

# 导入大豆的外源 DN A同工酶鉴定<sup>\*</sup>

刘昭军 雷勃钧 卢翠华 韩玉琴 李希臣 周思君 钱 华

(黑龙江省农科院生物技术研究中心)

**摘要** 本文采用双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法对海豆、虎林绿草豆的外源总 DN A导入后代用过氧化物同工酶酶谱的差异分析,结果表明:酶谱清晰,供体受体及后代在谱带上存在着差异及相关特性。从生化角度揭示了其遗传背景相关性,证明外源 DN A已经导入受体,并得到整合、表达。

**关键词** 外源总 DN A 过氧化物同工酶 酶谱分析

**中图分类号** S565. 103. 53

同工酶作为农作物的遗传标记,从生化角度揭示了基因结构、功能之间的差异,是育种选择过程的一种辅助手段<sup>[1]</sup>。通过同工酶标记可以选择出与其连锁的目的性状。本文是对利用花粉管通道技术进行外源总 DN A直接导入大豆引起的变异后代进行过氧化物同工酶的酶谱分析;从遗传学角度验证外源总 DN A导入的可能性,为大豆的基因转移及植物分子育种提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1. 1 试验材料

供试材料有供体为虎林绿草豆(缺少供体海豆材料),受体为合丰 25及导入变异后代共 16份(见表)。

表 供试材料

编号	组合	材料	编号	组合	材料	编号	组合	材料	编号	组合	材料
1	受体	合丰 25	5	后代 D9406	330- 1	9	后代 D9406	336- 混	13	后代 D9407	340- 1
2	后代 D9406	321- 1	6	后代 D9406	331- 1	10	受体	合丰 25	14	后代 D9407	341- 混
3	后代 D9406	328- 1	7	后代 D9406	335- 1	11	供体	虎林绿草豆	15	后代 D9407	342- 2
4	后代 D9406	329- 1	8	后代 D9406	336- 1	12	后代 D9407	339- 混	16	后代 D9407	344- 1

### 1. 2 试验方法

**酶样品的制备:**选取均一的大豆种子,洗净,用温水浸润后将材料置于玻璃平皿中,27℃温箱中发芽。每份材料取芽最幼嫩部分 1g,加研磨缓冲液 2ml,研磨后,5 000 RPM,离心 20分钟,吸取上清液于冰箱中冷冻备用。

**电泳:**采用双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[2-3]</sup>。上层浓缩胶浓度 2. 5%,下层分离胶浓度 7. 5%。每板 25个进样孔,每孔上样 60μ l,电泳时,浓缩胶中电流 30mA,分离胶中电流 20mA,电泳 4小时。电泳在 4℃冰箱中完成。

**凝胶染色:**电泳结束后,将凝胶洗净置于染色盘中,倒入染色液(成分为:醋酸联苯胺,3%

<sup>\*</sup> 收稿日期 1999- 04- 23  
©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.

$\text{H}_2\text{O}_2$ )  $30^\circ\text{C}$  水浴上染色 20 分钟左右,待褐色谱带出现后,用清水冲净染色液,照相,绘制酶谱草图,并测量迁移距离,根据下式计算谱带相对迁移率的  $R_f$  值:

$$R_f = \frac{\text{谱带迁移距离}}{\text{前沿指示剂迁移距离}}$$

## 2 结果与讨论

染色结果谱带清晰,材料间谱带差异显著(见图)。

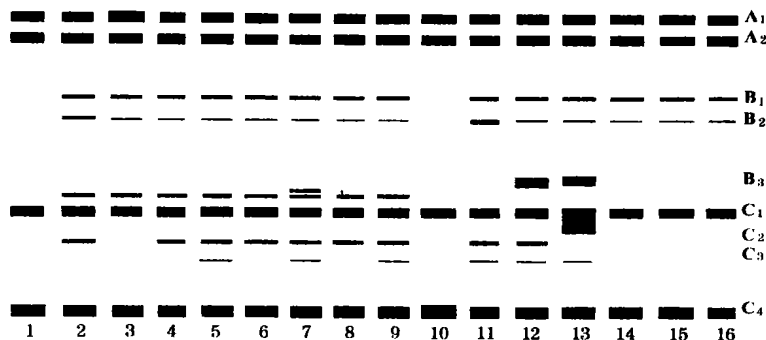


图 大豆过氧化物同工酶酶谱示意图

由图可以归纳出以下几点:

2.1 两个组合材料按聚丙烯酰胺凝胶电泳下的相对迁移率及酶带宽度分为 A B C 三个区, A 区两条酶带迁移率的  $R_f$  值分别为 0.06 0.17, B 区三条谱带迁移率分别为 0.25 0.32 0.41, C 区四条酶带迁移率分别为 0.44 0.52 0.57 0.63。由 POD 同工酶酶谱可以看出合丰 25(材料 10)种子的 POD 同工酶酶带有四条 ( $A^1$   $A^2$   $C^1$   $C^4$ ), 导入后代中除具有受体合丰 25 的四条主带外, 还出现了  $B^1$   $B^2$   $B^3$   $C^2$   $C^3$  等几条相对较弱的新型带。

2.2 供体、受体及后代都有共同的谱带  $A^1$   $A^2$   $C^1$   $C^4$ , 不同之处是谱带的深浅程度、宽度的不同, 共性带反映出大豆种的专一性及同源性。

2.3 供体、受体材料谱带之间差异很大, 反映出远缘材料间基因型的差异。

2.4 导入后代材料谱带差异比较明显, 弱带上有明显的增减如材料 3 缺失  $C^2$   $C^3$  谱带, 材料 2 4 6 8 缺失  $C^3$  谱带, 有的谱带颜色宽度差异很大, 如材料 11 12 13 14。

2.5 两个组合的变异后代材料都具有  $B^1$   $B^2$  两条谱带, 可以推测这些变异材料在某些性状上变异的相同之处。

利用花粉管通道技术, 将外源 DNA 直接导入作物, 进行分子育种, 可以丰富遗传基础, 扩大变异类型, 将常规育种中难以利用的远缘材料的遗传物质转移, 给常规育种提供新的种质, 对于育种工作有实践意义。

从以上的分析中, 后代中含有受体的所有谱带, 有些后代增加了供体及受体所不具有的新型谱带, 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上的变异相吻合, 如海豆导入后代抗旱、抗孢囊线虫病, 子粒变大, 百粒重增加, 茎秆粗壮, 虎林绿草豆的导入后代叶色变深, 叶片加厚, 光合效率增加。这些变异的发生是外源 DNA 导入受体后, 供体受体间遗传物质信息交流产生转化的结果, 外源基因的整合程度, 整合方式不同, 以及整合后, 遗传物质之间的互作, 使受体遗传物质的调控发生变化, 所以就产生了各种方式的变异。酶蛋白是基因表达的产物, 我们研究不同的基因材料中同工酶的变化, 就可以反映出供试材料遗传基础的差别。谱带的增加或减少不能简单的解释为基因的增加或减少, 有些可能是重

复序列引起基因组内部结构的重排而间接影响基因的表达<sup>[4 5]</sup>。

试验中看出: 过氧化物同工酶作为同工酶分析比多酚氧化酶、超氧化物歧化酶及淀粉酶等活性较稳定, 且差异明显。分析结果表明: 供体、受体及后代之间的过氧化物同工酶酶谱之间存在显著差异, 从酶谱差异及外部性状的变化可以推断, 花粉管通道技术可以将外源 DNA 导入受体材料, 并在同工酶酶谱上有所反映, 外源基因进入受体基因组中, 并在一定程度上得到了整合、表达与遗传。

供体、受体与后代之间的分子遗传基础变化, 生化标记 (同工酶) 差异, 与外观性状改变; 三者若能建立起一定的相关性, 则可以大大提高育种过程中选择的效率, 加快育种进程, 使植物分子育种有突飞猛进的发展, 并使同工酶分析技术, 这一简单、有效的方法成为育种过程中的一种有效的辅助手段。

### 参 考 文 献

- 1 卢翠华等. 黑龙江省主要品种同工酶酶谱分析. 大豆科学, 1990, 9( 2): 145~ 148
- 2 卢翠华等. 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, 1995, ( 3): 35~ 36
- 3 袁凤洁. 大豆灰斑病菌生理小种酶谱分析. 东北农业大学硕士学位论文, 1997
- 4 叶华智等. 小麦与禾谷镰刀菌相互作用下病穗过氧化物酶和酯酶的变化. 植物病理学报, 1988, 18( 3): 169~ 174
- 5 Griffin J. D et al. Inheritance and linkage studies with Five Isozyme Loci in Soybean, Crop Sci, 1987, ( 27): 885~ 892

## Identification of Exogenous DNA Introduced into Soybean

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

(Biotechnology Research Center Heilongjiang Academy of Agri. Science)

**Abstract** With the method of Double Vertical Boards Polyacrylamide Gel Electrophoresis, peroxidase isozyme patterns was analysed in variant progenies of soybean received exogenous DNA of Coastal Bean and Hulinlucaodou. The results showed that patterns of POD enzyme were clear, and there were differences and correlation between patterns of donor, receptor and progenies, and also showed their genetic resemblance in biochemistry, and suggested exogenous DNA had been introduced into receptor, and inserted into the genome of the receptor and expressed.

**Key words** Exogenous DNA, Peroxidase isozyme, Pattern analysis