

转抗虫融合基因(*cry1Ac3-cpti*)玉米(*Zea mays* L.)植株的获得及其抗虫性分析*

李慧芬 刘翔 曲强 邓朝阳 路子显

陈宛新 徐鸿林 朱祯**

中国科学院遗传研究所, 北京 100101

摘要 将苏云金杆菌家族中的 *cry1Ac3* 基因与豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)融合成融合基因, 构建 *cry1Ac3-cpti* 融合基因植物表达载体, 表达 Bt-CpTI 抗虫融合蛋白. 用基因枪转化技术将 *cry1Ac3-cpti* 融合基因分别导入玉米优良自交系 E28 及 340 的胚性愈伤组织中, 轰击后的愈伤组织经筛选剂 3 次筛选, 获得可育的再生植株. 经 PCR 及 Southern blot 分子检测, 证实所获得的再生植株为转基因植株. 抗虫性分析结果表明, 部分转基因玉米植株对玉米螟虫有较强的抗性.

关键词 融合基因 转基因玉米 基因枪 抗虫性

近年来, 抗虫植物基因工程研究取得了许多重要进展, 已获得了大量有应用价值的抗虫基因及转基因植株, 部分转基因产品已投入商品化生产. 如转苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)毒蛋白基因抗虫玉米(Bt 玉米)及棉花(Bt 棉)于 1996 年开始在美国进入商业化应用^[1]. 然而, 由于害虫易对 Bt 毒蛋白产生耐受性, 从而影响其在田间的防治效果和可持续应用. 目前, 控制害虫对 Bt 毒蛋白产生耐受性的一种方法是在大面积种植转 Bt 毒蛋白基因植物的地区, 种植一些易感虫品种, 给害虫提供“避难所”, 防止转基因作物对害虫产生过高的选择压力, 从而降低害虫产生抗性的可能性. 除此之外, 联合使用多个抗虫基因, 也是防止害虫产生耐受性的一个重要策略. 豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)是一种重要的抗虫物质, 对主要农作物害虫包括大部分的鳞翅目害虫和部分鞘翅目害虫都有抑制作用. 与 Bt 毒蛋白相比, CpTI 作用于害虫消化酶的特定部位, 此部位具有高度的保守性, 不易产生突变, 因而害虫不易对 CpTI 产生耐受性. 因此, *cpti* 基因在植物抗虫基因工程中得到广泛的应用, 尤其是与

Bt 毒蛋白基因联合使用受到人们的高度重视^[2].

我们曾将 Bt 毒蛋白基因家族中 *cry1Ac3* 基因和 *cpti* 基因修饰成融合基因, 使其位于同一个读码框内, 表达 Bt-CpTI 抗虫融合蛋白^[1]. 目前本实验室转 *cry1Ac3-cpti* 融合基因烟草及棉花工作已经完成, 并取得预期的抗虫效果(另文发表). 本文利用基因枪将 *cry1Ac3-cpti* 融合基因导入玉米优良自交系中, 并对转基因植株的抗虫性进行了分析, 旨在增强转基因玉米抗虫能力和扩大抗虫谱的同时, 减缓害虫对抗虫蛋白产生耐受性.

1 材料及方法

1.1 植物材料

玉米优良自交系 E28 和 340.

1.2 *cry1Ac3-cpti* 融合基因的植物表达载体

pCUSBCK-Bar 结构图见图 1. *cry1Ac3-cpti* 融合基因^[2], 编码产物为 Bt 毒蛋白和 CpTI 抗虫融合蛋白. *cry1Ac3-cpti* 融合基因启动子是玉米泛素(*ubi*)基因启动子. 植物选择标记为膦丝菌素乙酰转移酶基因(*bar*).

2001-05-14 收稿, 2001-07-02 收修改稿

* 国家“八六三”高技术计划(Z-17-01-01, BH-02-01-01)、国家自然科学基金(批准号: 39989001, 39580012, 39880023)、转基因植物研究与产业化开发专项基金(ZJY-B-01)和美国洛克菲勒基金(RF7001 # 581)资助项目

** 联系人, E-mail: zzhu@genetics.ac.cn

1) 曲强, 通过细胞内定位提高抗虫基因表达量的研究. 中国科学院遗传所硕士学位论文, 1998

2) 已申请国家专利, 专利公开号为: CN 1229087A, 专利申请号为: 99103430.9

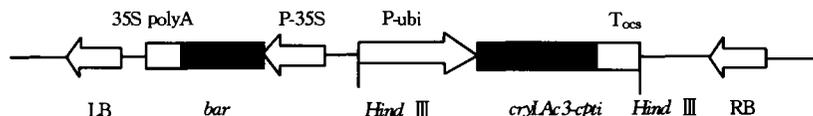


图1 植物表达载体 pCUSBCK-Bar 结构简图

cry1Ac3-cpti, *cry1Ac3* 基因与 *cpti* 基因融合基因, 编码产生 Bt 毒蛋白及 CpTI 抗虫融合蛋白; P-35S, 花椰菜花叶病毒 35S 蛋白基因启动子; *bar*, 植物选择标记乙酰转移酶基因; 35S polyA, 花椰菜花叶病毒 35S 蛋白基因终止子; P-ubi, 玉米泛素基因启动子; T-ocs, 章鱼碱合成酶基因终止子; LB, T-DNA 左边界; RB, T-DNA 右边界

1.3 供试培养基

基本培养基 (MSM) 为 MS 培养基加蔗糖 30 g/L, phytagel 2.4 g/L, pH 5.8. 诱导培养基 (MSM-I) 为 MSM 加谷氨酰胺 250 mg/L, 水解酪蛋白 500 mg/L, 2,4-D 2 mg/L; 筛选培养基 (MSM-S) 为 MSM 加 2,4-D 2 mg/L, 麟丝菌素 (PPT) 5 mg/L; 再生培养基 (MSM-R) 为 MSM 附加 Kinetin (KT) 1 mg/L, 6-Benzylaminopurine (6-BA) 0.5 mg/L, PPT 1 mg/L. 壮苗培养基 MSM-G 为 1/2 MS 加蔗糖 15 g/L, phytagel 2.4 g/L.

1.4 玉米幼胚愈伤组织的诱导

取授粉后 12~15 d 玉米雌穗, 剥去苞叶后在 70% 酒精中浸泡 2 min, 然后在 25% 次氯酸钠 (活性氯含量为 1.8%~2.5%) 中消毒 30 min, 无菌水冲洗 3 次后吸干水渍, 用解剖针将幼胚接种于诱导培养基上, 置于 27℃ 暗培养. 2~3 周后, 挑取鲜黄色, 结构致密的胚性愈伤组织继代培养.

1.5 基因枪转化及 PPT 抗性愈伤组织的筛选

采用 PDS-1000/He (Bio-Rad 公司) 基因枪进行转化. 以直径 1.0 μm 的金粉作为载体, 可裂膜为 1100 psi* 型, 质粒包被及枪击转化过程按说明书的方法进行. 选取生长状态良好的胚性愈伤组织, 基因枪轰击 (距离靶细胞 6 cm) 后将材料转入 MSM-I 中过渡培养 4 d, 转入含 PPT 5 mg/L MSM-S 筛选 3 次, 抗性愈伤组织生长旺盛, 而对照逐渐死亡.

1.6 PPT 抗性愈伤组织的再生

将抗性愈伤组织转入分化培养基 MSM-R 进行分化 (14/10 h 的光周期培养, 光强为 2000 lx, 温度为 27℃) 2~3 周, 80% 抗性愈伤组织可分化出绿芽点, 4~5 周后部分绿芽点发育成小植株, 将再生的小植株转至 MSM-G 壮苗培养 20 d 左右, 然后移栽至含有营养土的小花盆中.

1.7 再生植株的 PCR 检测

植物总 DNA 提取按 CTAB^[3] 法进行. *cry1Ac3* 基因 PCR 扩增引物为: P1, 5' TGCAGAGAGCTTCAGAGAGTG 3'; P2, 5' ACACCCCTGACCTAGTTGAGC 3'. 25 μL PCR 反应体系: 模板 DNA 20 ng, 两种引物各 0.5 μmol/L, dNTP 各 0.25 mmol/L, Taq 酶 1U. 94℃ 变性 5 min, 然后依次在 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后在 72℃ 保温 10 min, 取样 10 μL 在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳.

1.8 再生植株的 Southern 杂交分析

取 10 μg 玉米基因组 DNA, *EcoRI* 和 *EcoRV* 37℃ 酶切 16 h. *HindIII* 酶切质粒 pCUSBCK-Bar 为阳性对照, 通过真空转移法将 DNA 转移到 Hybond-N⁺ (Amersham) 膜上, 低熔点胶法回收 *cry1Ac3* 基因片段作探针. 预杂交、杂交按照 Sambrook 等^[4] 方法进行. 参照随机引物标记试剂盒说明书, 用 α-³²P-dCTP 标记探针. 杂交膜用 0.1×SSC, 0.1% SDS 洗后进行放射自显影.

1.9 转基因植株的抗虫测试

1.9.1 T₀ 代室内抗虫鉴定分析 玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 购自中国农业科学院植物保护研究所玉米螟组. 参照 Armstrong^[5] 介绍的抗虫鉴定方法稍加修改后进行. 取转化植株及非转化植株 (对照) 小块叶片以及小培养瓶若干, 按小培养瓶直径大小, 将叶片剪成圆形, 直径约 1 cm, 置于小培养瓶底部, 每个小瓶接 5 头初孵幼虫, 每个样品重复 3 次. 接完虫后, 用封口膜将瓶口封好, 在封口膜上用细针扎 2 个孔, 保持通气性, 置于 28℃ 培养 1 d, 然后观察叶片受损情况. 在放置叶片之前应先在瓶内放一层滤纸, 滴少许无菌水, 保持小瓶内的湿度. 判定转基因植株抗虫能力依据为^[5]: 抗虫转基因植株

* 1 psi = 6894.76 Pa

为完好或虫子咬食面积较小的叶片；如果一个以上叶片被虫子吃光，则认为该转基因植株不抗虫。

转基因植株抽穗期间，雌、雄穗分别套袋，待雌、雄蕊成熟时授粉自交。

1.9.2 T₁代抗虫鉴定分析 翌年种植上年抗虫性好的转基因玉米种子，相邻种植对照。参照棉花抗虫方法^[6]对转基因后代进行室内抗虫鉴定。田间抗虫鉴定分析：待玉米生长至喇叭口后期，给转基因玉米及对照接种玉米螟黑头卵30头。在玉米成熟期，调查植株茎秆蛀孔数、茎秆里的玉米螟活虫及死虫数，结合室内鉴定，判断转基因植株的抗虫能力。

2 结果

2.1 基因枪转化及 PPT 抗性愈伤组织的筛选

选取生长状态好的胚性愈伤组织，经基因枪轰击，MSM-I 培养，MSM-S 筛选，约3个月后，抗性愈伤组织生长旺盛(图版 I(a))，而对照愈伤组织逐渐停止生长而死亡。表1列出了抗性愈伤组织的筛选频率，自交系340的抗性愈伤组织的筛选频率要高于E28抗性愈伤组织的筛选频率。

表1 转 *cry1Ac3-cpti* 融合基因玉米抗性愈伤组织再生频率

自交系	轰击愈伤组织块数	PPT 抗性愈伤组织		抗性愈伤组织再生植株	
		No.	%	No.	%
E28	526	128	24.3	40	7.6
340	302	98	32.5	34	11.3

2.2 PPT 抗性愈伤组织再生频率

将抗性愈伤组织转入分化培养基MSM-R进行分化(14/10h的光周期培养，光强为2000lx，温度为27℃)2~3周。80%抗性愈伤组织可分化出绿芽点，4~5周后部分绿芽点发育成小植株(图版 I(b))，将再生的小植株转至MSM-G壮苗培养20d左右，然后移栽至含有营养土的小花盆中，待植株成活后，移栽至大田。同样自交系340抗性愈伤组织的再生植株频率高于自交系E28抗性愈伤组织的再生频率。

2.3 再生植株的分子鉴定

分别对自交系E28 40个独立克隆、340 34个独立克隆再生植株进行 *cry1Ac3* 基因PCR检测。结果表明，E28的40个独立克隆中有36个，340的34个独立克隆中有32个再生植株能够检测到743bp *cry1Ac3* 基因片段；而非转化植株则无此片段，部分PCR检测结果见图2。随机选取2株PCR检测为阳性的再生植株及非转化植株基因组DNA，进行Southern blot分析，结果表明，2株阳性植株

获得了明显的杂交信号，而非转化对照组中未出现任何杂交信号(图3)，进而证实了 *cry1Ac3-cpti* 抗虫融合基因已整合在玉米的基因组中。

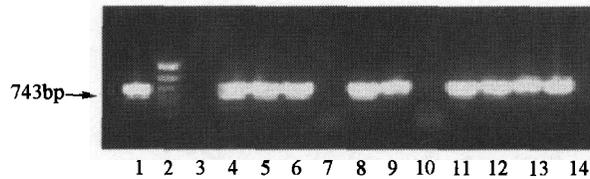


图2 自交系E28和340 T₀转化植株 *cry1Ac3* 基因PCR测定结果

1, 阳性对照, 模板为质粒 pCUSBCK-Bar; 2, 分子量标志; 3, 非转化植株; 4~14, PPT 抗性植株

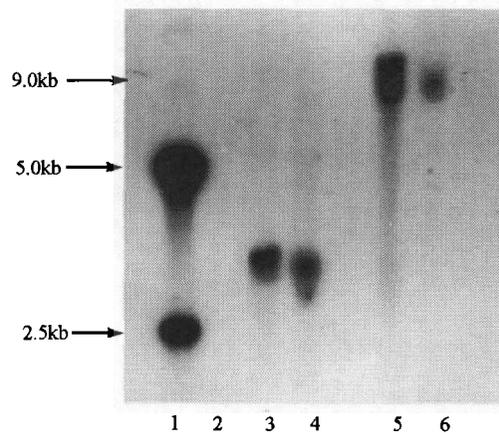


图3 自交系E28和340 T₀转化植株 *cry1Ac3* 基因Southern杂交结果

1, 阳性对照, *Hind* III 酶切 pCUSBCK-Bar, 含 *cry1Ac3-cpti* 融合基因; 2, 阴性对照, *Eco*RV 酶切非转化植株 DNA; 3和4, *Eco*RI 酶切 E28 转化植株 1-BS-1 及 340 转化植株 2-BS-7 基因组 DNA; 5和6, *Eco*RV 酶切 E28 转化植株 1-BS-1 及 340 转化植株 2-BS-7 基因组 DNA

2.4 转基因植株 T₀ 代抗虫生物检测

对E28及340 T₀代68个PCR结果为阳性的再生植株进行抗虫分析，发现不同转基因植株的抗虫能力存在较大差异，抗虫能力较高的有3个克隆，其中有E28的2个(1-BS-1, 1-BS-35)；340的1个(2-BS-7)。用这3个克隆的再生植株叶片饲喂玉米螟幼虫，叶片基本没有受到螟虫的咬食，而对照叶片基本被螟虫吃光(图版 I(c))；其余21个克隆再生植株抗虫水平居中或接近对照。

2.5 转基因植株 T₁ 代抗虫鉴定分析

2.5.1 转基因植株 T₁ 代室内抗虫鉴定分析 翌年对以上抗虫性较高的3个转基因植株后代进行室内

抗虫鉴定. 结果表明, T_1 代的抗虫性发生了分离(表 2). 如克隆 1-BS-1 共计 14 株转基因植株中, 有 8 株高抗螟虫, 表现在螟虫致死率高, 螟虫数目少, 个体小, 叶片受损程度轻(图版 I(d)); 而其余 6 株则与非转化的对照类似, 表现在螟虫数目多, 个体大, 叶片受害程度重. 其他 2 个克隆 1-BS-35 及 2-BS-7 也存在类似情况. 说明我们构建的抗虫融合基因能够达到理想的抗虫效果.

表 2 转 *cry1Ac3-cpti* 融合基因 T_1 代抗虫分离及其抗虫性分析

自交系 代号	Cry1Ac3-cpti 分离		抗虫植株		
	抗虫植株: 敏感植株		致死率 / %	虫重 / mg	叶片受害 级别
E28	1-BS-1	8:6	85.0	1.14	1
	1-BS-35	17:8	80.3	1.89	1
	CK ₁	5	20.0	7.89	4
340	2-BS-7	21:11	85.9	1.15	1
	CK ₂	4	10.0	6.98	4

注: CK₁, CK₂ 分别为非转化植株 E28 及 340 对照. 叶片受害级别判定依据为: 1, 叶片没有或轻微受损; 2, 叶片受损面积小于总面积的 1/2; 3, 叶片受损面积大于 1/2; 4, 叶片完全受损

2.5.2 T_1 代田间抗虫鉴定分析 抗虫性的田间观察结果发现, 转基因植株茎秆中的活虫数以及蛀孔数明显少于对照(表 3, 图版 I(e, f)); 说明转基因植株能有效地抵抗玉米螟的钻蛀, 钻蛀后玉米螟在茎秆中的存活数量亦减少. 室内鉴定结果与田间转基因植株抗虫结果基本吻合.

表 3 转 *cry1Ac3-cpti* 融合基因 T_1 代玉米茎秆抗虫结果

自交系	代号	测定株数	活虫数	茎秆死虫数	蛀孔数
E28	1-BS-1	6	0	0	1
	1-BS-15	10	0	0	3
	CK ₁	4	16	0	18
340	2-BS-7	20	1	0	6
	CK ₂	4	17	0	19

3 讨论

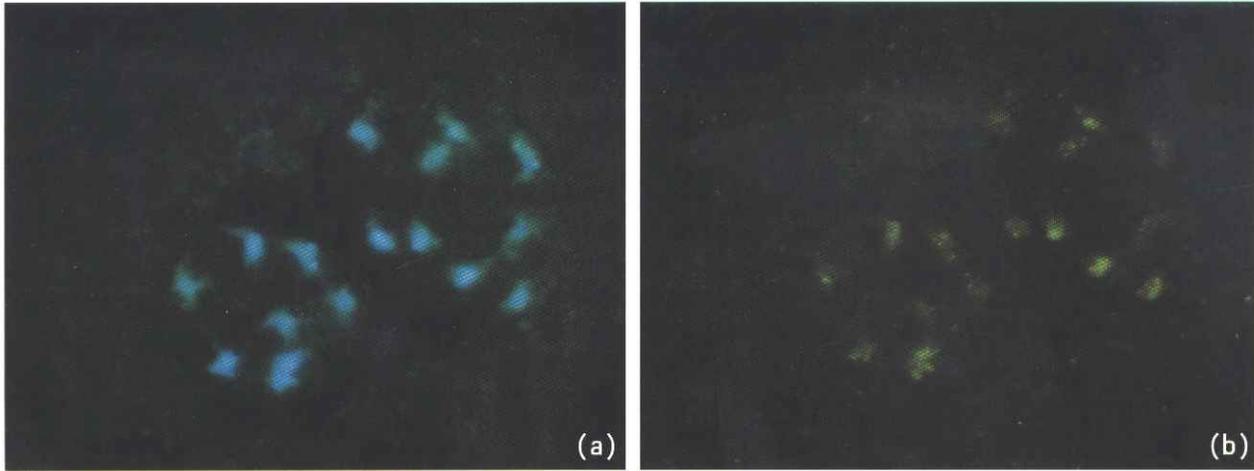
植物抗虫基因工程为抗虫育种开辟了一条崭新的思路. 目前广泛使用的有来源于细菌的 Bt 基因和来源于豇豆的 *cpti* 基因. Bt 毒蛋白在害虫消化道内的消化酶作用下水解出毒性肽, 该毒性肽与昆虫中肠上皮细胞文状缘细胞膜上的特异受体结合, 抑制 K-ATP 酶的活性, 最终造成肠膜细胞渗透压失衡和肠膜结构的破坏, 从而导致昆虫死亡^[7]. CpTI 多肽结构中存在有两个胰蛋白酶抑制活性位点, 能特异性地

与昆虫肠道中的胰蛋白酶结合, 形成没有胰蛋白酶活性的酶-抑制剂复合物, 最终使得害虫因厌食而死亡^[8]. 由于这两种抗虫蛋白的作用机理不同, 加之其抗虫谱的不同, 将上述两种抗虫基因同时应用于一种转基因植物, 就有可能解决单基因抗虫转基因植物中存在的诸如抗虫能力不强、害虫易产生耐受性以及抗虫谱较窄等问题. 赵建周等^[9]用抗虫双价(*Bt* + *cpti*)基因转化烟草发现, 与单价(*Bt*)基因相比转基因烟草棉铃虫的抗性可显著延缓.

本实验室将 *cry1Ac3* 和 *cpti* 基因融合为 *cry1Ac3-cpti* 基因. 该融合基因中的 *cry1Ac3* 和 *cpti* 基因序列处于同一个读码框之下, 其表达的融合蛋白 CryIA(c)-CpTI 同时具有 CryIA(c)蛋白和 CpTI 蛋白的活性. 这在一定程度上简化了植物表达载体构建的过程, 并减少了因植物表达载体上组成元件之间的相互作用而可能对目的基因的表达产生的不利影响. 前期 *cry1Ac3-cpti* 融合转基因烟草实验结果表明, 其已有效地表达了 Bt 毒蛋白和 CpTI 蛋白活性. 本实验将 *cry1Ac3-cpti* 融合基因导入玉米, 获得了高抗玉米螟的转基因植株, 为培育高效抗虫转基因玉米打下了良好的基础. 目前, 害虫对转 *cry1Ac3-cpti* 融合基因玉米的耐受性实验正在进行之中.

参 考 文 献

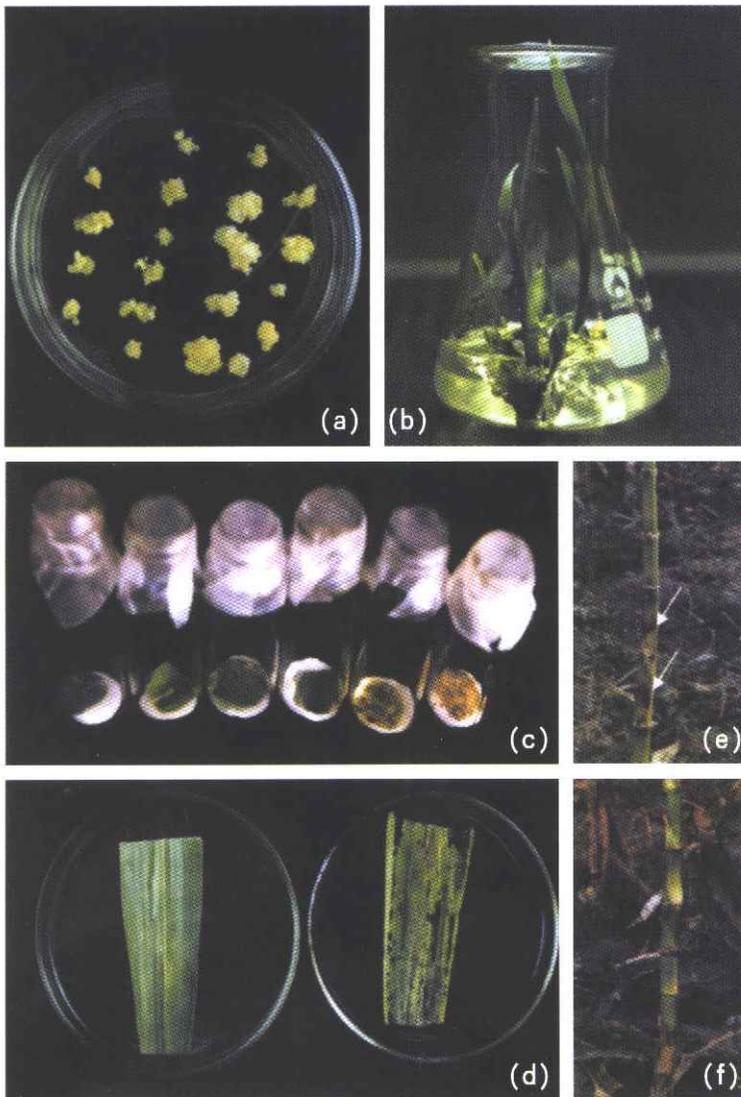
- 1 吴 刚, 等. Bt 杀虫晶体蛋白基因及其转基因育种研究进展. 生物工程进展, 2000, 20(2): 45
- 2 朱 桢. 植物抗虫遗传操作策略, 林忠平, 等编著. 走向 21 世纪的植物分子生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 117
- 3 高越峰, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因分离及其在抗虫植物基因工程中的应用. 植物学报, 1998, 40: 405
- 4 Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 480
- 5 Armsrong C L, et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Crop Sci, 1995, 35: 550
- 6 王 伟, 等. 双价抗虫基因陆地棉转化植株的获得. 植物学报, 1999, 41(4): 384
- 7 Adang M J, et al. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene, 1985, 36: 289
- 8 Pelham H R B. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. Trends in Biochem Sci, 1990, 15: 483
- 9 赵建周, 等. 转双基因抗虫烟草延缓棉铃虫抗性的作用评价. 科学通报, 1999, 44(15): 1635



黑芥与诸葛菜杂种后代的花粉母细胞内, 17 条染色体在后期 I 呈 8:9 分离

(a) 两极的染色体内分别有 3(左下)和 4(右上)条标记的诸葛菜染色体; (b) 原位杂交时以标记的诸葛菜基因组 DNA 为探针

李慧芬, 等: 转抗虫融合基因(*cry1Ac3-cpti*)玉米 (*Zea mays* L.) 植株的获得及其抗虫性分析



转抗虫融合(*cry1Ac3-cpti*)基因玉米植株及抗虫性分析

(a) 自交系 E28 经过 3 次筛选的 PPT 抗性愈伤组织; (b) PPT 抗性愈伤组织分化的小苗; (c) 室内抗虫鉴定, 转基因植株(左 4), 非转基因植株(右 2); (d) 室内抗虫鉴定, 转基因植株(左), 非转基因植株(右); (e) 非转基因植株田间抗虫鉴定, 箭头所示为茎秆受害状态; (f) 转基因植株田间抗虫鉴定, 茎秆没有受到螟虫的危害