

外源 DNA 导入小麦引起遗传变异的验证^{*}

徐乃瑜 严家骐 武军驻

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

提 要 对由波兰小麦 DNA 注射到普通小麦鄂恩 1 号子房获得的 D₅ 代稳定遗传变异 2 个转化株系的种子醇溶蛋白, 进行单向和双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果表明由外源 DNA 导入获得转化株系的变异, 与其种子醇溶蛋白电泳图谱出现供体的某些组分和缺少受体的某些组分相印证。

关键词 醇溶蛋白, 单向和双向电泳, 外源 DNA 导入, 转化株系

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2000) 05-0351-05

VERIFICATION OF THE GENETIC VARIATION INDUCED BY INTRODUCTION OF EXOGENOUS DNA INTO WHEAT BY USING ELECTROPHORETIC PATTERNS ANALYSIS OF SEED GLIADINS

Xu Naiyu Yan Jiaqi Wu Junzhu

(College of Life Sciences, Wuhan University Wuhan 430072)

Abstract Seed gliadins of the fifth generation (D₅) stably hereditary variant types were obtained by injection of the total DNA of *Triticum polonicum* L. into the ovary of common wheat *Triticum aestivum* E-en-1 and were analyzed by comparison of their one- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic patterns. The results showed that variation of transformation line was obtained by the introduction of exogenous DNA, accompanied with the appearance of some components of donor and the absence of some components of receptor on the electrophoretic patterns of seed gliadins proved each other.

Key words Gliadin, One- and two-dimensional electrophoresis, Introduction of exogenous DNA, Transformation line

生物指纹图谱是能鉴别生物个体间差异的图谱, 这种图谱多态性丰富, 且具有高度的个体特异性和环境稳定性, 因而适用于品种鉴定工作。

作物品种指纹图谱有两类: 一类是蛋白质电泳指纹图谱; 另一类是 DNA 指纹图谱。小麦品种间胚乳醇溶蛋白组成差别很大, 据研究这些差异完全取决于遗传基础, 而不受环

收稿日: 1999-10-12, 修回日: 2000-04-02。第一作者: 女, 1932年生, 教授, 植物遗传专业, 从事小麦分子遗传育种等研究。

^{*} 国家“八·五”科技攻关项目(编号: 85-002-02-03)及湖北省“九·五”农业重大科技项目(编号: 982P0404)资助课题。

境的影响,因而可作为品种的“指纹”^[4~3]。近年来,国内外已将醇溶蛋白电泳分析应用到作物遗传育种和种子生产上,如品种鉴定、种子纯度检验、亲缘关系分析、代换系、易位系和体细胞无性系变异鉴定等方面^[6~6]。然而,鉴于前苏联 ОДИНЦОВА 等^[7]报道:小麦醇溶蛋白 N-端氨基酸序列的同源性高,如 r₁、r₂、r₃ 醇溶蛋白的 N-端氨基酸序列同源性高达 80% 以上,因而推断编码 N-端氨基酸序列相应的碱基序列同源性也必然较高,因此用核酸杂交法鉴定转化株后代的变异是由小麦属种间供体 DNA 引起是比较困难的;所以本研究采用种子醇溶蛋白电泳分析验证外源 DNA 导入小麦引起的遗传变异,并试图为引起的变异寻找一些分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

选用波兰小麦(*Tr. polonicum* L. 作供体)DNA 经子房注射导入鄂恩 1 号(*Tr. aestivum* L. 作受体),D₁ 代出现高抗白粉病,形态等与受体明显不同,而与供体相似,并能稳定遗传的转化株系(91-833 和 91-837)D₅ 代种子,及其供受体种子为材料^[8,9]。

1.2 方法

1.2.1 小麦醇溶蛋白的提取

采用傅宾孝等^[6]的方法略加修改。即取单粒去胚种子在乳钵中磨碎,放入 1.5 mL 离心管中,加 0.1 mL 乙二醇溶液,混匀后在 25℃ 水浴中间隙振荡提取 30 min,10 000 ×g 离心 10 min,取 50 μL 上清液置另一小离心管中,再加 10 μL 内含 0.1% 甲基绿的 0.1% 甲酸溶液,混匀后置 -20℃ 冰箱备用。

1.2.2 单向电泳分析

基本上采用傅宾孝等^[6]的方法,但将分离胶和浓缩胶改成浓度为 17% 的一种凝胶,其中丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺的比例为 20:1。电极缓冲液正、负极仍分别用 0.2% 和 0.1% 的甲酸溶液代替乳酸铝缓冲液。加样量为 25~30 μL,视种子蛋白含量而定,电泳开始时,恒定电压 70 V,待样品进胶 10 min 后,改为 200 V,电泳 5 h。电泳结束后,将凝胶放入 100 mL 内含 40 mg 考马斯亮兰 R-250 的 12% 三氯乙酸溶液中染色过夜,然后在 7% 乙酸中脱色约 24 h 后照相。

1.2.3 双向电泳分析

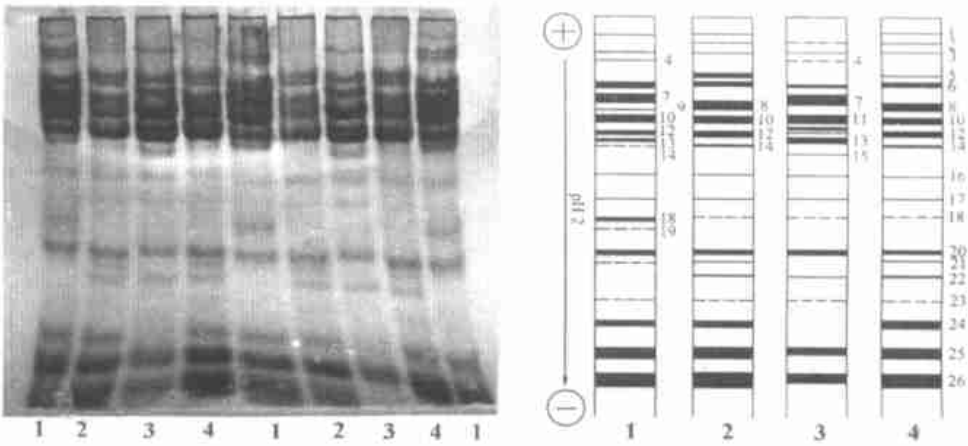
主要参考 Lafianandra 等^[10]的双向(2 种 pH)电泳法,作了部分修改。为了使特异带在进行第二向电泳后仍能清晰可见,将加样量增大一倍;又为了避免第一向电泳前端蛋白带电泳出胶,将电泳时间减至 3.5 h,同样为了使第二向电泳时蛋白带不泳动出胶,将第二向电泳 16 h 的电流由 30 mA 降为 15 mA;染色时间为 24 h。

2 结果与分析

2.1 单向电泳图谱的比较

在胶浓度为 8% 的预备实验中未观察到特异带,而在胶浓度改为 17% 时,借助于分子筛和蛋白电荷不同,才分离到特异带,这表明外源 DNA 的导入能引起新蛋白带的产生。实验结果表明:用作供体的波兰小麦与作受体的普通小麦鄂恩 1 号种子醇溶蛋白的组分

和含量都有明显差异; 由波兰小麦 DNA 导入鄂恩 1 号, 获得能稳定遗传的转化株系 (91-833和91-837) D₅ 代种子的醇溶蛋白组分和含量, 虽然大部分仍与受体鄂恩 1 号相同, 但出现有供体的特有组分(第 22 条谱带), 含量很微和缺失受体鄂恩 1 号特有的组分(第 18 和第 19 条谱带), 以及含量比受体多而供体没有的组分(第 21 条谱带); 此外, 在高分子蛋白的慢带区还可看到转化株系的谱带与迁移率和供受体都有一些差异。而 2 个转化株系的组分均比较相似。结果参见图 1。上述结果与其形态等方面的变异相一致。



1. 鄂恩 1 号(受体); 2. 转化株系(91-833); 3. 波兰小麦(供体); 4. 转化株系(91-837)
1. E-en-1(receptor); 2. T transformation line(91-833)
3. *Triticum polonicum* L. (donor); 4. Transformation line(91-837)

图 1 转化株系与 DNA 供受体种子醇溶蛋白单向电泳图谱的比较

Fig. 1 Comparison of the one dimensional electrophoretic patterns of seed gliadins of wheat DNA donor, receptor and transformation lines

2.2 双向电泳图谱的比较

为了进一步印证转化株系 91-833 和 91-837 种子醇溶蛋白电泳图谱中缺失和存在的一些特异带, 是否与 DNA 供体波兰小麦有关, 我们进行了双向电泳研究。图 2 结果表明:

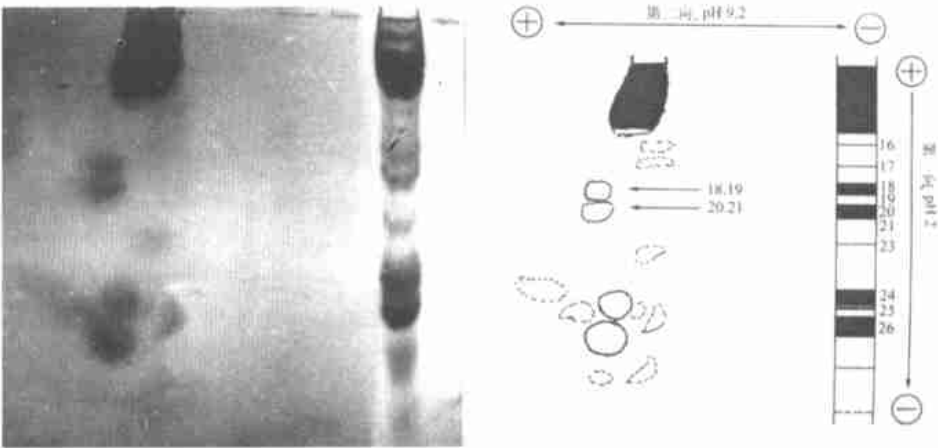


图 2 鄂恩 1 号(受体)种子醇溶蛋白双向电泳图谱

Fig. 2 Two dimensional electrophoretic patterns of seed gliadins of wheat E-en-1(receptor)

即使将受体鄂恩 1 号种子醇溶蛋白的加样量增大一倍, 在第二向电泳图谱中, 仍未见到波兰小麦特有的第 22 条谱带, 该品种特有的第 18 条和第 19 条谱带则可看到; 图 3 结果清楚表明波兰小麦具有特异的第 22 条谱带; 图 4、图 5 表明转化株系 91-833、91-837 同样具有波兰小麦特异的第 22 条谱带和鄂恩 1 号显示的第 21 条弱带。双向电泳的结果与单向电泳的结果相吻合。

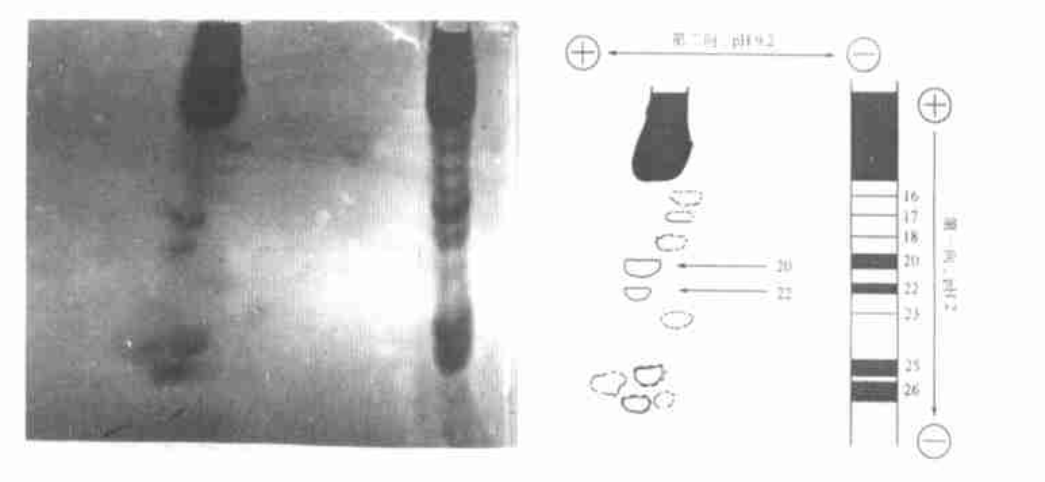


图 3 波兰小麦(供体)种子醇溶蛋白双向电泳图谱

Fig. 3 Two dimensional electrophoretic patterns of seed gliadins of *Triticum polonicum* L. (donor)

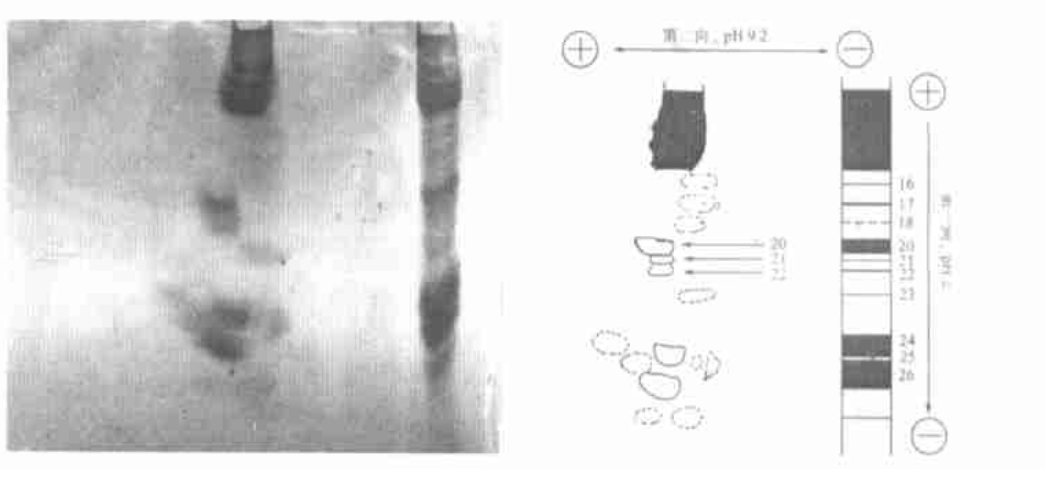


图 4 转化株系 91-833 种子醇溶蛋白双向电泳图谱

Fig. 4 Two dimensional electrophoretic patterns of seed gliadins of wheat transformation line 91-833

3 讨论

本研究结果证明: 由导入外源 DNA 可引起转化株产生新的蛋白质, 其氨基酸组成可能与 DNA 供体的一致或略有差异; 此外, 有较多的谱带仍与受体相同或相似, 如图 1 中的第 24 条带和第 21 条带等; 其原因可能是由于在自花授粉后再导入外源 DNA 的结果。并且由于受精选择性的基础, 导致变异性状在转化株后代能较快得到稳定。

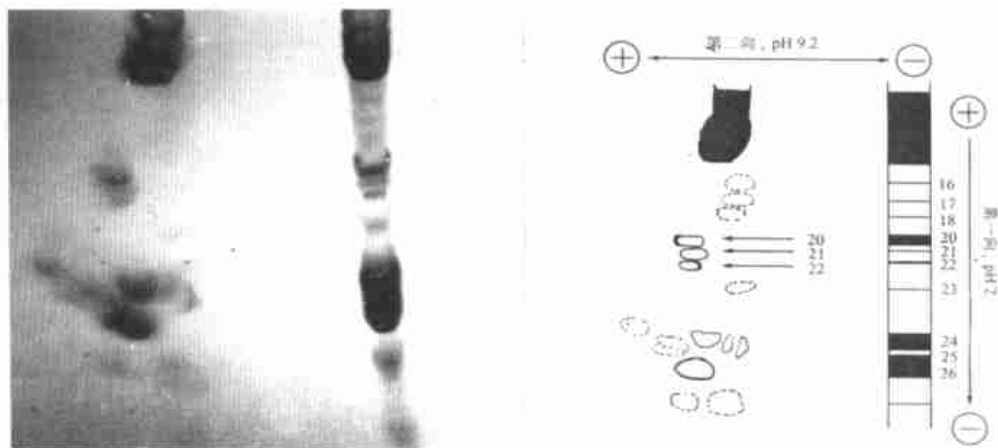


图 5 转化株系 91-837 种子醇溶蛋白双向电泳图谱

Fig. 5 Two dimensional electrophoretic patterns of seed gliadins of wheat transformation line 91-837

我们根据多年田间实验资料和种子醇溶蛋白电泳分析验证,应用外源 DNA 经子房注射等方法导入小麦可引起变异,并能迅速稳定遗传给后代。这一工作在小麦中又一次证明,周光宇^[1,12]提出染色体水平以下 DNA 片段杂交的理论和她设计的授粉后外源 DNA 导入植物的技术,是一条比较简便快速且易出现有价值变异的途径。因而应用外源 DNA 导入引起新变异的出现和较快稳定,在育种方法上开辟了新途径;在遗传理论上有许多方面可借助有关学科的理论和技术进一步深入探讨,促进其有新的突破和发展。

参 考 文 献

- 1 刘华,贾继增. 指纹图谱在作物品种鉴定中的应用. 作物品种资源, 1997(2): 45~48
- 2 陆朝福,朱立煌. 植物育种中的分子标记辅助选择. 生物工程进展, 1995, 15(4): 11~17
- 3 傅宾孝,于光华,王乐凯等. 小麦醇溶蛋白电泳分析的新方法. 作物学报, 1993, 19(2): 185~187
- 4 魏益明. 小麦籽粒的蛋白质组分. 种子, 1998, 12(2): 3~8
- 5 Branlard G. Study of genetic determination of 20 gliadin bands. *Theor Appl Genet*, 1983, 64(2): 155~161
- 6 丁虹. 小麦体细胞无性系醇溶蛋白电泳分析. 遗传, 1992, 14(2): 4~7
- 7 ОДИНЦОВА Т И, ОВЧИННИКОВ А Н, ЕГОРОВ Ц А, И-КОНЦЕВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОЛАМИНОВ РАЗЛИЧНЫХ ГЛИАДИНОДИРУЮ ИХ ЛОКУСОВ ПШЕНИЦЫ, ДАН СССР, 1987, 296(5): 1 262~1 265
- 8 孔青,徐乃瑜,林琼. 小麦外源 DNA 导入及转化的初步研究. 遗传, 1993, 15(5): 19~22
- 9 徐乃瑜,孔青,武军驻等. 应用外源 DNA 导入技术创造抗病优质高产的小麦新种质. 见: 庄巧生,杜振华主编. 中国小麦育种研究进展(1991~1995). 北京: 中国农业出版社, 1996. 486~496
- 10 Lafandra D, Kasarda D D, Morris R. Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin protein components of the cultivars 'Cheyenne' and 'Chinese Spring' by two-dimensional (two-pH) electrophoresis. *Theor Appl Genet*, 1984, 68: 531~539
- 11 周光宇. 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978(2): 16~20
- 12 周光宇. 植物分子育种的兴起与展望. 见: 周光宇,陈善葆,黄骏麒主编. 农业分子育种研究进展. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. 1~12