

农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达

项友斌¹ 梁竹青¹ 高明尉¹ 舒庆尧¹ 叶恭银² 成雄鹰^{1,3} I. Altosaar³

¹浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

²(浙江大学植物保护系 杭州 310029)

³(加拿大渥太华大学生化系农业生物技术实验室)

摘 要 通过农杆菌介导法用含有抗潮霉素和 GUS 基因的双元载体将杀虫结晶蛋白基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 导入到籼、粳稻幼穗愈伤组织中,然后经过在含有不同浓度潮霉素的培养基上进行数次筛选,获得一批 Bt 转基因株。经 PCR、Southern 杂交及 Western 印迹分析证实此二基因已整合进水稻中,饲虫试验结果表明,转基因株具有 100% 杀虫率。

关键词 水稻,农杆菌介导法,Bt 杀虫基因,杀虫蛋白表达,螟虫饲喂试验

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0494-99

水稻遗传转化一直受到广泛重视。利用水稻原生质体的 PEG 法^[1]、电激法^[2]、粒子枪注射法^[3]等已实现了水稻外源基因的转化。近几年农杆菌在水稻的遗传转化上也得到较大成功^[4~6]。

苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 所产生的伴孢晶体蛋白,对许多害虫特别是鳞翅目害虫有很强的杀伤性,但对人、畜无害^[7]。90 年代以来,许多实验室对 Bt 晶体蛋白基因进行了改良和密码子优化的工作^[8~11],使得 Bt 基因在植物中得到了高效表达。利用 Bt 基因在水稻中的表达,已有成功控制螟虫为害的报道^[10~12]。

本文报道了利用农杆菌介导遗传转化方法,将密码子经过改良的抗虫 Bt 基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 导入水稻,并成功地实现了表达。

1 材料与方 法

1.1 水稻材料及离体培养

本研究采用了 3 个粳稻品种(系):秀水 11,浙梗 187, RM2; 2 个籼稻品种(系):新光 S 和浙 733 为试材。所用培养基为 LS, 附加 2.0 mg/L 2,4-D。先在 25℃ 黑暗条件下培养 3~4 周,继代 1 次,培养 3~4 周。取生长旺盛、呈黄白色的愈伤组织与农杆菌共培养。

1.2 双元载体和农杆菌菌株及其培养

本研究采用的双元载体为 pMOG410, PKUB 和 pKUC(见图 1)。pMOG410^[13] 的 T-DNA 区内存在着含有内含子的 GUS 基因和抗卡那霉素基因。pKUB 和 pKUC 来自加拿大渥太华大学生化系^[14], 它们的 T-DNA 区内分别含有来自玉米的启动子 Ubiquitin 驱

动的 *cryIA(b)* 或 *cryIA(c)*, 以及由启动子 CaMV35S 驱动的抗潮霉素(Hygromycin)的 *hph* 基因和抗卡那霉素的 NPT II 基因以及 GUS 基因。这三个双元载体的基本骨架均为 pBin19, 载体的 T-DNA 区的结构参见图 1。

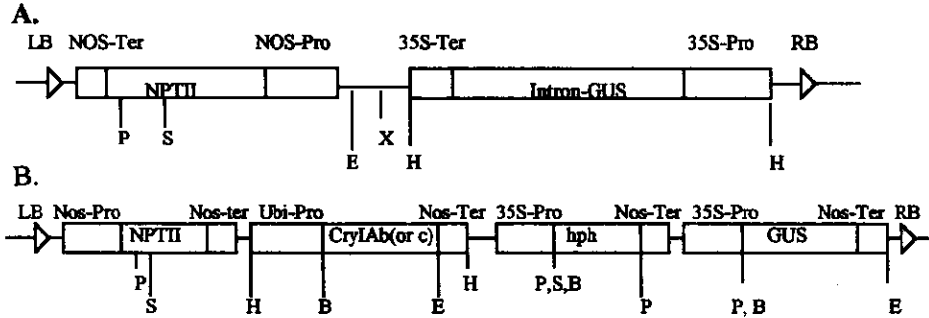


图 1 用于水稻转化的农杆菌中的双元载体 T-DNA 区

Fig. 1 T-DNA regions of binary vectors for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (A) Binary vector pMOG410; (B) Binary vector(s) pKUB or PKUC, containing *B. t.* *cryIA(b)* or *cryIA(c)* gene. LB: Left border; RB: Right border, Nos-pro: nopaline synthase promoter; Nos-ter: Nos terminator; Hph: hygromycin-phosphotransferase, NPT II: Neomycin phosphotransferase. 35 S-pro: CaMV 35S promoter; 35S-ter: CaMV35 S terminator; Ubi-Pro: maize ubiquitin promoter, H: *Hind* III; B: *Bam* HI; E: *Eco*RI; Sequence outside of the T-DNA is identical to pBin19.

本试验所用农杆菌菌株为 EHA105^[15], MOG301 和 MOG101^[10]。首先挑取单菌落在加有抗生素的 5mL YEP 培养液中生长过夜, 取细胞悬浮液加入含有 100mg/L 卡那霉素的 AB 培养基中, 在 25℃ 条件下培养至光密度 OD_{600} 0.9 左右时, 再在 4℃ 下, 经 400r/min 离心收集细胞, 然后用相同的 AB 培养基, 并附加 2 mmol/L MFS (pH5.6), 200 μ mol/L 乙酰丁香酮, 将细胞重悬至 OD_{600} 0.5 左右, 然后在 25℃ 条件下振荡培养过夜, 以诱导 *vir* 基因活化。

1.3 植物转化与筛选

经培养与预诱导的农杆菌细胞悬液, 在 4℃ 条件下, 经 4000r/min 离心收集, 重悬于 AAM (pH5.6)^[6] 培养基中, 至细胞密度为 $OD_{600} \approx 0.5$ 时, 用于与愈伤组织共培养, 经静置 10~20 min 后, 转置于 LS^[16] + 4.0 mg/L 2, 4-D + 100 μ mol/L 乙酰丁香酮的培养基上, 培养 2~3d。用含有 200mg/L Ticarcillin 的无菌水冲洗愈伤组织 3 次, 吸干后转置于含有 200mg/L Ticarcillin 的培养基上分别进行培养或筛选。对于 pMOG410 转化的愈伤组织, 则置于 LS + 2.0 mg/L 2, 4-D + 25 mg/L Hygromycin + 200mg/L Ticarcillin (LSH₁) 的低压筛选培养基上, 培养 10 d 后转培于含有 100 mg/L Hygromycin 的相同培养基 (LSH₂) 上进行第一轮筛选; 经 4 星期后, 再进行第二轮筛选 (2~3 星期), 那些生长正常的抗性愈伤组织, 便可转入 LS + BAP 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 200 mg/L Ticarcillin + 50 mg/L Hygromycin 的分化培养基 (LSHR) 上进行植株再生。当分化长出的苗长至 3~5 cm 高时, 转入 1/2MS + 500 mg/L Hygromycin + 200mg/L Ticarcillin 培养基上培养 2~3 周, 使其长根, 接着移入土壤中生长。

1.4 GUS 活性检测

经农杆菌感染的愈伤组织和再生植株的叶片的 GUS 活性检测,采用 X-Gluc(5-溴-4-氯-3-indolyl glucuronide)染色方法进行。

1.5 *cryIA(b)*和*cryIA(c)*的 PCR 分析

对 GUS 染色呈阳性的水稻转基因株试管苗,利用 Steiner^[17]方法提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增。*cryIA(b)*的扩增产物为 0.952 kb 片段,*cryIA(c)*为 0.588kb。扩增反应条件为:94℃ 3 min,40℃ 2min,72℃ 2min 一个循环,94℃ 1min,40℃ 2min,72℃ 1min,30 个循环,最后 72℃ 7 min。但在扩增 *cryIA(c)*时退火温度为 54℃。

1.6 Southern 杂交分析

从 PCR 为阳性的植株中随机选转化株进行 Southern 杂交分析。按 Ishii^[18]的方法,提取 DNA,用 *Hind*Ⅲ 完全消化,在 0.8% 的琼脂糖凝胶上将酶解的 DNA 以及未酶解的基因组 DNA 经电泳分级,用标准 Southern 印迹方法^[19]进行转移。以完整的 *cryIA(b)*和 *cryIA(c)*基因为探针,采用随机引物方法标记该两探针。预杂交、杂交和洗膜,均按 Boehringer Mannheim 公司试剂盒提供的方法进行,最后在含有 NBT 和 BCIP 的染色液中显色。

1.7 Western 印迹分析

转基因植株叶片在液氮中充分磨碎后,加入 Bt 蛋白提取液(6 mol/L 尿素,0.28 mol/L 巯基乙醇,0.05 mol/L NaHCO₃, pH9.5)进一步匀浆。匀浆液离心后,收集上清液,在 10%SDS-PAGE 胶上电泳,并将蛋白转移至硝酸纤维膜上,再在 TSW 溶液中慢速振荡 1 h,弃去 TSW 液,加入含有 1:2000 抗 Bt δ -内毒素的抗血清的 TSW 溶液,慢速振荡 1 h,用 TSW 液洗膜 3 次,接着用含有 1:2000 碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 多抗的 TSW 振荡培养,用 TSW 洗 3 次,然后置于含有 NBT 和 BCIP 的染色液中,按标准方法显色^[19]。

1.8 饲虫试验

选用 R₀ 株的叶片、幼茎或植株在室内进行螟蛾科中的二化螟、三化螟、纵卷叶螟及稻切叶螟的饲喂试验,设置 3 次重复。在饲喂或接虫后的一定时期,记载幼虫死亡率。

2 结果与分析

2.1 影响农杆菌转化效率的因子

与前人大多数试验采用水稻成熟胚愈伤组织作受体不同,本试验采用幼穗愈伤组织进行农杆菌转化。通过 GUS 活性检测,调查适用于水稻转化的农杆菌菌株和适宜的转化水稻品种。表 1 指出,从 5 个供试品种来看,秀水 11、浙梗 187 和 RM2 等 3 个梗稻品种的转化频率要高于其它 2 个籼稻;从农杆菌菌株看,3 个农杆菌菌株中,以 EHA105 较好,其在 5 个品种中的平均转化率高达 47.2%。

2.2 抗潮霉素愈伤组织的筛选和转化植株的再生

对携有 pKUB 和 pPUC 的菌株 EHA105 所转化的水稻愈伤组织,先置于含有较低浓度的潮霉素的 LSH₁ 培养基上,进行一星期低压筛选,然后将所有愈伤组织转入含有较高浓度潮霉素的 LSH₂ 培养基上,进行二轮筛选。此时,大部分愈伤组织颜色逐渐变褐,结构疏松,但在有些愈伤组织表面,开始出现凸起的生长区域,呈黄白色,结构较致密。经一

表 1 不同水稻基因型及不同农杆菌菌株的转化效率的比较

Table 1 Comparison of genetic transformation frequency when various rice genotypes and different *Agrobacterium* strains were used^a

Genotype	EHA105		MOG301		MOG101		Total and w-mean ^c	
	No. calli ^b	GUS ⁺ %	No. calli	GUS ⁺ %	No. calli	GUS ⁺ %	Total	GUS ⁺ %
Xiushuili	103	53.4	83	37.3	92	21.7	278	39.1
Zhegen187	125	48.8	80	42.5	105	20.0	310	37.4
RM2	87	45.9	72	29.2	98	31.6	257	35.8
Xinguang S	96	47.9	103	30.1	81	16.0	280	33.1
Zhe733	101	39.6	94	18.1	90	11.1	285	26.0
Total	512	47.2 ^c	432	31.0 ^c	466	20.4 ^c	1410	34.3 ^c

a. Binary vector pMOG410 was used for all the three strains; b. number of calli tested; c. weighted mean.

表 2 采用农杆菌菌株 EHA105(内含 pKUB 或 pKUC)进行遗传转化和筛选的结果

Table 2 The results of genetic transformation and selection with strain EHA105 containing pKUB or pKUC

Genotype	Total calli	<i>cryIA(b)</i> or <i>cryIA(c)</i>	First selection		Second selection		Regeneration of Hyg ⁺ calli			
			Hyg ⁺ calli ^b	% ^a	Hyg ⁺ calli ^b	% ^b	No. shoots	%	Hyg ⁺	GUS ⁺ % ^c
Xiushuili	217	IAb	170	78.3	139	81.8	37	17.1	33	89.2
Zhengen187	185	IAc	100	54.1	72	72.0	26	14.1	19	73.1
RM2	150	IAb	68	45.3	53	77.9	12	8.0	12	100
Xinguang S	155	IAc	54	34.8	45	83.3	9	5.8	8	88.9
Zhe 733	162	IAc	54	33.3	47	87.0	3	1.9	3	100
Total	869	-	446	51.3	356	79.8	87	10.0	75	86.2

a. Percentage of the hygromycin resistant calli to the total calli.

b. Percentage of hygromycin resistant calli to the hygromycin resistant calli showing up in the first selection

c. Percentage of hygromycin resistant and GUS staining positive plantlets to the total regenerated green shoots

个月左右的第二轮筛选, 可将凸起的小愈伤组织转入新鲜的 LSH₂ 培养基上进行为期 3 周的第三轮筛选, 以便淘汰那些出现假抗性的愈伤组织, 并使小愈伤组织充分生长。此时, 大多数品种有 80% 以上的愈伤组织可以通过筛选(见表 2), 以后便可转入分化培养基(LSHR)进行植株分化。

2.3 转基因植株的 GUS 和分子生物学分析以及饲虫试验结果

对经过潮霉素抗性筛选再生的绿色植株取叶片进行 GUS 活性分析, 大多数再生植株叶片表现出深蓝色的 GUS 活性反应, 但也有少数植株无 GUS 表达。

从表 2 中可以见到, 5 个品种的 87 株再生株中, 只有 75 株具 GUS 阳性反应。对这类阳性株再进行 PCR 分析, 其中秀水 11 和 RM2 再生株均扩增出 0.95kb 的条带(图 2A), 用 pKUC 转化的浙梗 187、新光 S 和浙 733 再生株也全部扩增出 0.588kb 和 DNA 片段, 图 2B 显示其中浙梗 187 的 PCR 扩增结果。至于未经转化的对照植株均无扩增带(见图 2A、B)。

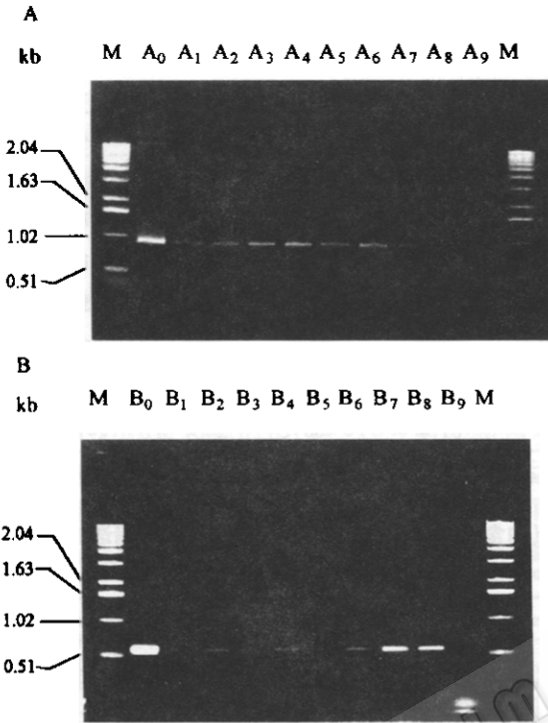


图 2 水稻基因组 DNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR analysis in rice transgenic plants(R₀)

(A) Lane A₀, PCR product (0.95 kb) of the plasmid containing *cryIA(b)* gene; M, 1kb DNA ladder; Lane A₁ - A₅, PCR products of transgenic plants from Xiushui 11; Lane A₆-A₈, transgenic plants from RM2; Lane A₉, Xiushui 11 (control). (B) Lane B₀, PCR product (0.588 kb) of the plasmid containing *cryIA(c)* gene; M, 1 kb DNA ladder; Lane B₁ - B₈, Transgenic plants from Zhegen 187; Lane B₉, Zhegen 187(control).

为了进一步确证 *cryIA(b)* 或 *cryIA(c)* 基因是否已整合到水稻基因组中, 试验中挑选了秀水 11 和浙梗 187 转化株中生长正常的 R₀ 植株, 进行 Southern 杂交分析。结果表明, 转基因株基因组 DNA 在未经任何酶切情况下, 均在大分子(50 kb 左右) 位置出现 DNA 杂交信号(见图 3); 经 *Hind* III 酶切则产生了 4.1kb 的 DNA 信号带。

对转基因株抗虫基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 的表达产物进行了 Western blotting 分析后, 发现在 Western 膜上都产生了大约 68 kD 的蛋白带(图 4), 但浙梗 187 的 TRC - 64 虽经 southern 杂交证实 *cryIA(c)* 基因的存在(图 3), 但其 Bt 蛋白表达水平极低, 几乎见不到带。

用秀水 11 转基因株叶片、幼茎及植株分别作螟蛾科各类害虫的饲喂试验, 其结果均获得 100% 杀虫效果(见表 3)。有关饲虫试验的详细情况, 将另作报道。

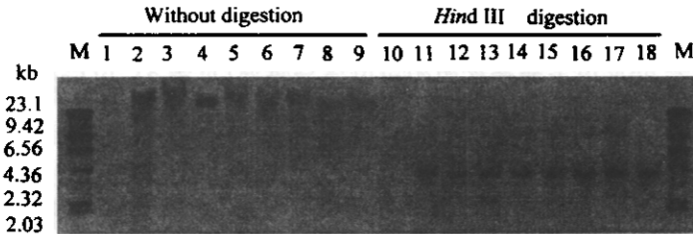


图 3 水稻 R₀ 转基因株基因组 DNA Southern 杂交分析

Fig. 3 Southern blotting analysis for genomic DNA of transgenic rice plants

M. λ DNA/*Hind* III DNA marker; Lane 1 and 10: Nontransformed plant of Xiushui 11(CK); Lane 2 and 11, Lane 3 and 12. Genomic DNA of *cryIA(b)*-transgenic plants GS - 5 and GS - 30 from Xiushui 11; Lane 4 and 13, genomic DNA of *cryIA(b)*-transgenic plant RT-1 from RM2; Lane 5 and 14, 6 and 15, 7 and 16, 8 and 17, 9 and 18: Genomic DNA of *cryIA(c)*-transgenic plants TR - 30 - 3; TR - 30 - 4, TRC - 64, TRC - 35 and C10 - 1, respectively.

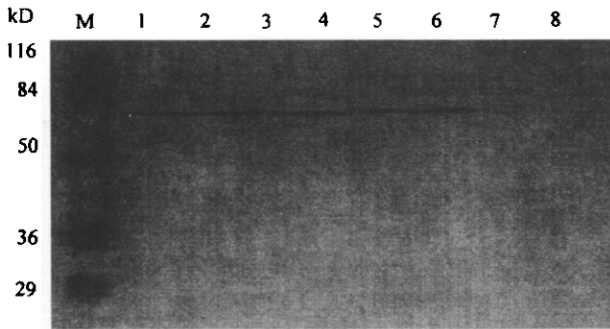


图4 水稻转基因株 Western 印迹分析

Fig.4 Western blotting analysis
to transgenic rice plants

M. Molecular weight marker; Lane 1 - 3. Xiushui 11 - derived transgenic plants, GS - 5, GS - 30 and GS - 30 - 6; Lane 4 and 5. RM2 - derived transgenic plants, RT - 1 and RT - 5; Lane 6 and 7. Zhengen 187-derived transgenic plants, TRC - 35 and TRC - 64; Lane 8. non-transformed Xiushui 11 plant (control).

用成熟种子的盾片愈伤组织, 获得了较高的转基因植株再生率。本研究选用幼穗愈伤组织也能高频率地实现转基因植株的再生, 可以认为, 水稻幼穗愈伤组织也应是农杆菌转化的理想受体。试验表明菌株 EHA105 具有比 MOG301 及 MOG101 更强的感染能力, 是水稻遗传转化的较佳菌株。这与前人的多数研究结果相一致^[15, 6, 5, 4]。

在本研究中, 通过抗潮霉素筛选的小部分植株却没有 GUS 基因表达, 这些可能都是逃逸株 (Escape), 但也可能是转化株成为嵌合体所致, 因为在一部分 GUS 阳性的转化植株中, 曾观察到叶片染色呈条纹嵌合情况。转基因株的嵌合体现象, 在遗传转化中应尽量设法防止。

本研究所得到的浙梗 187 的 *cryIA(c)* 基因转化株 TRC - 64, 虽经 PCR 分析和 Southern 杂交, 证实外源基因已整合到水稻基因组中, 但其表达水平极低。这在浙梗 187 的其他转化株中, 也有相同的情况。这些导入基因的表达障碍, 可能是导入基因的多拷贝导致基因沉默所致, 或由于其他因素如甲基化、共胁迫或基因重排以及受体的遗传背景等原因所致。导入基因的失活与沉默, 在转基因研究中已有很多报道^[21, 22], 其机理有待进一步深入研究。本试验大多数 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 转化的水稻植株, 经过 R₀ 代抗虫鉴定表明, 均表现出很强的抗虫性, 可供作螟虫抗源珍贵亲本, 在水稻育种中加以利用。

表3 用转基因株进行饲虫试验的结果

Table 3 The results of insect feeding
test with transgenic rice

Stem-borer species	Mortality rate of larvae	
	Transgenic rice/%	CK/%
Yellow rice stemborer	100	6.7
Striped rice stemborer	100	7.0
Rice case worm	100	11.1
Rice leaf-folder	100	9.7

3 讨论

前人在单子叶植物农杆菌转化研究上, 曾采用茎尖、幼胚等作为受体^[5, 20, 4], 其再生频率很低或不能得到转基因株。Hiei 等在水稻上^[6]改

参 考 文 献

- [1] Zhang W., R. Wu *et al.* *Theor. Appl. Genet.*, 1993, **76**: 835~838.
- [2] K. Toriyama, Y. Arimoto, H. Uchimiya *et al.* *Bio/technology*, 1988, **6**: 1072~1077.
- [3] Li L., R. Qu, A. De. Kochko *et al.* *Plant Cell Reports*, 1993, **12**: 250~255.
- [4] D. Raineri, M. P. Botlino, M. P. Gordon *et al.* *Bio/technology*, 1990, **8**: 33~38.
- [5] M. T. Chan, H. H. Chang, S. L. Ho *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1993, **22**: 491~506.

- [6] Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari *et al.* *Plant J*, 1994, **6**(2): 271 ~ 282.
- [7] H. Hofte, H. R. Whiteley. *Microbiol. Review*, 1989, **53**: 242 ~ 255.
- [8] F. J. Perlak, R. L. Fuchs, D. A. Dean *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**: 3324 ~ 3328.
- [9] M. J. Adang, M. S. Brody, G. Cardineau *et al.* *Plant Molecular Biology* 1993, **21**: 1131 ~ 1145.
- [10] H. Fujimoto, K. Itoh, M. Yamamoto *et al.* *Bio/technology*, 1992, **11**: 1151 ~ 1155.
- [11] J. Wunn, A. Kloti, P. K. Burkhardt *et al.* *Bio/technology*, 1996, **14**: 171 ~ 176.
- [12] Wu. C, Y. Fan *et al.* *Plant cell Reports*, 1997, **17**: 129 ~ 132.
- [13] E. Hood, S. G. Gelvin, L. S. Melchers *et al.* *Transgenic Research*, 1993, **2**: 208 ~ 218.
- [14] Cheng X, R. Sardana, H. Kaplan *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **95**: 2767 ~ 2772.
- [15] Li X. Q, C. N. Liu, S. W. Rithie *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1992, **20**: 1037 ~ 1048.
- [16] E. M. Linsmaier, F. Skoog, *Physiologia Planetarium*, 1965, **18**: 100 ~ 127.
- [17] J. J. Stainer, C. J. Poklemba, R. G. Fjellstrom *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**(13): 2569 ~ 2570.
- [18] T. Ishii, O. Panaud, D. S. Brar *et al.* *Plant Molecular Biology Reporter*, 1990, **8**(3): 167 ~ 171.
- [19] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edi. Cold Spring Harbour, N Y. 1989, pp. 897 ~ 898.
- [20] J. Gould, M. Devey, O. Hasegawa *et al.* *Plant Physiol*, 1991, **95**: 426 ~ 434.
- [21] J. Finnegan, D. McElroy. *Bio/technology*, 1994, **12**: 883 ~ 888.
- [22] Meyer P. *Trends in Biotech*, 1995, **13**: 332 ~ 337.

Agrobacterium-mediated Transformation of Insecticidal *Bacillus thuringiensis* *cryIA(b)* and *cryIA(c)* Genes and Their Expression in Rice

Xiang Youbin¹ Liang Zhuqing¹ Gao Mingwei¹ Shu Qingyao¹ Ye Gongyin²
Cheng Xionggying^{1,3} I. Altosaar³

¹(Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

²(Department of plant protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

³(Department of Biochemistry, University of Ottawa, Canada)

Abstract The insecticidal *Bacillus thuringiensis* (Bt) *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes carried in the T-DNAs of binary vectors which contain hygromycin resistance gene and GUS gene, were used to transform the callus of rice young inflorescences via *Agrobacterium* transformation. Both of the insecticidal genes were successfully integrated into the genome of japonica and indica rice. Through stringent selection of the infected calli on the medium added with hygromycin, the transgenic rice plants were regenerated from the hygromycinresistant calli. The results of molecular biological assays with PCR and Southern hybridization confirmed that the *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes were integrated into the genome of rice. Western blotting analysis for the transgenic plants showed that *cryIA(b)* and *cryIA(c)* gene expressed and produced Bt protein. 100% mortality rate was observed when stemborers were fed on the stems or leave from the transgenic rice.

Key words Rice, agrobacterium-mediated method, Bt insecticidal gene, insecticidal protein expression, stemborer feeding test