

广谱抗病基因 *chi* 和 *hrpZpsta* 双价表达载体的构建及其在大豆中的遗传转化

卢实, 王丕武, 曲静, 马建, 张卓, 吴楠, 才源

(吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118)

摘要:大豆的真菌性病害已经成为了限制大豆产量增长及品质提高的主要原因,利用基因工程技术培育出具有广谱性抗病能力的大豆新品种,已成为目前提高大豆抗性的有效途径之一。本研究构建了含2种广谱抗病基因 *chi* 和 *hrpZpsta* 的双价植物表达载体,利用农杆菌介导技术导入大豆中,获得了能够在转录水平上表达2种外源抗病性基因的转基因大豆。对经抗性筛选得到的阳性苗及后代植株进行PCR检测、Southern杂交、荧光定量PCR检测,共得到T₀代阳性植株7株,T₁代阳性植株27株。转化植株的基因组在整合外源基因时出现不同情况,*chi*-*hrpZpsta*双价载体分别以单价和双价两种形式随机整合到受体大豆基因组中并且能稳定遗传,同时在转录水平上亦有不同。

关键词:大豆;*chi*-*hrpZpsta*双价载体;Southern杂交;荧光定量PCR

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0026

Construction of Bivalent Plant Expression Vector with Two Broad - Spectrum Disease Resistance Genes *chi* and *hrpZpsta* and Transformation into Soybean

LU Shi, WANG Pi-wu, QU Jing, MA Jian, ZHANG Zhuo, WU Nan, CAI Yuan

(Agronomy College of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Soybean fungus disease has become the main cause that limited soybean yield increasing and quality enhancement, one of the effective ways to enhance the resistance of soybean is using genetic engineering technology to cultivate soybean varieties with broad - spectrum disease resistance. In this research, two broad - spectrum disease resistance genes were built into bivalent plant expression vector, imported into soybeans by *Agrobacterium* - mediated method, and obtained transgenic soybeans with gene expression at the transcriptional level. After PCR, southern blot analysis and Q - PCR detection on resistant positive plants and their offspring, 7 T₀ positive plants and 27 T₁ positive plants were obtained. Different situation occurred when exogenous gene integrated with transformation of plant genome, *chi* - *hrpZpsta* bivalent expression vector in the form of monovalent and bivalent random integrated into the recipient soybean genome and could be genetic stabilized, meanwhile at the transcriptional level were different as well.

Keywords: Soybean; *chi* - *hrpZpsta* bivalent vector; Southern blot; Q - PCR

大豆所包含的营养成分种类比较完全,含量也很丰富,其籽粒蛋白质含量一般为35%~40%,脂肪含量为15%~25%。但在生产过程中,诸多真菌性病害限制了大豆产量与品质的提升^[1]。以大豆灰斑病为例,一般可减产5%~10%,严重时可减产30%~50%,蛋白质和油分含量均有不同程度的降低,该病害尤其对东北三省危害最为严重^[2,3]。此外,如大豆锈病、大豆霜霉病等都是限制大豆产量的主要因素,以上各病害在大豆各生育时期均有发生,且都由真菌性病原菌所致。因此,培育具有广谱抗真菌病害能力的品种是目前大豆育种工作的重要目标。

在生物育种的研究过程中,对于单个基因在植物中的遗传转化取得了一定成果,但由于单基因表

达的抗性单一,真菌种类繁多以及真菌生理小种变异等原因,要想选育广谱真菌病害抗性或对某病害有较完整抗性的植物新品种,就必须尝试导入多个广谱抗性基因。

目前,在植株分子育种中重要的抗病基因有几丁质酶基因、*hrpZpsta*基因、 β 1,3-葡聚糖酶基因等,其中,几丁质酶(Chitinase, *chi*)是植物在受到外界胁迫条件下产生的一种防御蛋白,能降解真菌细胞壁的主要成分几丁质。当植物受到病原真菌侵染后,植物体内几丁质酶活性会迅速升高,降解病原菌的细胞壁,从而导致真菌病原菌死亡。因此,学术界普遍认为几丁质酶与植物对真菌病原微生物的抗性有关^[4,5]。*hrpZpsta*基因能够编码出harpin蛋白,harpin蛋白通过引起植物本身过敏反应而使受感染

收稿日期:2014-03-16

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-004)。

第一作者简介:卢实(1988-),男,硕士,主要从事生物技术与作物遗传育种的研究。E-mail:lu10_2008@163.com。

通讯作者:王丕武(1958-),男,博士,教授,主要从事生物技术与作物遗传育种的研究。E-mail:peiww@163.com。

组织细胞坏死,从而封锁致病菌,以避免植物其他组织遭到破坏,也是一种保护植物免受病原菌侵害的有效途径^[6,7]。

本试验选择这两种在提高植物对抗病原菌侵害方面功能不同的广谱抗性基因构建了双价表达载体 pCAMBIA3301 - *chi* - *hrpZpsta*,以期利用生物工程技术培育出具有广谱抗真菌病害能力更强的大豆品种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 受体大豆品种吉农 28,由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

1.1.2 载体及工程菌 植物表达载体 pCAMBIA3301、大肠杆菌 DH5 α 菌株、根癌农杆菌 EHA105 菌株,均由吉林农业大学植物生物技术中心实验室保存。

1.1.3 引物 寡聚核苷酸引物由北京三博远志公司合成,为了便于定向克隆和载体构建,在 P1, P2 上游引物和下游引物的 5'端分别引入相应的酶切位点:*Xba* I, *Sac* I。

P1:5'-ATGCAG AGT CTC AGT CTT AAC -3'

P2:5'-TCACCA TTG GAA TTG CTG TTG -3'

P3:5'-ATG CAG AGT CTC AGT CTT AAC -3'

P4:5'-TCA CCA TTG GAA TTG CTG TTG -3'

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *chi* 的克隆与序列分析 本试验中 *chi* 基因为吉林省农业科学院大豆中心提供的菜豆几丁质酶基因,利用 Premier 5.0 软件合成该目的基因的上下游引物,用 PCR 方法获得特异扩增片段,*chi* 基因的扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,51 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min,30 个循环,对扩增后的目的条带进行回收并测序。

1.2.2 重组植物表达载体 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* - *chi* 的构建及鉴定 选用本实验室已构建好的 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* 作为基础植物表达载体,其中 *hrpZpsta* 基因由吉林农业大学农学院病理教研室高洁提供^[8],利用双酶切法对 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* 基础载体和目的基因 *chi* 的 PCR 产物进行重组构建。再利用限制性内切酶对重组后的 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* - *chi* 表达载体进行验证。

1.2.3 双价表达载体 *chi* + *hrpZpsta* 在大豆中的遗传转化 采用农杆菌介导法进行双价载体的遗传转化,具体步骤参考张云月等^[9]的方法。

1.2.4 转化植株的分子生物学检测

(1)转化植株的 PCR 检测:提取农杆菌介导法所得到的转化植株基因组并以此为模板,分别利用

1.1.3 中引物对 2 种外源基因进行 PCR 检测,未经转化的受体植株为阴性对照,以表达载体 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* - *chi* 质粒 DNA 作为阳性对照,以检测外源基因在植物基因组中的有无。

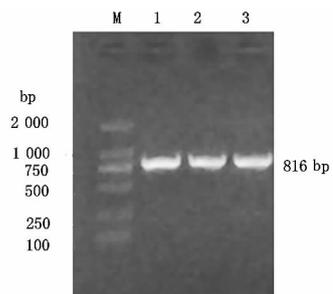
(2) Southern blot 检测:大量提取经 PCR 检测呈阳性的转化植株基因组 DNA,按照 Roche 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 操作步骤对基因组进行操作,验证 2 种基因在转化植物全基因组中的整合情况^[10]。

(3) 荧光定量 PCR 检测:分别选取 T₁ 代 *chi*, *hrpZpsta* 基因单价及双价阳性植株进行外源基因表达的实时荧光定量 PCR 检测。选择大豆内源的 β -*actin* 基因为内参基因,设定其表达量为 1,试验结果由 2^{- Δ Ct}法分析^[11-12],检测外源基因在转录水平上的表达量,数据 2 次重复取平均值。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与序列分析

以含有 *chi* 基因的克隆载体 PMD - 18T - *chi* 为模板,利用所设计的 *chi* 基因特异引物 P1, P2 对目的基因 *chi* 进行 PCR 扩增,用 0.8% 的琼脂糖凝胶对扩增结果进行电泳检测,所得结果如图 1 所示。



M: DNA Marker DL2000; 1,2,3:*chi* 基因。

M: DNA Marker DL2000; 1,2,3:*chi* gene.

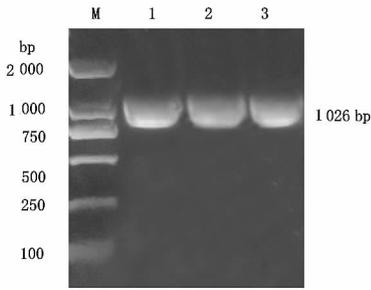
图 1 克隆载体中 *chi* 基因 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of *chi* gene in cloning vector

从图 1 中可以看出,目的基因 *chi* 克隆产物的泳道在 816 bp 处产生了明显的条带,将目的条带回收并测序,测序结果显示,与吉林省农业科学院大豆中心提供的菜豆几丁质酶基因同源性为 100%,说明目的基因 *chi* 已成功获得克隆。

2.2 重组植物表达载体的构建及验证

2.2.1 重组表达载体 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* - *chi* 的构建 在植物表达载体 pCAMBIA3301 - *hrpZpsta* 为基础载体(*hrpZpsta* 基因 PCR 扩增见图 2),利用双酶切法将 PCR 扩增出的 *chi* 基因片段插入到启动子 CaMV35S 下游,构建成以除草剂草丁膦抗性基因为筛选标记的重组植物表达载体,经改造后的表达载体 T - DNA 区域如图 3 所示。



M: DNA Marker DL2000; 1~3: *hrpZpsta* 基因。
M: DNA Marker DL2000; 1~3: *hrpZpsta* gene.

图2 基础载体中 *hrpZpsta* 基因 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of *hrpZpsta* gene in fundamental vector

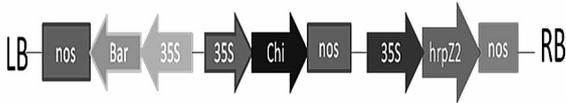
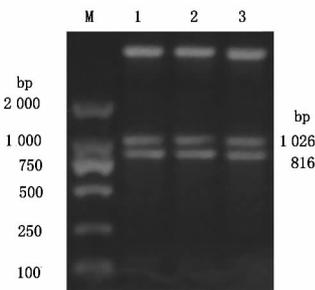


图3 重组植物表达载体

pCambia1301 - *Chi* - *hrpZpsta* 结构图

Fig. 3 Structure diagram of T-DNA region in the recombinant vector pCambia 3301 - *Chi* - *hrpZpsta*

2.2.2 重组表达载体 pCambia3301 - *hrpZpsta* - *chi* 的验证 对所构建的植物表达载体进行酶切鉴定(图4),以 pCambia3301 - *chi* - *hrpZpsta* 质粒为模板,利用 *Xba* I, *Sac* I, *Bgl* II, *BstE* II 4 种限制性内切酶进行酶切后,2 条目的基因条带分别位于 816 和 1 026 bp,与图 1,图 2 所示 2 种目的基因的 PCR 条带完全一致,因而可以充分说明 pCambia 3301 - *hrpZpsta* - *chi* 双价表达载体构建成功。



M: DNA Marker DL2000; 1~3: *chi* - *hrpZpsta* 酶切产物。

M: DNA Marker DL2000; 1~3: Restriction enzyme analysis of *chi* - *hrpZpsta* gene.

图4 双价基因 *chi* - *hrpZpsta* 酶切产物

Fig. 4 Restriction enzyme analysis of *chi* - *hrpZpsta* gene

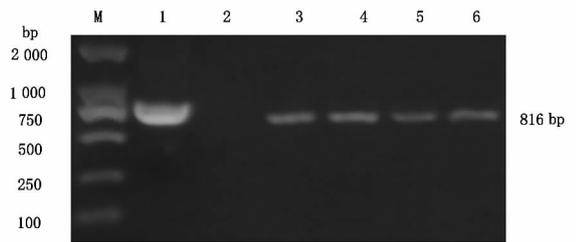
2.3 双价植物表达载体 *chi* + *hrpZpsta* 在大豆中的遗传转化

以大豆品种吉农 28 的子叶节为受体,利用农杆菌介导法进行重组植物表达载体的遗传转化,获得一批抗性植株。转化的外植体在含有草丁膦除草剂

浓度为 100 mmol · L⁻¹ 的筛选培养基中培养 30 d 左右,就可观察到有丛生芽长出。最终通过农杆菌介导的大豆子叶节转化法,获得经 PCR 检测为阳性的 T₀ 代植株 7 株, T₁ 代植株 27 株。

2.4 转化植株的分子生物学检测

2.4.1 转化植株的 PCR 检测 提取 T₀ 代转化植株基因组 DNA 作为模板,利用 1.1.3 中 P1, P2 和 P3, P4 两对引物进行 PCR 验证,结果表明, T₀ 代 PCR 共检测出 7 株阳性植株,其中包括 4 株为 *chi* 基因阳性,另外 3 株为 *chi* 和 *hrpZpsta* 基因共阳性(图 5 和图 6),初步判定外源基因已转化至受体品种中,且分为单价和双价两种整合形式。

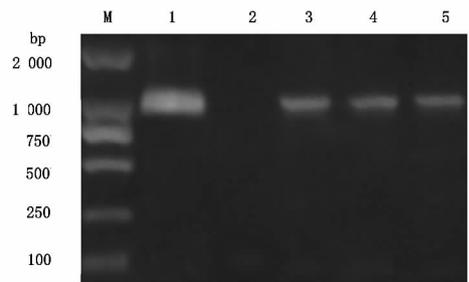


M: 标注 DNA DL2000; 1: 阳性对照; 2: 阴性受体对照; 3~6: 转基因植株。

M: DNA Marker DL2000; 1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3~6: Transgenic plants.

图5 T₀ 代阳性植株 *chi* 基因 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR detection of T₀ transgenic plants with *chi* gene



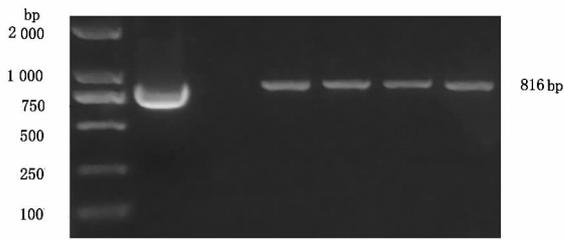
M: 标注 DNA DL2000; 1: 阳性对照; 2: 阴性受体对照; 3~5: 转基因植株。

M: DNA Marker DL2000; 1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3~5: Transgenic plants.

图6 T₀ 代 *hrpZpsta* 基因 PCR 检测结果

Fig. 6 PCR detection of T₀ transgenic plants with *hrpZpsta* gene

T₁ 代 PCR 共检测出 27 株阳性植株,其中 15 株 *chi* 基因阳性,12 株为 *chi* 基因和 *hrpZpsta* 双价基因共阳性(图 6,图 7)。外源双价抗病基因已成功转化至受体品种基因组中,并在世代间遗传稳定。

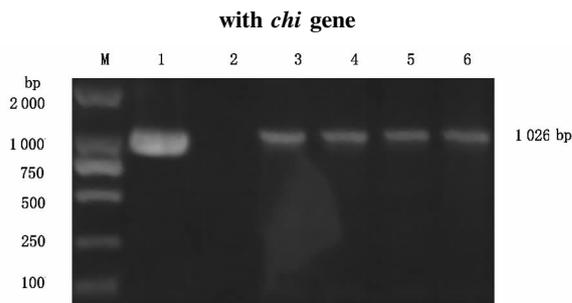


M: 标注 DNA DL2000; 1: 阳性对照; 2: 阴性受体对照; 3~6: 转基因植株。

M. DNA Marker DL2000; 1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3-6: Transgenic plants.

图 7 T₁ 代阳性植株 *chi* 基因 PCR 检测结果

Fig. 7 PCR detection of T₁ transgenic plants



M: 标注 DNA DL2000; 1: 阳性对照; 2: 阴性受体对照; 3~6: 转基因植株。

M. DNA Marker DL2000; 1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3-6: Transgenic plants.

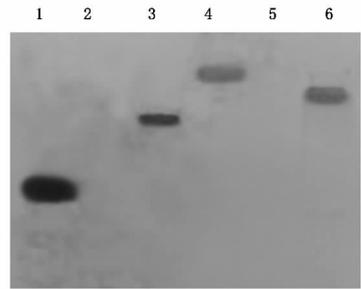
图 8 T₁ 代阳性植株 *hrpZpsta* 基因 PCR 检测结果

Fig. 8 PCR detection of T₁ transgenic plants

with *hrpZpsta* gene

2.4.2 转化植株的 Southern blot 检测 选择经 PCR 初步检测呈阳性的部分 T₁ 代转基因植株并大量提取其高纯度基因组 DNA, 同时以重组双价表达载体 pCAMBIA3301-*chi*-*hrpZpsta* 质粒作阳性对照, 以未转化的受体大豆品种吉农 28 植株基因组作为阴性对照, 利用限制性内切酶 *Hind* III 对 DNA 进行单酶切, 通过 Southern blot 检测双价抗病基因在受体植株基因组中的整合情况, 图 9 表明, 第 1, 3, 4, 6 号泳道均有明显的杂交信号产生, 是整合水平上检测呈阳性的植株, 其中第 1 号泳道为阳性重组质粒对照, 第 2 号泳道为阴性受体植株基因组对照, 第 3, 4, 6 号泳道为外源基因整合水平检测出杂交信号的阳性转基因植株, 其中第 3, 4 号泳道为在 PCR 初步检测中 *chi* 单基因阳性的转基因植株, 在进一步整合水平的检测 Southern blot 中出现明显的杂交信号, 而第 6 号泳道为在 PCR 初步检测中 *chi*-*hrpZpsta* 双价基因共阳性的转基因植株, 在进一步整合水平的检测 Southern blot 中出现了杂交信号。图 10

表明, 第 1, 3, 4, 5, 6 号泳道均有杂交信号产生, 其中第 1 号泳道以双价表达载体作为阳性对照, 第 2 号泳道为阴性受体植株基因组对照, 第 3, 4, 5, 6 号泳道为 PCR 初步检测中 *chi*-*hrpZpsta* 双价基因共阳性的转基因植株以 *hrpZpsta* 基因 PCR 回收产物作为探针, 进行 Southern 杂交所得结果, 双价基因杂交结果条带亮度明显, 并且无杂带产生, 并且均为单拷贝形式进行整合。



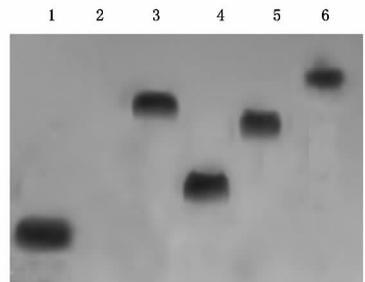
1: 阳性质粒; 2: 阴性受体对照; 3~6: 转化植株。

1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3-6: Transgenic plants.

图 9 *chi* 基因 T₁ 代植株 Southern 杂交检测结果

Fig. 9 Southern blot analysis of transgenic plants

with *hrpZpsta* gene



1: 阳性质粒; 2: 阴性受体对照; 3~6: 转化植株。

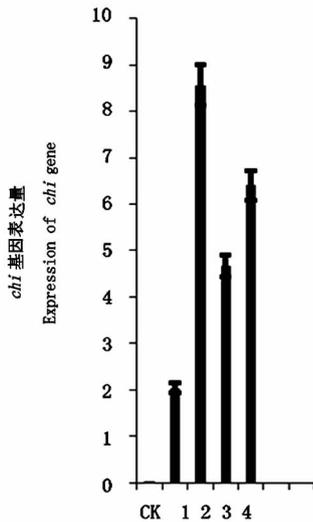
1: Positive control; 2: Non-transformed plant; 3-6: Transgenic plants.

图 10 *hrpZpsta* 基因 T₁ 代植株 Southern 杂交检测结果

Fig. 10 Southern blot analysis of transgenic plants with *hrpZpsta* gene

2.4.3 转化植株的荧光定量 PCR 检测 图 11 是以 *chi* 基因特异引物进行的荧光定量 PCR, 对照组 *chi* 基因的表达量数值几乎为 0, 表示在受体大豆植株中无 *chi* 基因表达, 其中 1, 2 号为单价阳性的植株 *chi* 基因转录水平的表达量, 3, 4 号为双价阳性的植株 *chi* 基因转录水平的表达量。图 12 以 *hrpZpsta* 基因为模板所设计的特异引物进行荧光定量 PCR 的相对表达量的结果, 对照组 *hrpZpsta* 基因的数值几乎为 0, 表示在受体大豆植株中基本无 *hrpZpsta* 基因表达, 而 1~4 号样品是在 *hrpZpsta* 基因在整合

水平上检测均呈阳性的转基因植株,结果表明:*hrpZpsta* 基因在转录水平上的表达量约为 β -*actin* 基因表达量的 0.3 ~ 1.2 倍,均高于对照受体大豆植株。

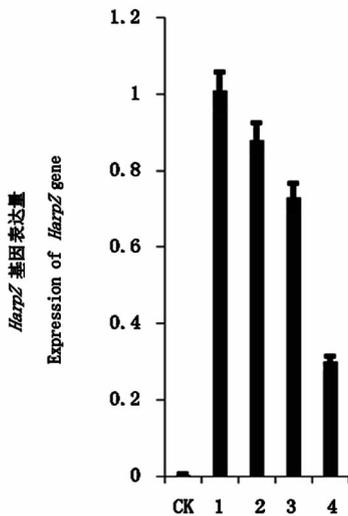


CK: 阴性对照; 1~4: 转基因植株。

CK: Non-transformed plant; 1-4: Transgenic plants.

图 11 *chi* 基因 T₁ 代植株 Q-PCR 检测结果

Fig. 11 Q-PCR detection of T₁ transgenic plants with *chi* gene



CK: 阴性对照; 1~4: 转基因植株。

CK: Non-transformed plant; 1-4: Transgenic plants.

图 12 *hrpZpsta* 基因 T₁ 代植株 Q-PCR 检测结果

Fig. 12 Q-PCR detection of T₁ transgenic plants with *hrpZpsta* gene

谱抗病基因的双价植物表达载体 pCAMBIA3301-*chi*-*hrpZpsta*, 并利用农杆菌介导法技术将两种目的基因成功转入到大豆品种吉农 28 的全基因组 DNA 当中, 分别得到单价和双价插入 PCR 检测呈阳性的 T₀ 代转基因材料 7 株, PCR, Southern blot 和荧光定量 PCR 均呈阳性的 T₁ 代转基因材料 27 株, 初步得到了抗病基因稳定遗传的转化株系。通过对所获得的转化植株进行 PCR 检测, 发现 pCAMBIA3301-*chi*-*hrpZpsta* 载体分别以单价、双价两种方式随机整合到受体植株基因组中。对 T₁ 代转基因大豆植株进行以两种目的基因为探针的 Southern 杂交检测, 均出现了杂交信号, 并且外源基因以单拷贝的形式整合到大豆基因组中, 插入位点不尽相同, 这是因为进行外源基因的遗传转化时, 表达载体中的 T-DNA 区是随机插入到基因组中的。对 T₁ 代植株进行荧光定量 PCR 检测, 表明外源基因能在遗传背景复杂的大豆基因组中转录水平上进行表达。同时检测出外源基因表达量不尽相同, 这是因为外源基因的插入位点是随机的, 插入位点的微环境不同, 可能对载体中 35S 启动子活性产生了不同的影响, 以及转基因植株生长环境不完全一致都会导致表达量不同, 而目的基因的单双价插入对表达量测定无明显差异。

长久以来, 由真菌引起的大豆病害一直是限制大豆产量与品质有效提升的主要因素。自从人们培育出第一例转基因大豆植株以来, 通过多种遗传转化手段获得了丰富的种质新资源, 如抗病害、抗除草剂、抗虫害等, 但多数只是把单个基因转入至受体植株中, 并由于单个基因选择性抑菌以及抗病谱窄等原因, 很难获得效果理想的转基因植株, 尤其是在抗真菌性病害方面, 单个基因的导入对于提高受体大豆品种的抗性贡献十分有限, 因此开发多基因的导入模式对大豆的抗病害分子育种是十分有意义的。随着转基因育种技术的不断发展, 培育大豆抗病新品种的主要手段已经由转化单一基因过渡到转化两种甚至多种抗病性功能基因, 由此得到抗病能力更强, 抗病种类更多的大豆新种质资源。

参考文献

- [1] 姚玉春, 孙志强, 汤剑. 浅谈几种常见大豆病害的防治 [J]. 北京农业, 2011(3): 64-65. (Yao Y C, Sun Z Q, Tang J. Study on several common soybean disease control [J]. Beijing Agriculture, 2011(3): 64-65.)
- [2] 廖琳. 大豆灰斑病研究概况及展望 [J]. 中国农学通报, 1992, 8

3 结论与讨论

本试验构建了同时包含 *chi* 和 *hrpZpsta* 两种广

- (1):6-9. (Liao L. Soybean resistant research work and prospects [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1992,8(1):6-9.)
- [3] 任友科,于保全. 大豆灰斑病研究进展 [J]. 现代农业科技, 2010(3):164-169. (Ren Y K, Yu B Q. Soybean resistant research progress [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(3):164-169.)
- [4] 谢树章,刘亚娟,秦平伟,等. 植物几丁质酶及应用研究进展 [J]. 安徽农学通报,2009,15(8):58-61. (Xie S Z, Liu Y J, Qin P W, et al. Progress on research of plant chitinase and its application [J]. Anhui Agricultural Sciences Bulletin, 2009,15(8):58-61.)
- [5] 于平. 几丁质酶基因及其应用新进展 [J]. 生物学杂志,2004, 21(3):5-7. (Yu P. Advances on chitinase gene and its application [J]. Journal of Biology, 2004,21(3):5-7.)
- [6] Dong H P, Peng J L, Bao Z L, et al. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *arabidopsis* growth and insect defense [J]. Plant Physiology, 2004, 136:3628-3638.
- [7] Wei Z M, Beer S V. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance [J]. Acta Horticulture, 1996, 411:223-225.
- [8] 姜兆远,邹晓威,高洁. 烟草野火病菌 *hrpZpsta* 基因的克隆及蛋白的原核表达 [J]. 吉林农业大学学报,2009,31(6):700-704. (Jiang Z Y, Zou X W, Gao J. Cloning and expression of *hrpZpsta* gene from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2009,31(6):700-704.
- [9] 张云月,付永平,王丕武,等. 转 *hrpZpsta* 抗病基因大豆的研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(9):86-92. (Zhang Y Y, Fu Y P, Wang P W, et al. Study on transforming *hrpZpsta* gene into soybean [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2011,39(9):86-92.
- [10] 刘立鸿,许璐,汪凯,等. 地高辛标记探针 Southern 印迹杂交技术要点及改进 [J]. 生物技术通报,2008(3):57-59. (Liu L H, Xu L, Wang K, et al. The key technological points of Southern blot using dig-labeled DNA probes and improvement [J]. Biotechnology Bulletin, 2008(3):57-59.)
- [11] 陈旭,齐凤坤,康立功,等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. 东北农业大学学报,2010(8):148-155. (Chen X, Qi F K, Kang L G, et al. Advance and application of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010,41(8):148-155.)
- [12] 朱捷,杨成君,王军. 荧光定量 PCR 技术及其在科研中的应用 [J]. 生物技术通报,2009(2):73-76. (Zhu J, Yang C J, Wang J. Real-time fluorescent quantitative PCR and application in scientific research [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(2):73-76.)

(上接第 8 页)

- [17] 刘春,王显生,张占琴,等. 大豆种子贮藏蛋白亚基含量变异种质的筛选与创制 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(3):249-255. (Liu C, Wang X S, Zhang Z Q, et al. Screening and creation of content variations of soybean seed storage protein subunits [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2008, 34(3):249-255.)
- [18] 姜振峰,赫卫,汪洋,等. 大豆种子 7S、11S 球蛋白及 7S 球蛋白亚基的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2007, 29:32-35. (Jiang Z F, Hao W, Wang Y, et al. Study on 7S, 11S globulin and subunits of 7S globulin of soybean seed [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29:32-35.)
- [19] 宋波,蓝岚,田福东,等. 大豆 7S 球蛋白 α 亚基缺失及 (α' + α) 亚基双缺失品系的回交转育 [J]. 作物学报, 2012, 38: 2297-2305. (Song B, Lan L, Tian F D, et al. Development of soybean lines with α' -subunit or ($\alpha'+\alpha$)-subunits deficiency in 7S globulin by backcrossing [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38: 2297-2305.)
- [20] 刘珊珊,滕卫丽,姜自芹,等. 大豆 7S 球蛋白 α 亚基缺失型种质创新 [J]. 作物学报, 2010, 36(8):1409-1413. (Liu S S, Teng W L, Jiang Z Q, et al. Development of soybean germplasm lacking of 7S globulin α -subunit [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(8):1409-1413.)
- [21] 刘珊珊,葛玉君,武小霞,等. 大豆 7S 球蛋白 ($\alpha+\beta$) 亚基双缺失体遗传特征分析 [J]. 作物杂志, 2008(4):61-63. (Liu S S, Ge Y J, Wu X X, et al. Subunit composition diversity in progenies segregated from 7S globulin ($\alpha+\beta$)-null soybean mutant [J]. Crops, 2008(4):61-63.)
- [22] Hayashi M, Nishioka M, Kitamura K, et al. Identification of AFLP markers tightly linked to the gene for deficiency of the 7S globulin in soybean seed and characterization of abnormal phenotypes involved in the mutation [J]. Breeding Science, 2000, 50: 123-129.
- [23] 黄丽华,麻浩,王显生,等. 大豆种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组分的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(3):20-23. (Huang L H, Ma H, Wang X S, et al. Study on 11S and 7S fractions of seed storage protein in soybean seeds [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(3):20-23.)
- [24] Badley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1975, 412(2):214-228.
- [25] 陈海敏,华欲飞. 品种差异对大豆功能性的影响 [J]. 中国油脂, 2000, 25(6):178-180. (Chen H M, Hua Y F. Effects of various cultivars on functionalities of soy protein [J]. China Oils and Fats, 2000, 25(6):178-180.)
- [26] 盖钧镒. 大豆加工业的发展及其对大豆品质的要求 [J]. 农产品加工, 2008(7):4-7. (Gai J Y. Development of soybean processing industry and its requirements on quality of soybean [J]. Agriculture Products Processing, 2008(7):4-7.)