生物学的发展,RAPD 技术越来越受到基因工程工作者的青睐和广泛的应用,该技术对于外源导入基因的追踪等具有简单、快捷的效果和高效的 DNA 多态性检出率等特点^[6 7 8 9 10 11],所以采取该技术对黑生 101 进行分析,以取得导入的 DNA 分子水平的转化证据。

* 本项目得到省自然科学基金的资助。

收稿日期 1998-11-25

Received on Nov. 25, 1998

材料与方法

1 植物供试材料

1.1 供试植物材料及特点

供体: 龙 79-3433-1 (半野生大豆) 抗逆性强、高蛋白, 其蛋白质含量为 51.01%。

受体: 6296-3 (栽培大豆稳定品系, 已命名推广) 蛋白质含量 1989-1995 年平均为 43.68%; 最高年份可达 45%, 是推广品种中蛋白质含量较高的品种。

后代: 黑生 101 蛋白质含量 1989-1995 年平均为 45.44% (脂肪 17.87%), 平均比受体提高近 2 个百分点, 最高年份可达 47%, 蛋白质和脂肪含量的总和也比受体高近 2 个百分点。与大豆品质相关的球蛋白总量比受体高近 10 个百分点, 其中与大豆加工品质相关的 11S 球蛋白所占比例高达 72.9%, 是大豆属中罕见的, 也是受体所不及的。抗逆性强, 耐旱, 耐轻碱, 抗病性好, 田间鉴定, 抗灰斑病^[12]; 生产试验产量比标准品种提高 9.8%。

1.2 10-mer 随机引物, 购于北方同正公司 (按美国 Oporon 公司的引物序列合成), 这 132 个引物分别是 OPA₁₋₂₈ OPD₁₋₂₈ OPE₁₋₂₈ OPV₁₋₂₈ OPX₁₋₂₈ OPY₁₋₂₈ OPB₇ OPB₈ OPC₀₄ OPC₀₇ OPC₀₈ OPC₀₉ OPC₁₀ OPC₁₁ OPC₁₃ OPC₁₆ OPC₁₈, 使用双引物进行扩增的有四对: OPA₁₁+ OPC₁₂, OPC₀₄+ OPC₁₅, OPV₀₁+ OPV₀₂, OPV₀₂+ OPV₀₃。

2 RAPD 检测

2.1 模板 DNA 提取方法

采用苯酚-氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法, 提取 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片段大小, 岛津 UV-160A 检测其浓度和纯度^[13-15]。

2.2 RAPD 扩增方法

供体、后代和受体同时扩增, 反应体系为 10 μ l

10 \times 缓冲液 1 μ l, MgCl₂ (25mM) 1 μ l, dNTPs (dATP dTTP dCTP dGTP 各 200 μ M) 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 (4units μ l) 0.25 μ l, 随机引物 1 μ l, 模板 DNA (25ng μ l) 1 μ l, 超纯水 4.75 μ l。

2.3 RAPD 扩增程序:

反应仪器美国 PE 公司生产的 DNA Thermal Cycler 480

95 $^{\circ}$ C 预变性 2.5 分钟;

94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 35 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 进行 40 个循环;

72 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟; 4 $^{\circ}$ C 保温^[16-17]。

2.4 电泳检测

反应完成后, 向反应管中加入 2.0 μ l 6 \times 的溴酚蓝, 1.4% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 在紫外检测仪上观察, 照相^[15]。

结果与讨论

1 模板 DNA 的检测

模板 DNA 经检测,符合 RAPD 实验要求 (图 1).

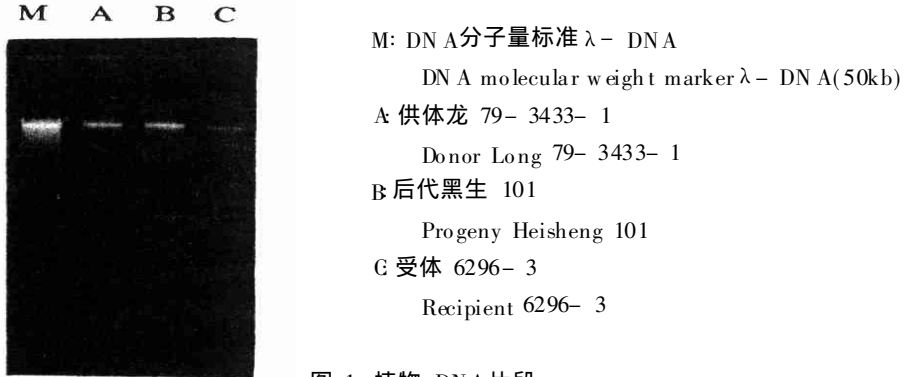


图 1 植物 DNA 片段

Fig. 1 Fragments of plant DN A

2 RAPD 扩增结果

共用随机引物 132 个,其中扩增产物完全相同的引物有 129 个,扩增产物存在稳定差异的引物有 3 个,占所用引物的 2.27%,它们分别是 O PB₇, O PB₈, O PC₈. 引物 O PB₇的扩增产物在 700bp 处黑生 101 扩增出一条与供体相同,而受体没有的特异性带,在 920bp 处黑生 101 出现一条供体和受体都没有的带,另外 O PB₇的扩增产物中在 650bp 处供体和受体的亮度一致,而黑生 101 明显弱于供体和受体 (图 3- 1),这与我们对另一组野生大豆导入栽培大豆的分子验证结果极其相似^[5];引物 O PB₈在 480bp 处黑生 101 出现一条供体具有而受体没有的带 (图 3- 2);引物 O PC₈的扩增产物中,黑生 101 在 1300bp 1200bp 出现两条与供体相同,而受体没有的特异性带;该引物的扩增产物中供体与黑生 101 基本相同,而受体扩增谱带均处于两者之间,受体的 1420bp 920bp 800bp 这三条带

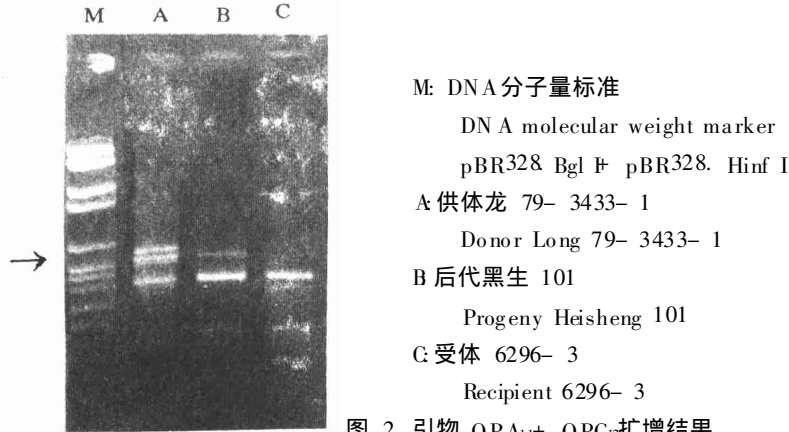


图 2 引物 OPA₁₁+ OPC₁₂ 扩增结果

Fig. 2 RAPD products amplified by primer OPA₁₁+ OPC₁₂

Marker 片段长度 Marker fragments length

2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154bp

引物序列 Primer sequence

OPA₁₁ 5'-CAATCGCCGT-3', OPC₁₂ 5'-TGTCATCCCC-3'

分处于供体与后代的 1440bp 和 1400bp 950bp 和 910bp 910bp 和 700bp 之间 (图 3-3); 双引物 OPA₁₁+OPC₁₂ 在 530bp 左右, 黑生 101 具有一条与供体相同, 而受体没有的带 (图 2)。在双引物 OPC₁₂+POC₁₃ 和扩增产物中, 1500bp 处黑生 101 具有一条与供体相同, 而受体没有的片段, 在 1300bp 左右黑生 101 具有一条与受体相同, 而供体没有的带 (图 4)

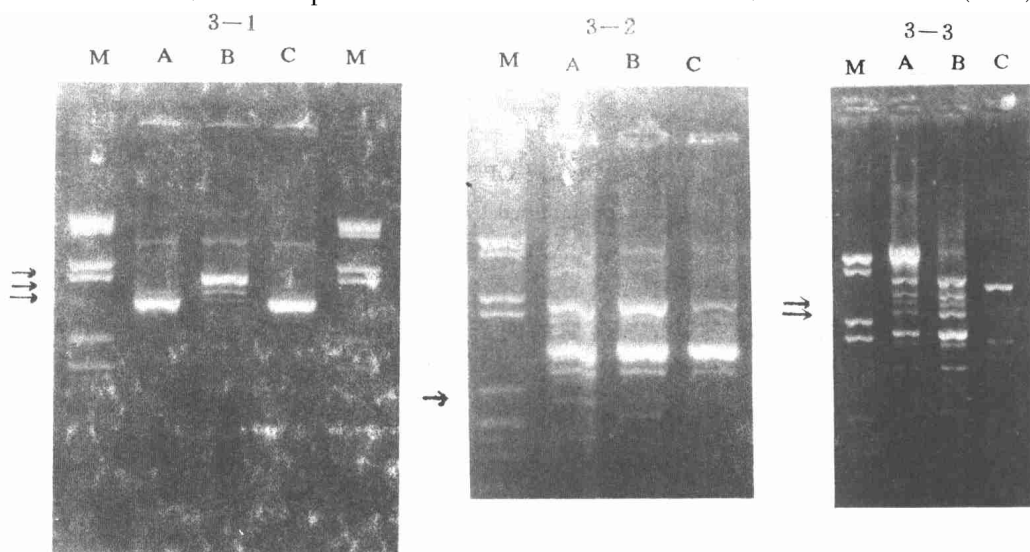


图 3 引物 OPB₀₇, OPB₁₈, OPC₀₈ 的 RAPD 扩增结果

Fig. 3 RAPD products amplified by primer OPB₀₇, OPB₁₈ and OPC₀₈

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker: pBR322. Hinf I, pBR322. BstNI

片段长度 Fragments length 1857, 1633, 1058, 929, 517, 506, 396, 344, 298bp.

A 供体龙 79-3433-1 Donor Long 79-3433-1

B 后代黑生 101 Progeny Heisheng 101

C 受体 6296-3 Recipient 6296-3

3-1 引物 OPB₀₇ 扩增结果, 引物序列 5'-GGTGACGCAG-3'

RAPD products amplified by primer OPB₀₇, Primer sequence 5'-GGTGACGCAG-3'

3-2 引物 OPB₁₈ 扩增结果, 引物序列 5'-CCACAGCAGT-3'

RAPD products amplified by primer OPB₁₈, Primer sequence 5'-CCACAGCAGT-3'

3-3 引物 OPC₀₈ 扩增结果, 引物序列 5'-TGGACCGGTG-3'

RAPD products amplified by primer OPC₀₈, Primer sequence 5'-TGGACCGGTG-3'

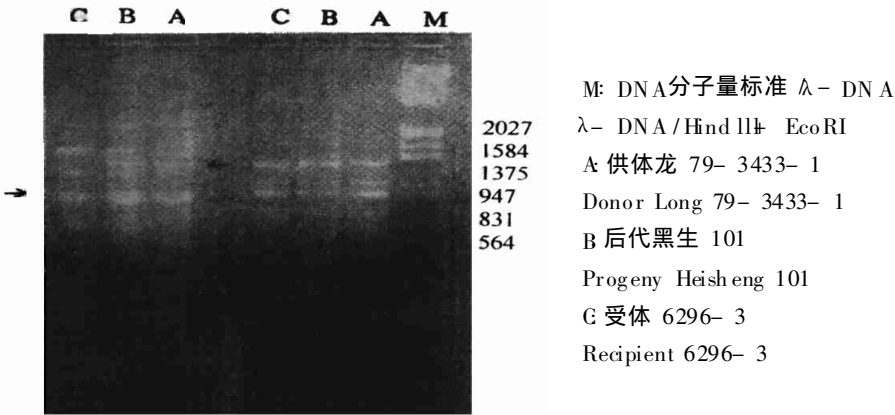


图 4 引物 OPC₀₄+ OPC₅扩增结果

Fig. 4 RAPD products amplified by primer OPC₀₄+ OPC₅

引物序列 Primer Sequence: OPC₀₄5'- CCGCATCTAC- 3', OPC₅5'- GACGGATCAG- 3'

3 分析与讨论

3.1 半野生大豆和栽培大豆是大豆属的两个不同种,但在遗传进化上具有很大的同源性,我们 RAPD 扩增产物绝大多数相同,恰好说明了这一点。但它们毕竟是两个不同的种,基因组必然存在一定的差异,所以 RAPD 扩增产物中,半野生大豆和栽培大豆各有其特异性的 DNA 多态性片段。

3.2 我们采用 RAPD 技术进行大豆新品种黑生 101 的分子验证,目的是为了证明供体 DNA 片段可以通过花粉管通道进入受体基因组。从对黑生 101 RAPD 分析产生的 DNA 多态性情况看,无论是使用单一的引物或两个随机引物组合起来,均可扩增出 DNA 多态性片段,有的在后代中出现供体特异性带;有的出现供体和受体都没有的带;有的后代和供体带型基本相同,而受体带处于其谱带之间;双引物扩增产物中,在两个不同片段大小位置,后代分别具有一条与供体和受体相同的带等等。综合这些多态性出现的概率,后代中出现供体具有而受体没有的特异带的频率最高。这可以说明供体 DNA 片段能够通过花粉管通道进入受体,并通过各种方式对受体基因组产生影响^[18]。

供体 DNA 片段进入受体后,可能发生遗传重组,破坏某些引物的结合位点,或者插入某两个引物结合位点之间,或发生 DNA 片段的置换,或由于 DNA 片段的重组产生了新的引物结合位点,亦或是由于供体 DNA 片段的进入,影响了受体基因组中某个或某几个基因的结构及表达,以致使后代发生变化,在 RAPD 扩增产物中出现多态性。

由此,我们认为黑生 101 的确是半野生大豆龙 79- 3433- 1 导入栽培大豆 6296- 3 所获的转化后代,同时也从分子水平上探讨陈述了花粉管通道技术是植物基因转移的一种方法。

参 考 文 献

- [1] 刘广阳等, 1996, 大豆科学, 15(4): 353– 356
- [2] 钱华等, 1997, 现代日用科学, (2): 40
- [3] 黄骏麒等, 1986, 中国农业科学, (2): 16– 20
- [4] 段晓岚等, 1985, 中国农业科学, (4): 6– 10
- [5] 雷勃钧等, 1994, 中国科学 B 辑, 24(6): 596– 601
- [6] K. M. Devos and M. D. Gale, 1992, Theor Appl Genet, (84): 567– 572
- [7] Scott V. Tingey et al., 1993, Plant Physiol., (101): 349– 352
- [8] L. Hartl et al., 1995, Theor Appl Genet, (90): 601– 606
- [9] M. S. Iqbal et al., 1997, Theor Appl Genet, (94): 139– 144
- [10] 惠东威等, 1992, 生物工程进展, 12(6): 1– 5
- [11] 李希臣等, 1994, 大豆科学, 13(2): 153– 156
- [12] 鲍晓明等, 1993, 遗传学报, 20(1): 81– 87
- [13] 陈永强等, 1979, 遗传, (1): 39– 40
- [14] 王树林等, 1989, 中国油料, (2): 63– 65
- [15] 李希臣等, 1994, 生物技术, 4(3): 39– 41
- [16] J. Graham et al., 1996, Theor Appl Genet, (93): 402– 406
- [17] Bojha kump et al., 1996, Plant Science, (114): 149– 158
- [18] 孟安明, 1993, 生物工程进展, 14(3): 46– 48

RAPD VERIFICATION OF THE SOYBEAN CULTIVAR "HEISHENG 101"

Li Xichen Lei Bojun Lu Cuihua Qian Hua
Zhou Sijun Han Yuqin Liu Zhaojun

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

Abstract

Heisheng 101 was the first soybean cultivar obtained from pollen tube channel. We used RAPD to amplify the total DNA of Heisheng 101 and its donor and recipient by 132 random primers. The DNA polymorphism results of RAPD molecular verification indicated: Either 3 single random primer or 2 double primers combinations can be amplified polymorphic DNA fragments from Heisheng 101. The results proved that Heisheng 101 was truly obtained from the transformation progeny of its donor DNA fragments introduced into recipient.

Key words Soybean; Heisheng 101; RAPD; Molecular verification; Pollen tube channel