

高效 Bt 抗虫基因表达结构的构建及其在转基因烟草中表达行为的研究*

石春林 朱 祯^① 肖桂芳 Illimar Altosaar^② 冯平章^③

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 构建了高效植物表达载体 pBinMoBc,其携带有超强表达复合启动子 OM 及 Ω 因子控制下的 *CryIA(c)* 基因,作为对照,本实验构建了含有 CaMV35S 启动子控制下的 *CryIA(c)* 基因的植物表达载体 pBinoBc。分别使用两个植物表达载体转化烟草,ELISA 检测表明,在 pBinMoBc 转基因烟草中 *CryIA(c)* 基因的平均表达水平是 pBinoBc 的 2.44 倍,最高可达可溶蛋白的 0.255%。抗虫检测结果表明,pBinMoBc 转基因烟草与 pBinoBc 转基因烟草相比,具有更强的抗棉铃虫效果。上述结果表明,OM 启动子比 CaMV 35S 启动子更具有实际应用价值,此结果在植物抗虫基因工程研究中具有重要意义。

关键词 转基因植物,抗虫基因,复合 OM 启动子,抗虫检测

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0422-27

虫害一直是农业生产中的一大危害,因此采取有效措施控制虫害对农业生产至关重要。目前,除普遍采用的化学杀虫剂控制虫害外,推广使用抗虫转基因作物越来越受到了人们的重视。抗虫基因工程研究中存在的主要问题之一,是外源抗虫基因在转基因植物中表达水平低^[1],因而转基因作物的抗虫效果往往不理想,同时还易使昆虫对抗虫蛋白产生耐受性等。因此,外源基因高效表达的研究对培育抗虫转基因作物具有重要的意义。有多种策略可以用于提高外源基因表达量,如采用强启动子^[2-5]、mRNA 5'端非翻译序列^[6]、内含子^[7],以及对基因进行改造修饰^[8]等。本研究采用复合 OM 启动子和 Ω 因子控制 Bt 毒蛋白基因 [*CryIA(c)* 基因],通过提高基因的转录水平达到提高抗虫蛋白的表达水平,进而提高转基因植物抗虫性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒:质粒 pUBc 由 Ottawa 大学生化系 Altosaar 教授惠赠,其携带有人工合成的 *CryIA(c)* 基因;质粒 pSpATC 由本室构建,其上含有 OM 启动子,OM 启动子由本实验室与中科院微生物所共同构建;菌株 *E. coli*DH5 α 、*Agrobacterium tumefaciens*

* 国家高技术研究发展计划项目,国家自然科学基金资助项目(No. 3958012)。

① 责任联系人, Tel (010) 64873490 E-mail: jgmlzz@mimi.cnc.ac.cn.

② Department of Biochemistry, Ottawa University.

③ 中国农业科学院植物保护研究所。

收稿日期:1999-01-29,修回日期:1999-06-23。

LBA4404 及实验中所用其它质粒由本实验室保存。

1.1.2 受体植物: 4~5 叶期的无菌培养烟草(*Nicotiana tabacum* K326)。

1.1.3 测试昆虫: 二龄初棉铃虫(*Heliothis armigera*, Hubner), 由中国农业科学院植保所基调室提供。

1.1.4 生化试剂: 实验中所用酶购自华美公司和 Bio-Labs 公司; Bt 毒蛋白标准品及 Bt 毒蛋白抗体由北京大学生态教研室许崇任教授惠赠; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自中山公司; 其它试剂购自 Sigma 公司或国内有关厂家。

1.1.5 PCR 引物: 由上海生工生物有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 植物表达载体的构建: 植物表达载体 pBinMoBc 的构建过程如下: 用 *Pvu* II 和 *Xba* I 双酶切质粒 pSpATC, 电泳回收 1.1kb 的含有复合启动子 OM(P_{OM}) 的片段, 用 Klenow 酶补平, 并将其插入到平端的 pBPF Ω 7 的 *Bgl* II/*Sac* I 片段 (3.6kb) 中, 获得重组质粒 pMo, 其携带有 P_{OM} - Ω - T_{NOS} 结构; 用 *Bam* HI 和 *Eco* RI 双酶切 pUBc, 回收含有 *Cry* IA(c) 基因的 1.85kb 片段, 补平后插入到 pMo 的 *Sma* I 位点, 由此得到质粒 pMoBc, 其携带有 P_{OM} - Ω -*Cry* IA(c)- T_{NOS} 结构, 酶切后回收 4.2kb 含有上述结构的 pMoBc/*Sal* I 片段, 并将其插入到 Ti 质粒 pBin19 T-DNA 区的 *Sal* I 位点, 得到植物表达载体 pBinMoBc

(见图 1. a)。植物表达载体 pBinoBc 的构建过程如下: 用 *Bam* HI 和 *Eco* RI 双酶切 pUBc, 回收含有 *Cry* IA(c) 基因的片段 (1.85kb), 插入到 pBPF Ω 7 的 *Bam* HI/*Eco* RI 位点, 获得质粒 pBoBc, 其携带有 P_{35S} - Ω -*Cry* IA(c)- T_{NOS} 结构; 用 *Sal* I 酶切 pBoBc 后回收含有上述结构的片段 (3.9kb), 并插入到 pBin19 的 *Sal* I 位点, 得到植物表达载体 pBinoBc (见图 1. b)。

将上述两个载体导入到根农杆菌 LBA4404 中, 使用 BIO-RAD 公司的电激仪进行转化, 感受态细胞的制备和电激方法按照产品说明书进行。

1.2.2 烟草转化及再生: 采用叶盘法转化烟草, 具体方法参照文献 [9]。

1.2.3 转基因烟草的 PCR 检测: 植物 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法 [10], 并参照分子克隆 [11] 的方法进行 PCR 扩增。

1.2.4 Bt 毒蛋白的 ELISA 检测: ELISA 检测按照北京大学生态教研室许崇任教授提供的方法进行。

1.2.5 抗虫检测: 移栽于花盆中转基因烟草长至 7~8 叶期时, 取生长位置一致、充分展开的叶片, 平均分为 3 份, 置于平皿中。每皿接二龄初棉铃虫幼虫 10 头, 将平皿置于温箱

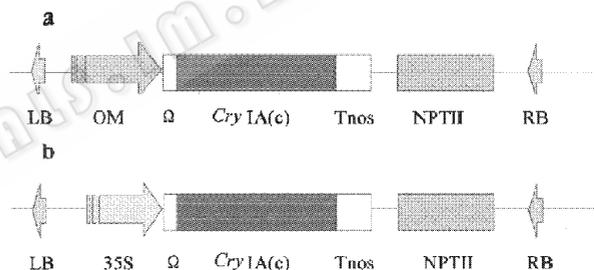


图 1 a 植物表达载体 pBinMoBc (a) 和 pBinoBc (b) 的结构

Fig. 1 A structure of plant expression vector pBinMoBc (a) and pBinoBc (b)

LB-Left border of T-DNA, RB-Right border of T-DNA, OM-the chimeric OM promoter, 35S the CaMV 35S promoter, Ω -TMV Ω factor, *Cry* IA(c)-*Cry* IA(c) gene, *Tnos*-Nopaline synthetase gene terminator, *NPTII*-Neomycin phosphotransferase gene.

中(25℃,光/暗周期为14/10h)培养。于接虫后的第3天、第5天、第7天观察结果,并统计死亡率。通过对死亡率的分析评价转基因植株的抗虫能力^[12]。

2 结果和讨论

2.1 植物表达载体的构建

苏云金杆菌毒蛋白基因,即 Bt 毒蛋白基因是广泛应用的抗虫基因,其中 *CryIA(c)* 基因对鳞翅目害虫,如棉铃虫等具有特异的杀虫活性。本实验构建了植物表达载体 pBinMoBc(见图 1.a),载体 pBinMoBc 含有高效复合 OM 启动子控制下的 *CryIA(c)* 基因,转译增强序列- Ω 因子以期进一步提高 *CryIA(c)* 基因在植物体内的表达量;作为对照,本实验还构建了植物表达载体 pBinoBc(见图 1.b)除使用 CaMV 35S 启动子替换了 OM 启动子外,pBinMoBc 和 pBinoBc 其他序列完全相同。

2.2 转化烟草的获得

植物表达载体经叶盘法转化烟草后,共获得 28 株转 pBinMoBc 的转基因烟草和 17 株转 pBinoBc 的转基因烟草。在植株长到 7~8 叶时期,进行抗虫测试和 ELISA 检测。



图 2 转基因烟草的 PCR 检测

Fig.2 Detection of transgenic tobacco by PCR

DNA templates come from plasmid pBinMoBc(A),wild type tobacco as control(C)and pBinMoBc transgenic plants(D to H).B: BstEII digested λ DNA as molecular weight marker.

2.4 Bt 毒蛋白含量 ELISA 检测结果

对转基因烟草进行 Bt 毒蛋白 ELISA 检测,pBinMoBc 转基因烟草中 Bt 毒蛋白的含量普遍超过 pBinoBc 转基因烟草。文献 13 报道 Bt 毒蛋白含量达到 0.05% 以上就能够有效地杀死受试虫,而本实验中,平均本底为 0.035%,由转基因植株 Bt 毒蛋白含量分布可以看出(表 1),pBinMoBc 转基因烟草中 Bt 毒蛋白含量明显比 pBinoBc 转基因烟草高。而在单株 pBinMoBc 转基因烟草中最高者表达量可达可溶性蛋白的 0.255%,表明复合 OM 启动子能够在蛋白质水平上大大提高外源基因的表达量。

复合 OM 启动子来自根农杆菌,由 3 个重复的 OCS 上游增强序列及 MAS 启动子组成(OCS)₃MAS],文献 5 报道类似的启动子强度是 CaMV35S 启动子强度的 100 多倍。本实验中,若除去平均本底的影响,pBinMoBc 转基因烟草中的 Bt 毒蛋白平均含量约是 pBinoBc 转基因烟草 Bt 毒蛋白平均含量的 2.44 倍,这与文献报道的结果相差很大,但

2.3 转基因烟草 PCR 检测结果

对所获得的 pBinMoBc 转基因烟草进行 PCR 分析,扩增产物分子量为 740bp,作为阳性对照的 pBinMoBc 也扩增出了同样大小的条带,而作为阴性对照的野生型烟草样品未扩增出任何条带。引物 A 与 OM 启动子序列互补,引物 B 与 *CryIA(c)* 基因 5' 端序 291-310 序列互补,扩增产物包含部分 OM 启动子序列和部分 Bt 基因序列,理论值应为 740bp,与我们所获得的结果一致,表明转基因植株中存在有目的基因(图 2)。

表 1 转基因植株 Bt 毒蛋白含量分布

Table 1 Content distribution of Bt toxin in transgenic tobaccos

Content of Bt toxin/%	>0.1	0.06~0.1	<0.06
Control tobaccos/%	0	0	100
pBinoBc transgenic tobaccos/%	17.65	58.82	23.53
pBinMoBc transgenic tobaccos/%	57.14	7.14	35.71

考虑到其它文献^[6]报道 Ω 因子能够大大提高外源基因表达量,因此 Ω 因子的存在可能是造成这种不符的主要原因。

2.5 抗虫检测结果

2.5.1 转化烟草与非转化烟草的抗虫性差异:本实验中,大多数转化烟草都表现出非常好的抗虫性,而非转化对照则无抗性(图 3 A)。



图 3 转基因烟草的抗虫检测

Fig. 3 Bioassay on transgenic tobacco

Left :Transgenic plant ;Right :CK. Second instar larvae of cotton bollworm were used as challenging pest ,picture was taken 5 days after infection.

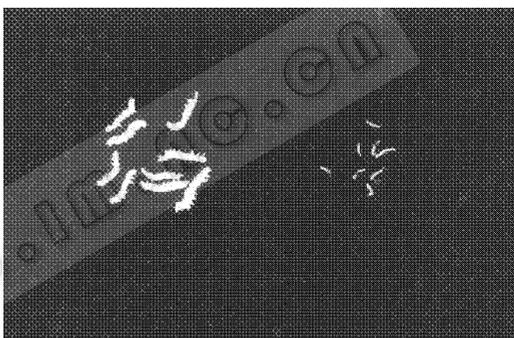


图 4 棉铃虫的生长状况

Fig. 4 Growth stage of bollworm larvae

Second instar larvae of cotton bollworm were used as challenging pest Left Larvae grow on wild type tobacco Right Larvae grow on transgenic plant. The picture was taken 5 days after infection.

2.5.2 抗虫检测结果分析:测试受试虫死亡率是衡量植株抗性水平最直观和最重要的指标。比较单株烟草上受试虫的死亡率,可见转基因烟草上受试虫的死亡率要大大高于对照烟草,而 pBinMoBc 转基因烟草上受试虫死亡率又明显高于 pBinoBc 转基因烟草上受试虫的死亡率(图 5)。

选取转基因烟草中约 35% 抗性最好的转基因植株及 5 株对照,比较接虫后不同时间的死亡率,结果转基因烟草对受试虫的抗性远较对照为高,pBinMoBc 转基因烟草最初对受试虫的抗性大大高于 pBinoBc 转基因烟草(图 6)。转基因烟草对棉铃虫的抗性与转基因烟草中 Bt 毒蛋白的含量密切相关,虽然 pBinMoBc 转基因烟草和 pBinoBc 转基因烟草在生物检测后期都表现出很好的抗性,但 pBinMoBc 转基因烟草能够使测试虫更快地死亡,所以 pBinMoBc 转基因烟草中的 Bt 毒蛋白含量要普遍高于 pBinoBc 转基因烟草。这样,由于 pBinMoBc 转基因烟草使受试虫死亡更快,就能够降低害虫对植株的危害程度,并能延缓害虫对 Bt 毒蛋白抗性的产生。上述结果表明,pBinMoBc 转基因烟草与 pBinoBc

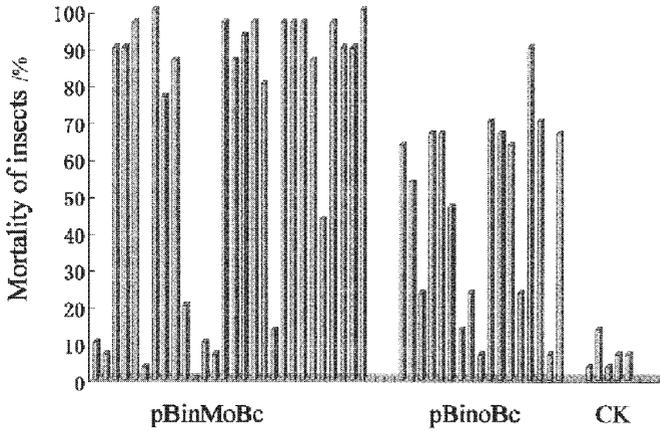


图 5 接虫 3d 后单株烟草上的受试虫死亡率

Fig.5 Mortality of challenging insects on individual tobacco at 3 days after infection

pBinMoBc :pBinMoBc transformed tobaccos ;pBinoBc :pBinoBc transformed tobaccos ;CK :Wild type tobacco as control.

转基因烟草相比,具有更强的抗虫效果。

3 展 望

Bt 基因是国内外应用最为广泛的抗虫基因,不同 Bt 菌株可分别对鳞翅目、双翅目等昆虫具有特异的杀虫活性,且不污染环境,不破坏生态平衡和影响农产品的品质。孟山都公司采用 CaMV 35S 启动子控制的 Bt 基因转化棉花获得转基因棉花并取得了大面积的推广,抗

虫效果显著。而本实验构建的含复合 OM 启动子的植物表达载体 pBin-MoBc 与含 CaMV 35S 启动子的植物表达载体 pBinoBc 相比,在烟草中能够大大提高 Bt 毒蛋白的表达量,转基因植株子代遗传分析及纯合系的培育工作正在进行,以进一步确定其抗虫性及稳定性。另外,植物表达载体 pBin-MoBc 棉花转化工作正在进行之中,可望在抗虫基因工程应用领域有所进展,培育出国内自己的高抗虫性转基因棉花,详细工作将另文发表。

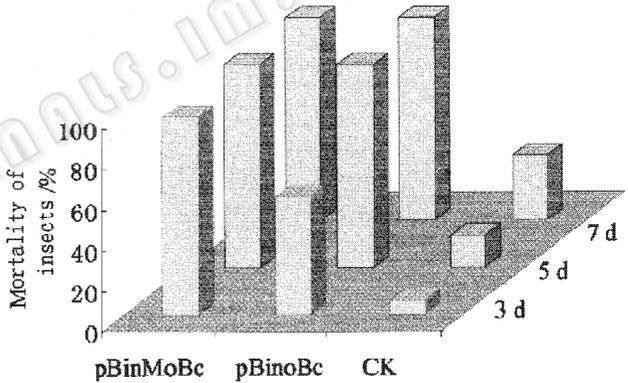


图 6 生长在不同类别转基因烟草上的测试虫平均死亡率比较

Fig.6 Comparing of the average mortality of challenging insect on transgenic tobacco caring different transgene pBinMoBc :pBinMoBc transgenic tobacco ;pBinoBc :pBinoBc transgenic tobacco ;CK :Wild type tobacco as control. About top of 35% the best insecticidal transgenic plants ,10 of 28 for pBinMoBc transgenic tobacco and 6 of 17 for pBinoBc transgenic tobacco ,were selected and used in this experiment. The mortality was counted at 3,5 and 7 days respectively after infection.

致 谢 中国农科院植保所徐 军同志在抗虫检测方面提供帮助,北京大学生态教研室许崇任教授和张小四同学在 ELISA 检测方面提供帮助,质粒 pUBc 由 Altosaar 教授惠赠,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] D. A. Fischhoff ,D. S. Bowdish ,F. J. Perlak *et al.* *Bio/Technology* ,1987 **5** :807~813.
- [2] A. H. Christensen ,R. A. Sharrock ,P. H. Quail. *P M B* ,1992 **18** :675~689.
- [3] M. Ohshima ,M. Ugaki ,T. Murakami *et al.* *Plant Cell Physiol* ,1993 ,Vol. **35** Supplement.
- [4] L. Comai ,P. Moran ,D. Maslyar. *P M B* ,1990 **15** :373~381.
- [5] M. Ni ,D. C. Cui ,S. B. Gelvin. *P M B* ,1996 **30** :77~96.
- [6] D. R. Gallie ,D. E. Sleat ,J. W. Watts *et al.* *Nucleic Acids research* ,1987 **15** :3257~3273.
- [7] C. Maas ,J. Laufs ,S. Grant *et al.* *P M B* ,1991 **16** :199~207.
- [8] F. J. Perlak ,R. L. Fuchs ,D. A. Dean *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,1991 **88** :3324~3328.
- [9] 高越峰 ,朱 祯 ,王 伟等 *植物学报* ,1998 **40**(5) :405~411.
- [10] 王 伟 ,朱 祯 ,高越峰等 *高技术通讯* ,1998 **8**(5) :1~5.
- [11] J. Sambrook ,E. F. Fritsch ,T. Maniatis *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory , New York ,1989.
- [12] 冯平章 ,王 音 ,曹 煜等 *植物保护学报* ,1997 **24**(4) :331~335.
- [13] F. J. Perlak ,R. W. Deaton ,T. A. Armstrong *et al.* *Bio/Technology* ,1990 **8** :939~943.

Construction of Plant Vectors with High Level Expression of Bt Toxin Gene and Studies on Their Expressions Behavior in Transgenic Tobaccos*

Shi Chunlin Zhu Zhen Xiao Guifang Illimar Altosaar Feng Pingzhang

(*Institute of Genetics ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100101*)

Abstract Breeding pest resistant plants using plant genetic engineering technique is an effective strategy in the integrated pest management (IPM). Increasing the expression level of foreign insecticidal protein by using strong promoter is a useful method. In this work ,a plant expression vector ,pBinMoBc ,was constructed. It contained the *CryIA(c)* gene under control of chimeric OM promoter and the Ω factor. An another vector ,pBinoBc ,was also constructed in this study. pBinoBc caring *CryIA(c)* gene was under control of CaMV 35S promoter. The vectors were transformed into tobacco respectively. ELISA assay showed that the expression level of the *CryIA(c)* gene in pBinMoBc transgenic tobacco plants is 2.44-times that in pBinoBc transgenic tobacco plants ,the expression level of Bt toxin can be up to 0.255% of total soluble proteins. Bioassay showed that pBinMoBc transgenic tobacco plants had more notable insecticidal effects than pBinoBc transgenic tobacco plants. The above result showed that the chimeric OM promoter is a stronger promoter than CaMV 35S promoter that was widely used in plant genetic engineering ,and this is very useful in pest resistant plant genetic engineering.

Key words Transgenic plant ,insecticidal gene ,chimeric promoter ,bioassay

* Supported by the High Technology Research and Development Programme of China and the National Natural Science Foundation of China (No. 3958012).