

转双抗虫基因烟草的研究

赵存友* * 袁正强 秦红敏 田颖川*

(中国科学院微生物研究所,中国科学院植物生物技术实验室 北京 100080)

摘 要 用改造的雪花莲凝集素基因 *GNAmm* 与合成的苏云金芽孢杆菌(*Bt*)毒蛋白 *cry1Ac* 基因构建了带有双价基因的植物表达载体,在该表达载体中这两个基因的转录分别受笋瓜 PP2 启动子(SPP2P)和 CaMV 35S 启动子的调控。通过根癌土壤杆菌介导转化法,获得了一批抗卡那霉素的转化再生烟草植株。PCR 检测及基因组 DNA Southern blot、Slot blot 杂交分析的结果表明 *Gna* 基因和 *Bt* 基因已整合到烟草总 DNA 中。用 *Bt* 毒蛋白抗血清进行 Western blot 分析,转基因植株均有 *Bt* 杀虫蛋白的不同程度的表达。对转化再生烟草的虫试结果表明,在所受试的 19 株烟草中 60% 的植株上的棉铃虫在 5 天内死亡率达到 100%,而且存活幼虫的生长发育受到明显抑制,蚜虫抑制生长试验表明,多数转化再生植株具有较强的抗蚜活性,平均能够抑制桃蚜 50%~60% 的蚜口密度,有的高达 80% 以上。以上结果表明利用这两个改造过的抗虫基因可以获得既抗虫又耐蚜的转双抗虫转基因植物。

关键词 双抗虫基因,韧皮部启动子,抗虫,抗蚜转基因烟草

中图分类号 Q789 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2001)03-0273-05

虫害是造成农业减产的主要原因之一,据统计,全世界每年因虫害引起的作物减产达总产的 20%~30%,损失高达数千亿美元^[1]。在我国,因虫害水稻减产在 10% 以上;小麦减产近 20%;棉花减产在 30% 以上^[2]。随着植物生物技术的发展,利用基因工程方法培育抗虫转基因农作物已成为现实。常用的抗虫基因有苏云金芽孢杆菌毒蛋白基因,蛋白酶抑制剂基因和植物外源凝集素基因等。其中苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, B. t.)毒蛋白基因应用得较多。植物凝集素(*Lectins*)是能特异地识别并可逆地结合糖类复合物的糖基部分而不改变被识别糖基的共价结构的一类非免疫球蛋白^[3]。有些 *Lectin* 与植物防御有关,可以抑制昆虫进食。植物 *Lectin* 的毒性基于它们特异结合到昆虫肠道的糖缀合物上,其中雪花莲外源凝集素在体外或转基因植物的抗虫试验中已证实对某些咀嚼式和刺吸式口器昆虫均有抗性,如烟草原夜蛾、蚜虫等^[4]。

现在运用的抗虫转基因作物多是转单一抗性基因的,不但抗虫谱窄,而且长时间使用容易使目标昆虫产生抗性。将两种或两种以上不同杀虫机制的抗虫基因转入植物可获得同时表达多种抗虫基因的植

株,由于不同抗虫蛋白的抗虫作用机制不同,可以同时抗多类害虫并可能延缓某些昆虫抗性的产生。王志斌等人将人工合成的 *GNA* 成熟蛋白基因和 *GFM cry1A* 基因与 35S 启动子构建双价基因表达载体,并由此获得了抗棉铃虫及蚜虫效果较好的转基因烟草^[5]。

本文报道利用改造的全长雪花莲凝集素基因 *GNAmm* 与合成的带有分泌信号肽编码序列的 *Bt cry1Ac* 基因,分别与韧皮部特异表达启动子 SPP2P 和组成型 35S 启动子组合构建双价植物表达载体,转化烟草及转基因烟草的抗虫性研究结果。由于 *Bt* 基因和 *Gna* 基因的杀虫机理及抗虫谱都不同,所用的启动子也不同,两者在抗虫功能及转录表达方面应该不会互相干扰,这将有利于选出抗虫、抗蚜性高,农艺形状好的转基因植物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所用的重组质粒 pS1M 是由烟草病原相关蛋白 PR1b 信号肽编码序列及合成的苏云金杆菌(*Bt*)杀虫蛋白基因 *Cry1Ac* 组成的嵌

收稿日期 2000-11-15,修回日期 2001-02-09。

基金项目 国家高技术研究发展与计划项目(Z17-01-01)资助。并得到国际科学与文化中心(ICSC)的世界实验室的部分资助。

* 通讯作者。Tel 86-10-62550187;Fax 86-10-62560912;E-mail lianyue@sun.im.ac.cn。

* * 系沈阳农业大学硕士,现在中科院微生物所工作。

合基因克隆到 pBluescriptII SK⁺ 载体上构建而成的(待发表资料)。pD12^[6]、pSKPP2-P^[7]、pBCGmm^[8]、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 等菌种均由本实验室构建或保存。

1.1.2 植物 烟草(*Nicotiana tabacum*)品种为 NC89。用无菌培养的 4~5 叶期幼苗的叶片作转化的外植体。

1.1.3 测试昆虫 棉铃虫由中国农业科学院植保所提供。蚜虫系采自中科院微生物所温室非转基因烟草上的桃蚜。

1.1.4 酶与试剂 各种限制酶、DNA 修饰酶、T4DNA 连接酶等购自 BRL、Bio-Lab 及 Promega 等公司;Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司;同位素 α -³²P-dCTP 为 NEN 公司产品。Bt CryIAC 抗血清为本实验室制备,碱性磷酸酯酶(AP)标记的羊抗兔抗体购自 BRL 公司。其它生化试剂购自国内外有关厂家和公司。

1.1.5 PCR 引物 检测转 Bt 基因引物 P1 5' > CTG-ACGTAAGGGATGACGC < 3'(为 35S 启动子引物);P2 5' > ACGATATCCAACACTG TAAG < 3'(为 Bt 基因特异引物),应扩增出 1.0kb 左右的片段;检测转 Gna 基因引物:P3 5' > CTCTCTCTACCGGGGAA TTTCG < 3 (Gna 基因特异引物);P4 5' > GTTGCCG-GT CTTGCTAT < 3(为 NOS 3'引物),应扩增出 0.5kb 左右的片段。以上 PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 中间载体的构建及其向农杆菌的转移 :用 BamH I 酶解 pD12,经 Klenow DNA 聚合酶补平后,再用 SalI 酶解分离载体大片段与 Xba I 酶解,Klenow DNA 聚合酶补平,然后 Sal I 酶解 pS1M 产生的 BtSlm 基因片段连接后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,经质粒电泳、酶切分析筛选阳性重组质粒 pDS1M。用 HindIII/BamH I 双酶解 pBCGmm 后,分离载体大片段,与 Hind III/BamH I 酶解 pSKPP2-P 产生的 SPP2 启动子片段(1bp)连接后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 酶切分析筛选重组质粒 pBSGmm。用 HindIII 酶解 pBSGmm 脱磷后与用 Hind III 酶解 pDS1M 产生的 Bt 基因表达框架连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,经质粒电泳、酶切分析筛选重组质粒得到双基因植物表达载体 pBSGS1M⁺。pBSGS1M⁺ 的结构见图 1 所示。中间载体向农杆菌 LBA4404 的直接转化参见文献 9]

1.2.2 烟草外植体的转化及再生 按文献 9 进行。

1.2.3 转化再生植株的 PCR 分析 转基因烟草叶片的总 DNA 的提取方法按文献 10 的方法。用 P1、P2 和 P3、P4 引物按 Taq 聚合酶厂家提供的方法进行 PCR 反应,取反应混合物产物在 1% Agarose 胶上电泳检查反应产物大小。

1.2.4 转基因烟草的 Southern blot 及 Slot blot 分析 :取 20 μ g DNA 用 HindIII 彻底酶解后,用 0.8% Agarose 胶上电泳,之后将胶上的 DNA 真空转移到 Zeta-Probe 膜上,取 1 μ g 以上的 DNA 按文献 11 方法进行 Slot blot 转膜。按 Amersham pharmacia biotech 公司(RediprimeTM II)提供的方法用 ³²P- α -dCTP 标记 GNA 基因和 Bt 基因片段为探针,按文献 11 所述方法进行杂交。

1.2.5 转基因烟草的 Western blot 分析 :选取 PCR 阳性并具有抗虫活性的植株幼嫩叶片。按文献 13]的方法进行 Western blot 分析。一抗为柱纯化的兔抗 Bt CryIAC 蛋白抗血清,二抗为碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗体。

1.2.6 转化再生烟草的抗虫试验 :当转基因烟草和非转基因烟草长到 3~5 片叶时,取完全展开新鲜叶片,洗干净,用纱布吸干后放于小盒内,每一小盒内放一头二龄棉铃虫,每株植株接虫 5~8 头,以空白载体转化的植株为对照。25 $^{\circ}$ C 培养,第 3~8 天统计幼虫死亡率。取植株的中层叶片,按文献 8 提供方法进行抗蚜虫试验,抗蚜试验重复 2 次。

2 结果与讨论

2.1 植物表达载体的构建及烟草的转化

载体 pD12 含有由双增强子的 35S 启动子、TMV "Ω"片段翻译增强子、UTT 通用转录终止序列以及 NOS 终止子组成的表达框,外源 Bt 基因片段插入到 pD12 中 35S 启动子下游获得 pDS1M 重组质粒。为利用韧皮部特异启动子驱动改造后的 Gna 基因在植物中进行组织特异性表达(如前所述)已构建了植物表达载体 pBSGmm,将 Bt 基因表达框架插入 pBSGmm 后构建含有双抗虫基因的植物表达载体 pBSGS1M⁺,分别由 35S 启动子介导 Bt 基因组成型表达、笋瓜 SPP2 启动子介导 Gna 基因韧皮部特异表达(见图 1)。酶切分析证明 Bt 基因表达框的插入及插入方向后(资料略)用于转化土壤农杆菌。

土壤农杆菌 Ti 质粒介导的植物遗传转化是以烟草无菌苗叶片作为转化受体,用含有 pBSGS1M⁺ 质粒的农杆菌侵染,在含 300 μ g/mL 卡那霉素和

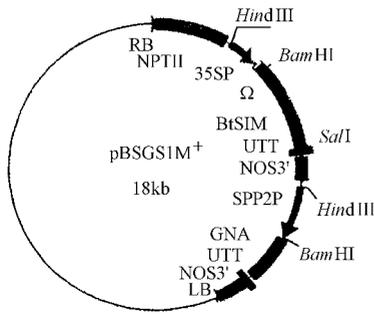


图1 植物表达载体 pBSGS1M⁺ 质粒图谱

Fig.1 Map of plant expression vector

500 μ g/mL 羧苄青霉素的 MS 培养基上选择不定芽, 共获 20 株转化再生植株。

2.2 转基因烟草的 PCR 检测及 Southern 杂交分析

提取植物总 DNA, 用 *Gna* 基因内正链引物 P3 和 Nos 终止子负链引物 P4 按前文所述条件进行 PCR 检测, 整合有外源 *Gna* 基因的转基因植株应扩增出 500bp 片段; 用 35S 正链引物 P1 和 *Bt* 基因内负链引物 P2 进行 PCR 检测, 则应扩增出 1kb 大小的 DNA 片段 (图略)。共检测了 20 株转化再生植株, 含有 *Bt* 基因的植株有 19 株, 含有 *Gna* 基因的有 19 株, 含有两个基因的 18 植株, 双价转基因植株占转化再生植株总数的 90%。

为了确证外源基因在植物基因组中的整合及整合的拷贝数, 提取 PCR 阳性植株的 DNA, 进行 Southern blot 或 Slot blot 分析检测。图 2 显示了 Southern blot 分析的 2 株转基因植株 (泳道 3、4) 结果表明这 2 个植株确有外源 *Gna* 基因的插入, 且至少有 2 个拷贝, 外源基因在不同植株染色体 DNA 中的插入整合位点不同。非转基因植株 (泳道 2) 没有杂交带, 即没有外源基因的插入。用标记的 *Bt* 基因片段做探针进行了 Slot blot 杂交, 结果 (见图 3 所示) 表明,

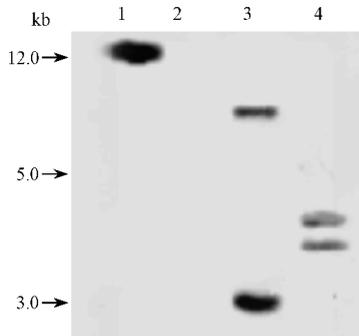


图2 转基因植株中 *Gna* 基因的 Southern blotting 检测

Fig.2 Southern blotting assay of GNA-gene in transgenic plants

1. pBSGS1M⁺ plasmid/SalI as positive control 2. Nontransformed plant sample as negative control 3 and 4. Transgenic plants # 80 and # 100

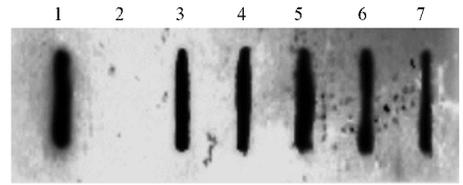


图3 转基因植株中 *Bt* 基因的 Slot blotting 检测

Fig.3 Slot blotting assay of Bt-gene in transgenic plants

1. pBSGS1M plasmid 2. Nontransformed plant sample ; 3 ~ 7. Transgenic plants # 28 ,32 ,34 ,80 ,100

转化再生植株 32 #、28 #、80 #、34 # 和 100 # 与用 pBSGS1M⁺ 质粒设立的阳性对照一样, 出现较强的杂交信号, 而非转化再生植株则无此信号, 说明外源 *Bt* 基因已经整合到烟草染色体 DNA 中。

2.3 转基因烟草中 *Bt* 蛋白的表达

选部分 PCR 阳性的转基因植株进行 Western blot 分析。结果表明所检测的 6 株转基因植株可以表达分子量与预期的 *Bt* 蛋白 (68kD) 相当并可以与 *B.t.* 蛋白抗体起特异反应的蛋白质, 这表明与 *Bt* 蛋白融合的信号肽很可能已被正确剪切, 但信号肽的正确加工位点及在植物组织中的分泌位置有待于进一步检测。在上样蛋白量一致时, 单株之间 *Bt* 蛋白的表达量差异很大, 80 #、28 # 的表达量由图 4 可以看出, 明显高于其它 4 株, 这可能是由于外源基因在植物染色体中整合位点不同造成的外源蛋白的表达量的不同。

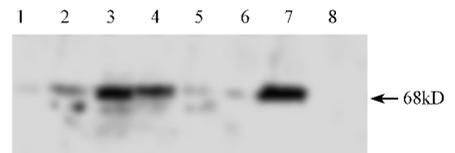


图4 转 pBSGS1M⁺ 的烟草的 Western blot

Fig.4 Western blot analysis of Bt protein expressed in tobacco

plants transformed with pBSGS1M⁺

1 ~ 6. Transgenic tobacco plants # 103, 9, 80, 28, 6, 100 7. Bt standard protein (68kD) 8. Utransformed plant sample as negative control

2.4 转化再生植株的抗虫性试验

2.4.1 抗棉铃虫试验结果

对 19 株 PCR 阳性转基因植株用离体叶片进行抗棉铃虫试验, 结果所获得的转基因植株对棉铃虫有较高的杀虫活性, 图 5 表示不同受试植株之间第 5 天试虫死亡率的比较, 到第 5 天 60% 受试植株样品上的幼虫死亡率达 100%。单株之间抗性差异很大, 有的受试棉铃虫 3 天全部死亡, 且叶片受损程度极小; 有的到第 5 天全部死亡, 还有的虽然未全部死亡但存活的虫子发育缓慢, 并且叶片受损程度也很小。不同植株中 *BT*

蛋白表达量不同而造成转基因植株单株之间抗虫活性不同,如 80 # 28 # 植株,BT 蛋白表达量明显高于其他植株(图 4),而其抗虫活性在虫试第 3 天死亡率就达到 100%,这表明 Bt 蛋白的表达量与其抗虫活性呈正相关。而对照植株受试虫发育很好,叶片受损很大,往往被吃得仅剩叶柄(资料略)。

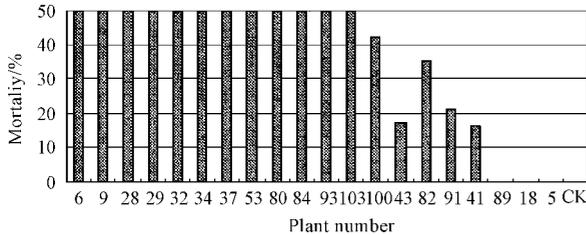


图 5 接虫 5 天后单株测试虫死亡率

Fig.5 Motallity of insects on transformed plants at 5 days after infestation

2.4.2 对蚜虫生长发育的抑制作用:我们将 19 株 *Gna* 基因 PCR 阳性的植株及 10 株非转基因植株(CK)进行了抑制蚜虫生长试验。由图 6 所示结果可以看出与对照植株相比转基因植株表现出明显的对蚜虫生长的抑制作用,平均能抑制蚜口密度约 50%~60%,但单株之间差异很大,有的抑制蚜虫密度高达 80% 以上,而有的仅抑制 20% 左右。对这些植株进行 Western blot 分析的初步结果显示其 GNA 蛋白表达也有所差异,但这一结果尚需进一步重复(资料略),这同抗虫结果的情况类似,这两个抗虫基因在植物基因组中的整合点不同可能是它们外源蛋白表达水平及抗虫性不同的原因。

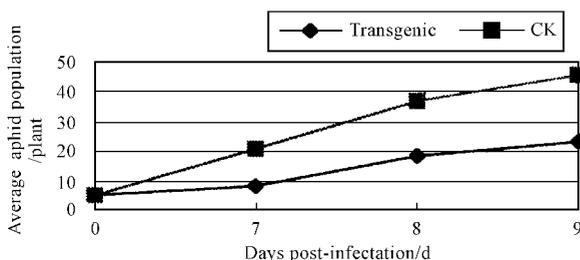


图 6 转基因植株对蚜口密度的影响

Fig.6 Effect of gna34mm transgenic plants on the density development of aphids

综合以上结果,通过表 1 我们可以看到既抗棉铃虫又抗蚜虫的双抗转基因植株,如 100 # ,103 # 等,占受试植株的 30% 左右。同时我们发现,有的转基因植株虽然具有较高的抗虫活性但没有抗蚜或抗蚜活性很低,反之亦然。这说明外源基因在整合过程中可能发生了不同程度的缺失、重组或部分的

基因沉默。

表 1 部分转基因烟草抗虫结果

Table 1 The partial result of insect resistant of transgenic tobacco

Plant number	Reduction rate of aphid population/%	Mortality of bollworm/%	PCR	
			<i>Gna</i>	<i>Bt</i>
100	88	100	+	+
103	83	100	+	+
18	78	0	+	+
37	72	100	+	+
29	67	100	+	+
82	65	75	+	+
84	59	100	+	+
32	57	100	+	+
53	57	100	+	+
43	54	85	+	+
6	28	100	+	+
9	28	100	+	+
93	28	100	+	+
28	24	100	+	+
80	0	100	+	+
CK	0	6	-	-

与此同时,我们也将该双价基因植物表达载体通过农杆菌介导法转化了棉花,获得了高效抗虫转基因棉花,结果将在另文发表。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Estruch J J ,Carozzi N B ,Desai N *et al.* Transgenic plants :an emerging approach to pest control . *Nat Biotechnol* ,1997 ,**15** (2) :137 ~ 141
- [2] ZENG L (曾林) ,REN G X (任改新) . The Current Condition and Advance of the Research on *Bacillus Thuringiensis Cry* Genes . *Microbiology* (微生物学通报) ,1998 ,**25** (1) :49 ~ 51
- [3] Li J , Carroll J , Ellar D J *et al.* Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution . *Nature* ,1991 , **353** :815 ~ 821
- [4] Grate house AMR ,Powell K S ,Peumans W J *et al.* Insecticidal properties of plant lectins ,their potential in Protection ,*Biomedical Perspectives* . Lectins :Taylor and Francis ,1995 ,pp.35 ~ 37
- [5] WANG Z H (王志斌) ,GUO S D (郭三堆) . Transgenic tobacco plants expressing bivalent insect resistant gene *cryIA/gna* resisting both cotton bollworms and aphids . *Chinese Sciences Bulletin* (科学通报) , 1999 ,**44** (19) :2068 ~ 2075
- [6] TIAN Y (田颖川) ,ZHEN J B (郑均宝) ,YU H M (虞红梅) *et al.* Studies of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect resistant genes . *Acta Botanica Sinica* (植物学报) 2000 ,**42** :263 ~ 268
- [7] JIANG H (蒋浩) ,QIN H M (秦红敏) ,YU H M (虞红梅) *et al.* Cloning and functional analysis of the *cryIIA* gene promoter from *cuar*

- ita maxima. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报),1999, 7(1) :64 ~ 68
- [8] YUAN Z Q(袁正强) , ZHAO C Y(赵存友) , ZHOU Y(周岩) *et al.* Modification of *gna* Gene and Studies on its Aphid Resistant. *Acta Botanica Sinica*(植物学报). Accepted
- [9] TIAN Y C(田颖川) , QIN X H(秦晓峰) , XU B Y(许丙寅) *et al.* Insect resistant of transgenic tobacco plants expressing σ -endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* , *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),1991, 7(1) :1 ~ 10
- [10] Andrew H Paterson , Curt L Bruker *et al.* A rapid method for extraction of cotton genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis , *Plant Molecular Biology Reporter* . 1993, 11(2) :122 ~ 127
- [11] Sambrook J , Fritish E F , Manicitis T *et al.* *Molecular Cloning A Laboratory Manual*^{2nd} . Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

Studies on Transgenic Tobacco Plants Expressing Two Kinds of Insect Resistant Genes

ZHAO Cun-You * * YUAN Zheng-Qiang QIN Hong-Min TIAN Ying-Chuan *

(*Plant Biotechnology Laboratory , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract A synthetic *Bt cry1Ac* gene fused with a secretory signal coding sequences at 5' end and a modified *gna* gene were used to construct a plant expression vector pBSCS1M⁺ and this vector was transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) by Agrobacterium-mediated transformation method. Results of PCR , Southern blot and Slot blot analysis indicated that both the chimeric *Bt cry1Ac* and *gna* genes were integrated into the genomes of transformed plants. Western blot analysis indicated that at least the *cry1Ac* protein was produced in transgenic plants. Upon insect bioassay using cotton bollworm (*Heliothis armigera* Hubner) , the mortality of insect larvae on 60% regenerated plants reached 100% in 5 days post infestation and the growth of the survived larvae was seriously inhibited , The results from insect bioassay with peach aphid (*Myzus persicae*) showed that the transgenic plants were aphid-resistant , evidenced by a 50% ~ 60% reduction in aphid population density , even over 80% for some individual transgenic plants. These results reflect that the modification of the two insect resistant genes and construction of the expression vector are correct and could be valuable for later application in crop breeding for insect resistance.

Key words tissue-specific promoter , two kinds of insect-resistant genes , transgenic tobacco plants , insects-resistance

Received : November 15 2000

This work was supported by World Laboratory , International Center for Science and Culture (ICSC) , Switzerland . Foundation items : Chinese National High-technology Program in Biology (" 863 " Z17-01-01) .

* Corresponding author. Tel 86-10-62550187 , Fax 86-10-62560912 , E-mail tianyc@sun. im. ac. cn.

* * Postgraduate from Shenyang Agricultural University.