

## 苋菜凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究

周永刚 田颖川\* 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘 要** 通过 PCR 从苋属植物千穗谷(*Amaranthus hypochondriacus*) 的总 DNA 中扩增出苋菜凝集素(AHA) 的核基因片段。序列分析结果表明该基因为 2453bp, 含有一 1538bp 的内含子和两个分别为 212bp 和 703bp 的外显子。采取反向 PCR 的方法获得仅含该基因的编码区克隆。以此为基础与二元表达载体 pBin438 构建含内含子与不含内含子 AHA 基因的植物表达载体 pBAHAg 和 pBAHAc 并通过土壤农杆菌介导转化了烟草。转化再生植株的 PCR 和 Southern blot 分析表明, AHA 基因已整合到烟草的染色体中, 有单拷贝和多拷贝的整合。用与 AHA 蛋白高度同源的 ACA 蛋白的抗血清进行了免疫斑点(Immunodot blot) 检测, 结果初步表明转基因烟草有 AHA 蛋白的表达。虫试结果表明转 pBAHAg 和 pBAHAc 烟草对蚜虫的平均抑制率分别达 57.2% 和 48.8%, 有的高达 90% 以上。含内含子和不含内含子的 AHA 基因在转基因植株中的抗蚜性不同。

**关键词** 千穗谷苋菜 AHA 基因, 转基因烟草, 抗蚜性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0034-06

蚜虫属于同翅目昆虫, 通过吸取植物韧皮部的汁液造成直接的危害, 又通过传播植物病毒对植物造成间接的危害。植物抗虫基因工程的研究进展为控制蚜虫的危害提供了新的途径。现阶段抗蚜基因工程的关键是寻找新的高效的抗虫基因。已报道的有抗蚜活性的基因有 *ipt* 基因<sup>[1]</sup>, *Mi* 基因<sup>[2]</sup> 和一些植物凝集素基因。广泛应用于抗蚜转基因植物的抗蚜基因为 *GNA* 和 *ConA* 基因, *GNA* 基因已成功的导入到烟草<sup>[3,4]</sup>、马铃薯<sup>[5]</sup>、小麦<sup>[6]</sup> 等植物中, *ConA* 基因也导入到马铃薯中<sup>[7]</sup>。这些转基因植物对蚜虫的生长、发育和繁殖能力有一定的抑制作用。Rahbe<sup>[8]</sup> 等系统地研究了 30 种植物凝集素在体外的抗蚜虫的活性, 发现一种来源于尾穗苋种子中专一性与 2-乙酰氨基-2-脱氧-D 半乳糖结合的凝集素 ACA<sup>[9]</sup> (*Amaranthus caudatus* agglutinin) 在体外的抗虫活性比 *GNA* 和 *ConA* 更高, 其对蚜虫的致死浓度只有 *GNA* 和 *ConA* 的一半, 而死亡率达到 100%。这表明 ACA 是一种潜在有效的抗蚜基因, 但在整体植物中的作用尚未见报道。

千穗谷苋菜 *A. hypochondriacus* 和尾穗苋菜 *A. caudatus* 是同一属中不同的种。来源于 *A.*

*hypochondriacus* 的基因 *AmA1* 编码的蛋白是一种种子贮藏蛋白, 必需氨基酸的含量高, 具有平衡营养的作用<sup>[10]</sup>。*AmA1* cDNA 推导的氨基酸序列与 ACA 的氨基酸序列有高达 97.7% 的同源性<sup>[11]</sup>, 所以推测它们具有相似的生物学功能。为方便比较我们将按 *AmA1* 基因序列设计引物经 PCR 克隆的 *AmA1* 基因定名为 AHA。国内外对 AHA 的核基因结构及可能的抗蚜活性研究尚未见报道。本文主要介绍 AHA 基因克隆及其转基因烟草抗蚜活性的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 土壤农杆菌 LBA4404, 质粒 pUC18, pD12, pBin438 为本实验室保存或构建。

### 1.2 植物材料

制备总 DNA 的苋菜品种千穗谷(*Amaranthus hypochondriacus*) 由美国 IOWA 州立大学区域植物引种站馈赠。4~5 叶期的无菌培养烟草(*Nicotiana tabacum*) SR1 是土壤农杆菌转化实验的外植体。

### 1.3 酶与试剂

收稿日期 2000-06-12 修回日期 2000-09-18。

基金项目 国家高技术研究与发展计划项目(Z-17-01-01) 及 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: tianyc@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Taq Plus ,Pfu ,T4 DNA 连接酶购自上海生工生物工程有限公司,各种限制酶和修饰酶购自 Boehringer mannheim ,BRL ,Promega ,Takara 等公司。T7 DNA Sequencing Kit 为 Pharmacia 公司产品; $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP 购自 NEN 公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

#### 1.4 测试昆虫

采自本所温室非转基因烟草上的桃蚜(*Myzus persicae*) ,在健康的烟草上繁殖。

#### 1.5 苋菜总 DNA 的提取

参考文献[12] ,从苋菜叶片提取总 DNA。

#### 1.6 目的基因的扩增和克隆

根据报道的苋菜 *AmA1* cDNA 序列<sup>[10]</sup> ,设计 PCR 扩增反应的两个引物:

P1(5'端)引物 5' > GGAAGATCTACCATGGCGG-GATTACCAAGTG3'

P2(3'端)引物 5' > AGCGTCGACTTAGTTGTTG-GATCCCAATTC3'

取 1 $\mu$ L 总 DNA 约 50ng 在 20 $\mu$ L 体系中进行目的基因的扩增。扩增条件为:94℃ 预变性 3min ,然后以 94℃ 变性 1min ,49℃ 复性 40s ,72℃ 延伸 1.5min ,进行 30 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。

通过 Agrose 凝胶电泳回收扩增片段 ,与来源于 pUC18 的 T 载体(实验室制备)连接 ,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  ,在含有 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素的 LB 平板上筛选重组克隆。

#### 1.7 DNA 序列分析

挑选重组克隆按 Pharmacia T7 Sequencing Kit 进行序列分析。选两端序列正确的克隆经 ABI 377 自动测序仪完成全序列测定。有完整 *AHA* 基因插入的重组质粒命名为 pAHAg。

#### 1.8 反向 PCR 扩增 *AHA* 基因编码区序列

反向 PCR 引物为:

P3 引物 5' > GTGGTCCCCCAATCATTATTG 3'

P4 引物 5' > CTAACCAAATATTTGTTAGTG 3'

以质粒 pAHAg DNA 为模板 ,取 1 $\mu$ L (~1ng) 在 20 $\mu$ L 体系进行 PCR 扩增。扩增反应条件为:94℃ 预变性 3min ,然后 94℃ 变性 1min ,56℃ 复性 40s ,72℃ 延伸 2.5min ,30 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。所得 PCR 片段经 T4 DNA 多核苷酸激酶进行磷酸化 ,然后参考文献[13]所述用 T4 DNA 连接酶连接转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  后挑取转化子进行全序列分析。质粒命名为 pAHAc。

#### 1.9 植物表达载体的构建

重组质粒 pAHAg 经 *Nco* I 酶切 ,Klenow 补平 ,*Sal* I 酶切后回收 *AHA* 基因片段与 *Bam* HI 酶切 ,Klenow 补平 ,*Sal* I 酶切的载体 pD12 连接 ,所得重组质粒命名为 pDAHAg。用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切质粒 pDAHAg ,电泳回收 *AHAg* 基因表达框 DNA 片段与同样酶切的载体 pBin438 连接<sup>[14]</sup> ,所得质粒命名为 pBAHAg。重组质粒 pAHAc 经 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切 ,回收基因片段与 *Bam* HI 和 *Sal* I 酶切的载体 pBin438 连接 ,所得质粒命名为 pBAHAc。按文献[15]将质粒 pBAHAg 和 pBAHAc 转入土壤农杆菌 LBA4404 中后即可用于植物的转化(资料略)。

#### 1.10 烟草外植体的转化和再生

参考文献[16]进行。

#### 1.11 转化烟草植物的 PCR 分析

转基因烟草叶片总 DNA 的提取按文献[12]的方法。转 pBAHAg 质粒的烟草用 35S 引物(5'-CT-GACGTAAGGGATGACGC3')和 P4 引物扩增;转 pBAHAc 质粒的烟草用 P1 ,P2 引物扩增。

#### 1.12 转基因烟草的 Southern blot 分析

按文献[12]提取烟草总 DNA。取 20 $\mu$ g DNA 用 *Hind* III 完全酶解后在 0.8% Agarose 上电泳。用毛细管法将胶上的 DNA 转移到 Hybond-N<sup>+</sup> 膜上。按 Pharmacia 公司 DNA 标记盒提供的方法用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记的 *AHA* 基因片段 ,按文献[13]所述方法进行转移和杂交。

#### 1.13 转基因烟草的 Immunodot blot 检测

参考文献[7]方法 ,取 50mg 烟草叶片 ,液氮研磨后加入 100 $\mu$ L 蛋白质提取缓冲液 ,混匀 ,4℃ 离心取上清。取 10 $\mu$ L 的烟草总蛋白点在硝酸纤维膜上 ,待蛋白完全干燥后 ,进行斑点杂交反应。抗体为本实验室制备的 ACA 蛋白的兔抗血清。

#### 1.14 转基因烟草的抗蚜试验

当转基因烟草和非转基因烟草长到 3~5 片叶时 ,取 PCR 检测阳性的植株中层叶片 ,插到装有无糖的 MS 固体培养基的 100mL 容积三角瓶中 ,在植物光照培养箱中进行培养。培养条件为每日光照 16h ,温度 25℃ ;黑暗 8h ,温度 22℃。每个培养瓶中放置 1 片叶片 ,用毛笔小心接入 3 只 1 龄桃蚜(*Myzus persicae*) ,隔日记录每片叶片上所有蚜虫的数量 ,直至第 12 天。抗蚜试验重复 2 次。按下式计算参试植物对蚜口密度增长的抑制百分数:

$$\text{蚜口密度抑制 \%} = \frac{(\text{对照植株虫数} - \text{参试植株虫数})}{\text{对照植株虫数}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 苋菜 AHA 核基因 AHAg 的 PCR 扩增和克隆

以苋菜总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖电泳分析表明有 2 条大小分别约为 2.5kb 和 1.0kb 的 DNA 片段(图 1),分别回收这 2 个 DNA 片段后,克隆至载体 pUC18 中。通过抗生素筛选和重组质粒的酶切分析,对每种片段都选到了一批克隆。

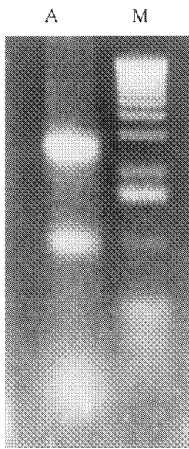


图 1 苋菜 AHA 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product from genomic DNA of *Amaranthus hypochondriacus*.

A. PCR product ; M. 1kb DNA ladder

2.2 苋菜 AHAg 基因的序列分析

对获得的克隆进行序列分析的结果表明 2.5kb 的片段含有目的基因,而 1.0kb 的片段为非特异的扩增片段。由于所用退火温度较低(49℃),在基因组扩增时容易出现非特异性的扩增。全序列分析发现 AHAg 基因全长为 2453bp,含有一个 1538bp 的内含子,其外显子 1 为 212bp,外显子 2 为 703bp,内含子的剪切位点符合 GT/AG 的规则。内含子的 AT 碱基的含量高达 73%,符合一般内含子中 AT 含量高的特征。任意选 3 个克隆进行了全序列分析,结果一致,其外显子序列与 AmA1 cDNA 的序列基本一致,只在 219 位由 T 变为 C,但不影响氨基酸的编码。AHA 基因的结构如图 2 所示,这是对 AHA 核基因结构的首次报道。AHA 基因的序列已存入 GenBank,序列号为 AF143954。

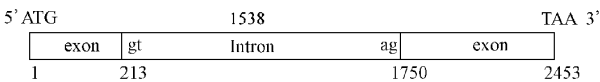


图 2 AHA 基因结构示意图

Fig.2 AHA gene structure

2.3 AHA 基因编码区序列的克隆

为获得 AHA 基因的编码区序列,以便在原核体系中表达 AHA 蛋白,在体外研究其功能及制备抗血清,同时研究该基因在其它植物中的功能。对含 AHAg 基因的 pAHAg 进行了反向 PCR 扩增,产物经电泳分析约为 3.7kb(2.68kb 载体 + 0.9kb 编码区)。对所得克隆的全序列分析证明两外显子已正确地连接成完整的 AHA 编码区,未发生移码或缺失突变(资料略)。

2.4 植物表达载体的构建

为了研究 AHA 在转基因植物中可能的抗蚜作用及研究内含子对 AHA 基因表达的影响,利用二元载体 pBin438<sup>[14]</sup>构建了组成型表达载体 pBAHAg 和 pBAHAc。重组质粒 pBAHAg 经 Hind III / Sal I 双酶切能得到 3.2kb 的片段,重组质粒 pBAHAc 为 1.6kb 片段,酶切分析的结果证明其正确(资料略)。AHA 基因表达载体的结构如图 3 所示。

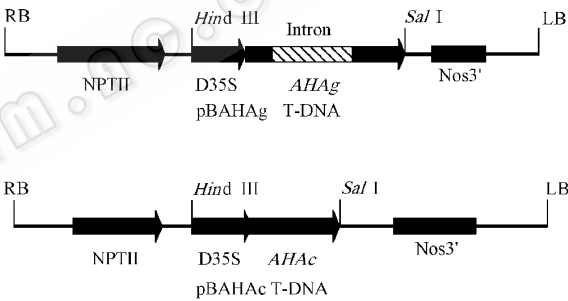


图 3 AHA 基因植物表达载体的结构

Fig. 3 Structure of plant expression vector pAHAg and pAHAc

大部分植物基因 mRNA 前体含有一个或多个内含子,其长度相差很远,2/3 的内含子在 150bp 以下,很少有大于 2~3kb 的<sup>[17]</sup>。我们克隆的 AHAg 基因含有一个 1538bp 内含子。在高等植物转基因的研究中发现有的内含子可被用来优化转基因的表达,在合适的情况下,基因中的内含子有利于 mRNA 的稳定和正确的加工。为了更好地利用 AHA 基因,我们分别构建了该基因的核基因和 cDNA 的表达载体,以期研究它们在植物中的表达水平的差异。用含有 pBAHAg 或 pBAHAc 的土壤农杆菌转化烟草,在含 300μg/mL 卡那霉素的 MS 培养基上选择不定芽,pBAHAg,pBAHAc 分别获得一批再生植株。

2.5 转化再生植株的 PCR 检测

PCR 方法可以快速测定外源基因的整合情况。用 35S 启动子引物和 P4 引物扩增转 pBAHAg 转化

植株的 DNA ,应扩增得到一条 372bp 的片段。用 P1 P2 引物扩增 pBAHAc 转化植株 ,应得到一条为 912bp 的片段。图 4(a、b)的结果显示扩增到正确大小的 DNA 片段 ,初步证明外源基因很可能已整合到植物的染色体中。在转 AHAg 和 AHAc 基因再生植株中分别获得了 45 和 35 株 PCR 阳性的植株。

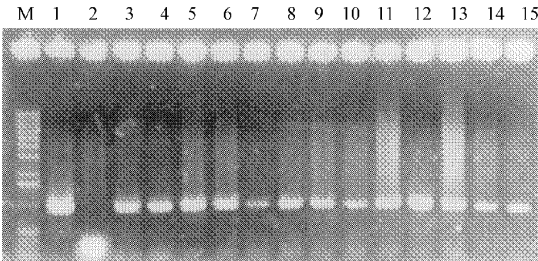


图 4a 转 AHAc 基因烟草的 PCR 分析

Fig. 4a PCR analysis of tobacco plants transformed with AHAc

M. DNA 1kb ladder ; 1. Positive control ; 2. Untransformed tobacco ; 3~15. Transformed tobacco plants

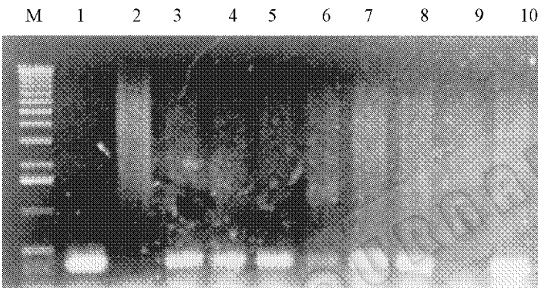


图 4b 转 AHAg 基因烟草的 PCR 分析

Fig. 4a PCR analysis of tobacco plants transformed with AHAg

M. DNA 1kb ladder ; 1. Positive control ; 2. Untransformed tobacco ; 3 4 5 6 7 8 ,10. Transformed tobacco plants ; 9. Nontransgenic tobacco plant

2.6 转基因烟草的 Southern blot 检测

在 PCR 检测的基础上 ,选择阳性植株的总 DNA 用 HindⅢ 完全酶解后进行 Southern blot 分析以进一步确定外源基因的整合情况。其中正对照为 HindⅢ 酶切的质粒 pBAHAg( 16.5kb)和 Nco I , Sal I 双酶切的 pAHAg 质粒回收的 AHAg 基因片段( 2.5kb)。由于所构建的表达载体上只含有 1 个 HindⅢ 酶切位点 ,用 AHA 基因的探针杂交可以反映外源基因的拷贝数。Southern blot 结果显示( 图 5)所检测的 5 个植株有 1~3 个特异的杂交带 ,非转基因植株没有杂交带。阳性对照在预期的位置有 2 条杂交带。这样初步证明了 5 个植株均有 AHA 基因插入 ,其插入的拷贝数有的为 1 个 ,有的为 2 个或

3 个。

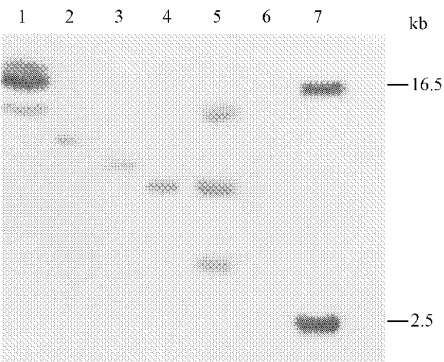


图 5 转基因烟草的 Southern blot 分析

Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic tobacco plants 1~2. pBAHAg transformed plants ; 3~5. pBAHAc transformed plants ;6. Untransformed plant ;7. Positive control <sup>32</sup>P labeled 0.9kb AHA gene fragment was used as probe.

2.7 转基因烟草的 Immunodot blot 检测

在免疫斑点反应中来自转基因烟草的总蛋白提取物与抗 ACA 蛋白的抗血清有特异的免疫反应。

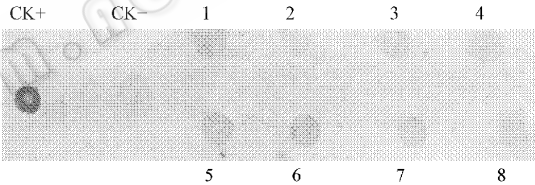


图 6 转基因烟草的 Immunodot blot 分析

Fig. 6 Immunodot blot analysis of transgenic tobacco plants CK+ . ACA protein ;CK- . untransformed tobacco plants ; 1~4. AHAc transformed plants ; 5~8. AHAg transformed plants

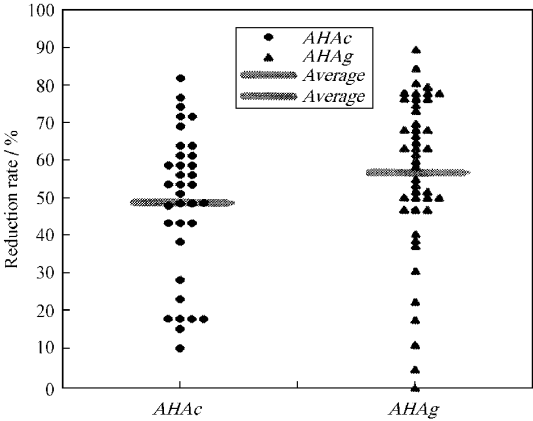


图 7 转 AHAg 和 AHAc 基因烟草蚜虫抑制率分布

Fig. 7 Inhibition rate of aphid population development on transgenic tobacco

Ordinate aphid reproduction inhibition rate ; 35 45 and 4 plants were used for AHAC ,AHAg and nontransformed plants respectively. 4/12d

虽然非转基因的植物蛋白(CK-)与抗血清也有微弱的反应,但转基因植株反应显色强度明显高于对照,扫描定量的结果显示转基因植株的杂交反应强度为对照植株的2~5倍(资料略),所以这一结果初步表明在转基因植物中有AHA蛋白的合成。

## 2.8 转基因烟草对蚜虫生长发育的抑制作用

pBAHAg和pBAHAc转基因烟草的抗蚜试验结果(图7)表明:pBAHAg和pBAHAc植株对蚜虫密度有明显的抑制作用,平均抑制蚜口密度分别约57.2%和48.8%,有些植株有强烈的抗蚜活性,最高可抑制90%的蚜口密度。

植株抗蚜性的分布主要集中在平均值区域,转AHAc基因植株抗蚜性分布在45%~65%,而转AHAg基因抗蚜性分布于50%~75%。取部分抗性植株进行了抗蚜活性的连续观察,结果如图8。

由图7和图8可知,转pBAHAg的植株比较pBAHAc植株能更好的抑制蚜口密度。这表明转内含子的AHA基因比不含内含子的基因有更好的抗蚜性,可能是由于内含子的存在影响了AHA基因在异源植物烟草中的转录,使之形成了更多或更稳定的mRNA,提高了外源基因的表达量,从而提高了抗虫性,但确切的原因还必须有更多的分子生物学证据来证明。

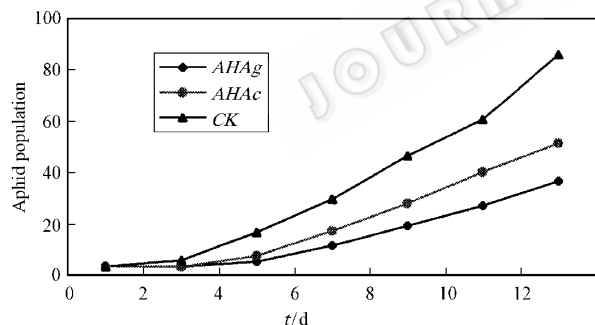


图8 转基因烟草对蚜口密度增长的抑制作用

Fig.8 Inhibition effects of transgenic tobacco plants

on the population development of *M. persicae*

ordinate: Aphid population (number); Abscissa: time (days); 12, 16 and 4 plants were used for AHAc, AHAg and untransformed plants respectively

目前已用于转基因抗蚜研究的植物凝集素基因有GNA和ConA。Hilder<sup>[3]</sup>等利用CaMV 35S启动子驱动下转GNA基因烟草对桃蚜平均抑制率为50%,周岩<sup>[4]</sup>等为45%~60%。35S启动子驱动下转ConA基因马铃薯对马铃薯蚜的平均抑制率为45%<sup>[7]</sup>。本文构建的35S与AHAc和AHAg基因的转基因烟草对蚜虫平均抑制率为48.8%~

57.2%。与GNA和ConA基因表现出相似的抗蚜活性。表达AHA蛋白的转基因烟草主要表现出对蚜虫繁殖作用有抑制,影响其群体的形成,对蚜虫的死亡率没有大的影响。这与转GNA和ConA基因的转基因植物对蚜虫的影响一致。GNA, ConA, AHA这3种凝集素属于不同的凝集素家族,在基因及蛋白序列和结构上同源性不大,它们分别结合不同的糖基位点,对蚜虫的作用机制可能也不相同,这有助于构建多基因载体以获得更有效的抗蚜转基因植物。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Smigocki A, Neal J W, McCanna I *et al.* Cytokini-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt*-Gene, *Plant Molecular Biology*, 1993, **23**: 325~335
- [2] Rossi M, Goggin F L, Milligan S B *et al.* The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato pphid, *PNAS*, 1998, **95**: 9750~9754
- [3] Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR *et al.* Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphid, *Transgenic Research*, 1995, **4**: 18~25
- [4] Zhou Y (周岩), Tian Y (田颖川), Wu H (吴标) *et al.* Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population of *Myzus persicae*, *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**: 13~19
- [5] Gatehouse AMR, Down R E, Powell K S *et al.* Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1996, **79**: 295~307
- [6] Stoger E, Williams S, Christon P *et al.* Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin GNA) in transgenic wheat plants: effects on the predation by the grain aphid *Sitobion avenae*, *Molecular Breeding*, 1999, **5**: 65~75
- [7] Angharad M R, Gatehouse AHR, Gillian M D *et al.* Concanavalin a inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants, *Molecular Breeding*, 1999, **5**: 153~165
- [8] Rahbe Y, Sauvion N, Febvay G *et al.* Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, *Entomological and Experimental Application*, 1995, **76**: 143~155
- [9] Rinderie S J, Goldstein I J, Remsen E E *et al.* Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* Seeds, *Biochemistry*, 1990, **29**: 10555~10561
- [10] Raina A, Datta A *et al.* Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*, *PNAS*, 1992, **89**: 11774~11778
- [11] Transue T R, Smith A K, Mo H *et al.* Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* Agglutinin,

- [ 12 ] Paterson A H ,Brubaker C L ,Wendel J F *et al.* A rapid method for extraction of cotton ( *Gossypium* spp ) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis ,*Plant Molecular Biology Reporter* , 1993 ,**11**( 2 ) :122~127
- [ 13 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular cloning :a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [ 14 ] Li T Y( 李太元 ) ,Tian Y C( 田颖川 ) ,Qin X F( 秦晓峰 ) *et al.* Transgenic tobacco plants with efficient insect resistance ,*Science in China*( series B ) ,1994 ,**37** :1479~1489
- [ 15 ] Jia P X( 贾盘兴 ) ,Cai J K( 蔡金科 ) ,Ma D X( 马德钦 ) *et al.* Experimental methods of microbiological genetics( 微生物遗传学实验技术 ) ,Beijing :Science Press ,1992 ,pp. 108~109
- [ 16 ] Tian Y C( 田颖川 ) ,Qin X F( 秦晓峰 ) ,Xu B( 许丙寅 ) *et al.* Insect resistance of transgenic tobacco plants expressing  $\delta$ -endo-toxin gene of *Bacillus Thuringiensis* ,*Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ) ,1991 ,**7** :1~10
- [ 17 ] Simpson C G ,Clark G ,Davidson D *et al.* Mutation of putative branch point consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency ,*Plant Journal* ,1996 ,**9**( 3 ) :369~380

## Cloning of *AHA* Gene from *Amaranthus hypochondriacus* and it's Aphid Inhibitory Effect in Transgenic Tobacco Plants

ZHOU Yong-Gang TIAN Ying-Chuan\* MANG Ke-Qiang

( Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China )

**Abstract** Using total DNA isolated from *Amaranthus hypochondriacus* as template ,*Amaranthus hypochondriacus* agglutinin *AHA* gene was amplified by PCR and cloned. Sequence analysis results showed that this gene is consisted of 2453 base pairs including one 1538 bp intron and two exons of 212 bp and 703 bp respectively. After inverse PCR amplification ,coding region of *AHA* gene was obtained. *AHA* gene with it's intron( *AHAg* ) and without intron( *AHAc* ) were inserted downstream of 35S promoter in the binary vector pBin438 resulting in the construction of two plant expression vectors pBAHAg and pBAHAc respectively. Leave explants of *Nicotinana tabacum* var. SR1 were transformed with *A. tumefaciens* LBA4404 harbouring the above expression vectors. Results from PCR and Southern blot analysis showed that *AHA* genes were inserted into the genome of transformed tobacco plants. Immunodot blot analysis indicated that *AHA* was expressed in transgenic plants. The results from insect bioassay with peach aphid( *Mizus persicae* ) showed that the transgenic plants of pBAHAg and pBAHAc were aphid resistant , evidenced by a 57%~48% reduction in insect population density , some plants were more than 85% . The aphid resistance of transgenic plants transformed with *AHAg* gene as judged by aphid inhibition rate was higher than that of plants transformed with *AHAc* gene indicating that the intron in *AHAg* may be favorable for expression of *AHA* in transgenic plants.

**Key words** *AHA* gene , transgenic tobacco , aphid resistance

Received : June 12 , 2000

This work was supported by the State " 863 " High-Tech Project ( Grant No. 217-01-01 ) and Partly by the World Laboratory of the International Center of Science and Culture ( ICSC ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62550187 ; Fax 86-10-62560912 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>