

转基因抗虫油菜中Bt杀虫蛋白基因稳定遗传和高效表达及抗虫性研究

林良斌¹ 官春云² 周小云² 何业华² 杨志新¹

(¹云南农业大学烟草种植技术学院, 云南昆明, 650201; ²湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南长沙, 410128)

摘要 通过对转Bt杀虫蛋白基因油菜植株的后代进行卡那霉素抗性分析和PCR技术检测, 结果表明: Bt杀虫蛋白基因是以单拷贝、杂合地整合到转基因植株(T₀1、T₀2、T₀3、T₀5、T₀6、T₀7、T₀8)的基因组中, 并稳定地遗传。ELISA检测表明: 在第3~第9叶期Bt杀虫蛋白基因在转基因油菜植株中高效地表达, Bt杀虫蛋白的表达量为170~260 ng/25 mg鲜叶, 占植物可溶性蛋白的0.067%~0.105%, 其抗虫效果高达72.0%~94.4%。但从第11叶期后Bt杀虫蛋白表达量显著地降低, 只有7~50 ng/25 mg鲜叶, 占植物可溶性蛋白的0.003%~0.02%。

关键词 转基因油菜; Bt杀虫蛋白基因; 遗传; 表达; 抗虫性

中图分类号: S565 文献标识码: A

Stable Heredity and Efficient Expression of Bt Insecticidal Protein Gene in the Transgenic Rapeseed and Its Insect-resistant Activity

L N L iang-B in¹ GUAN Chun-Yun² ZHOU Xiao-Yun² HE Ye-Hua² YANG Zhi-Xin¹

(¹Faculty of Tobacco Cultivational Technology of Yunnan Agriculture University, Yunnan, Kunming, 650201, China; ²Group Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, HNAU, Hunan, Changsha, 410128, China)

Abstract The progeny of transgenic rapeseed plants with Bt insecticidal protein gene was detected by kanamycin-sifting and PCR. Results showed that single copy of Bt insecticidal protein gene has been integrated into the genome of T₀ transgenic plants and stably inherited. By ELISA Bt insecticidal protein gene can efficiently express in the transgenic rapeseed plants with the 3th~9th leaf stage, and the expressing quantity is 170~260ng/25mg fresh leaf. It amounts to 0.067%~0.105% of plant soluble protein, and the insecticidal activity is 72.0%~99.4%. But expressing quantity of Bt insecticidal protein apparently decreased after the 11th leaf stage and down to 7~50ng/25mg fresh leaf, corresponding to 0.003%~0.02% of plant soluble protein.

Key words Transgenic rapeseed; Bt insecticidal protein gene; Heredity; Expression; Insect-resistant activity

油菜是一种重要的油料作物, 在我国油料生产中占有非常重要的地位。目前, 应用基因工程技术改良油菜品种已取得很大的进展^[1]。油菜在生产过程中常受菜青虫等鳞翅目害虫的危害。作者运用农杆菌介导法和花粉管通道法把Bt杀虫蛋白基因导入到油菜中, 获得了转基因植株^[2,3]。本文报道这些转基因植株中的Bt杀虫蛋白基因的遗传、表达及其抗虫性, 为选育高效抗虫油菜新品种提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

转Bt杀虫蛋白基因的湘油13号植株和由此所

获得的稳定的转Bt杀虫蛋白基因油菜株系; ELISA分析用的第一抗体是Bt杀虫蛋白的兔抗血清, 第二抗体是碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔血清, 均为中国农科院生物技术研究中心范云六院士实验室提供; 实验用虫为采自田间的菜青虫虫卵经人工孵化出的幼虫。

1.2 方法

1.2.1 卡那霉素筛选转基因植株后代 将自交套袋收获的种子用0.1%升汞表面消毒15分钟, 经无菌水冲洗3次, 播在含卡那霉素(40mg/L)的MS培养基上进行萌发(25℃, 光照16h/d), 3~4周后, 将长出根系的绿色苗移栽到土壤中并进行检测。

* 基金项目: 湖南省科委基金项目(97JKY1005)

作者简介: 林良斌(1963-), 男, 湖南武冈人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子生物学和基因工程研究; 官春云(1938-), 男(蒙古族), 湖北江陵人, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 主要从事油菜遗传育种和栽培研究。

Received on(收稿日期): 2000-11-07, Accepted on(接受日期): 2001-03-22

1.2.2 PCR 技术检测转基因植株后代 采用 PCR 技术扩增 *Bt* 杀虫蛋白基因这一目标序列进行检测。油菜植株的 DNA 提取参照江昌俊等^[4]的方法。5 端引物为:

5'-GGAA GTAA TGGA TAA GAA TCCGAA G-3', 3 端引物为:

5'-CCCA CTA GTTAA CCGA TTTGA TTGGA -3', 采用 Promega 的 *Taq* 聚合酶系统, 反应体积为 25 μ L, 基因组 DNA 用量为 0.2 μ g, 94 变性 1 min, 35 复性 2 min, 72 延伸 2 min, 共进行 40 次循环, 完成最后一次循环后, 72 延伸 10 min, 扩增出的目标 DNA 带约为 1.8 kb。

1.2.3 转基因植株的 *Bt* 杀虫蛋白表达检测分析 (ELISA) 取 0.1 g 转基因株系的叶片组织, 加入 400 μ L 样品抽提缓冲液研磨, 10 000 r/min 离心 5 min, 取 100 μ L 加入酶标板的孔中, 4 冰箱包被过夜。第二天用 PBST 缓冲液快速洗板 5~6 次, 加入封闭缓冲液 100 μ L, 室温下保温 1 h; 用 PBST 洗板 3 次后, 加入稀释好的第一抗体 100 μ L, 室温下反应 2 h; 用 PBST 快速洗板 5~6 次, 加入已用 ECI 缓冲液稀释好的碱性磷酸酯酶标记的抗兔第二抗体 100 μ L, 室温下反应 2 h; 用 PBST 快速洗板 5~6 次, 加入显色底物 100 μ L, 在室温下闭光反应 3~10 min, 用 50 μ L 3 mol/L NaOH 终止反应, 在酶联仪上测 405 nm 光吸收, 并照相。

1.2.4 转基因植株中 *Bt* 杀虫蛋白含量的测定 称取纯化的 *Bt* 杀虫蛋白晶体 10 mg, 加入 100 μ L 0.135 mol/L NaOH, 在室温下碱解 5 h, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为可溶性 *Bt* 杀虫蛋白, 在紫外分光光度计上测 260 nm 和 280 nm 的光吸收, 计算出纯 *Bt* 杀虫蛋白的含量 (1,600 ng/ μ L)。取 2 μ L 可溶性 *Bt* 杀虫蛋白, 加入到 198 μ L PBS 溶液中, 制成原液, 然后依次稀释 11 次, 每次稀释 1 倍。每一浓度溶液分别取 100 μ L 与待测定的转基因株系样品一起做 ELISA。根据浓度和 405 nm 的光吸收 (OD₄₀₅) 的关系做标准曲线。在标准曲线上即可查得转基因植株中 *Bt* 杀虫蛋白的含量, 同时也可计算出 *Bt* 杀虫蛋白占植物可溶性蛋白的比例。

1.2.5 转基因植株的杀虫活性分析 用第 3~9 叶期的转基因油菜株系的叶片和未转基因油菜植株的叶片持续饲喂菜青虫幼虫, 直到幼虫化蛹。试验时, 将 24 h 内孵化的幼虫饲养于培养皿中 (5 头/皿), 放入 25 \pm 1 光照培养箱中培养, 每天观察记

载各培养皿中幼虫的存活、取食、蜕皮及生长情况, 统计各处理的幼虫和蛹的死亡率及虫龄, 并隔两天饲喂新的叶片。

2 结果和分析

2.1 转基因植株后代的筛选

将收获的种子播在含卡那霉素的 MS 培养基上进行发芽, 长出 4 种苗: 白色苗、紫色苗、无根系的绿色苗和有根系的绿色苗, 只有最后一种是卡那霉素抗性植株, 有可能具有 *Bt* 杀虫蛋白基因。实验结果表明: 在 T₀ 代中, 有 7 株 (T₀1、T₀2、T₀3、T₀5、T₀6、T₀7、T₀8) 的后代 (T₁ 代) 的卡那霉素抗性植株和卡那霉素敏感植株的分离比约为 3:1, χ^2 测验符合一对基因分离的预期比例。仅有 1 株 (T₀4) 的后代的卡那霉素抗性植株的比例超过 3:1, 约占 87.23%。在 T₁ 代中 (选择其它性状表现优异的 T₁ 代植株进行研究), 有近 2/3 植株, 其后代 (T₂ 代) 的卡那霉素抗性植株和卡那霉素敏感植株的分离比约为 3:1, 有 1/3 植株, 其后代几乎不发生分离, 卡那霉素抗性植株的比例约占 98.63%。由此说明 *Bt* 杀虫蛋白基因是以单拷贝、杂合地整合到这 7 株转基因植株的基因组中, 有 1 株是以多拷贝、多位点、杂合地整合到其基因组中, 对此株予以淘汰。

2.2 转基因植株后代的 PCR 检测

对经过卡那霉素筛选获得的 T₁、T₂ 代卡那霉素抗性植株及纯合的 T₃ 代植株进行 PCR 检测, 在所检测的植株中, 几乎都获得了 *Bt* 杀虫蛋白基因的特异扩增带 (见图 1)。结果表明 *Bt* 杀虫蛋白基因在转基因植株中能稳定地遗传, 卡那霉素抗性可作为转基因植株后代是否具有目的基因的判断指标, 并且在第 3 代我们就获得纯合的转基因植株, 作为转基因抗虫油菜的育种材料。

2.3 转基因植株的 ELISA 分析及转基因植株中 *Bt* 杀虫蛋白含量的测定结果

每次选择第 3、第 5、第 7……第 13 叶期的转 *Bt* 杀虫蛋白基因油菜株系做 ELISA 检测, 未转基因植株做阴性对照 (即空白对照), 不同浓度的纯 *Bt* 杀虫蛋白做阳性对照。ELISA 检测结果 (见表 1) 表明 *Bt* 杀虫蛋白基因在转基因植株中得到了表达, 根据 ELISA 检测中转基因植株的 405 nm 光吸收值, 即可从 *Bt* 杀虫蛋白的浓度标准曲线上查得转基因植株中 *Bt* 杀虫蛋白的含量, 并计算出其占植

表1 转基因抗虫油菜不同叶期 *Bt* 杀虫蛋白表达的检测结果
Table 1 Expression of *Bt* insecticidal protein in the transgenic insect-resistant rapeseed at difference leaf stage

株系编号 Number of line	第3叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 3th leaf stage	第5叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 5th leaf stage	第7叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 7th leaf stage	第9叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 9th leaf stage	第11叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 11th leaf stage	第13叶期OD ₄₀₅ OD ₄₀₅ of the 13th leaf stage
阴性对照 Negative control	0	0	0	0	0	0
T1	0.403	0.405	0.402	0.404	0.348	0.342
T2	0.385	0.386	0.384	0.387	0.331	0.332
T3	0.391	0.392	0.389	0.388	0.338	0.336
T4	0.394	0.392	0.391	0.393	0.335	0.332
T5	0.382	0.385	0.386	0.384	0.329	0.328
T6	0.378	0.381	0.379	0.377	0.331	0.330
T7	0.396	0.397	0.395	0.398	0.341	0.337
T8	0.401	0.399	0.396	0.397	0.343	0.341
T9	0.388	0.389	0.391	0.387	0.333	0.329
T10	0.376	0.379	0.382	0.381	0.330	0.328
T11	0.375	0.378	0.385	0.384	0.329	0.331
T12	0.402	0.403	0.398	0.399	0.341	0.342
T13	0.398	0.401	0.395	0.397	0.345	0.338
T14	0.374	0.378	0.382	0.381	0.324	0.321
T15	0.385	0.387	0.384	0.386	0.333	0.328
T16	0.392	0.391	0.395	0.394	0.335	0.336
T17	0.384	0.383	0.386	0.385	0.331	0.329
T18	0.381	0.385	0.391	0.387	0.332	0.330
T19	0.397	0.396	0.392	0.394	0.334	0.333
T20	0.392	0.394	0.395	0.393	0.332	0.335
T21	0.398	0.395	0.396	0.397	0.336	0.335
T22	0.395	0.397	0.398	0.391	0.332	0.331
T23	0.401	0.403	0.397	0.398	0.342	0.344
T24	0.398	0.402	0.401	0.399	0.339	0.338
T25	0.399	0.401	0.395	0.397	0.335	0.332
T26	0.387	0.392	0.389	0.388	0.331	0.330
T27	0.396	0.394	0.395	0.393	0.336	0.335
T28	0.397	0.395	0.398	0.396	0.338	0.339

物可溶性蛋白的比例。 *Bt* 杀虫蛋白基因在转基因抗虫油菜植株的第3~ 9叶期表达是比较高的, 并且较稳定, *Bt* 杀虫蛋白的表达量为170~ 260 ng/25 mg 鲜叶, 占植物可溶性蛋白的0.067%~ 0.105%。但从第11叶期后 *Bt* 杀虫蛋白的表达量显著地降低, 只有7~ 50 ng/25 mg 鲜叶, 占植物可溶性蛋白的0.003%~ 0.02%。

2.4 转基因株系的杀虫活性分析结果

取 T1、T6 转基因油菜株系的叶片, 用室内培养法检测转基因株系对菜青虫幼虫的抗性, 同时以未转基因湘油13植株做对照。实验结果(见表2)表明转基因株系的杀虫效果明显。虽然大部分被饲喂了转基因株系叶片的一龄或二龄菜青虫幼虫没有立即死亡, 但生长明显被抑制了, 虫体变小, 延缓了蜕皮, 增加了每龄幼虫的历期。由于杀虫蛋白的量在虫体内不断累积, 因此, 到三龄期以后幼虫死亡率大大地提高。

3 讨论

外源基因在转基因植株中丢失^[5,6]和沉默^[7,8]是植物基因工程应用中存在的问题。克服外源基因丢失的对策是: 1) 通过转基因植株自交尽快获得纯合的转基因植株; 2) 建立植物小孢子转化体系(小孢子具备了单细胞、单倍体两个特性), 以它作为转化受体易获得纯合的转基因植株; 3) 建立一套将外源基因定点、定量地整合到受体基因组中的遗传转化技术。我们在第3代就获得纯合的转基因植株, 实验结果表明 *Bt* 杀虫蛋白基因在转基因植株中都能稳定地遗传。

在转基因油菜植株的第3~ 9叶期 *Bt* 杀虫蛋白基因的表达是比较高的, 并且较稳定, 但从第11叶期后显著地降低。这可能与栽培的外界环境条件变化有关, 也可能与外源基因整合的位点有关。当外源基因整合到与生长发育有关的基因附近, 外源

表2 转基因株系的杀虫活性分析
Table 2 Insecticidal activity of transgenic plant lines

虫期 Stage	项目 Item	未转基因植株 Non-transgenic plants	转基因株系 T1 Transgenic line T1	转基因株系 T6 Transgenic line T6
1龄 First instar	起始虫数 No. of insects tested	20	18	25
	死亡数 No. of dead insects	0	2	0
	死亡率% Dead frequency	0	11.11	0
2龄 Second instar	起始虫数 No. of insects tested	20	16	25
	死亡数 No. of dead insects	1	2	0
	死亡率% Dead frequency	5	12.50	0
3龄 Third instar	起始虫数 No. of insects tested	19	14	25
	死亡数 No. of dead insects	0	5	4
	死亡率% Dead frequency	0	35.71	16.00
4龄 Forth instar	起始虫数 No. of insects tested	19	9	21
	死亡数 No. of dead insects	1	6	5
	死亡率% Dead frequency	5.26	66.67	23.81
5龄 Fifth instar	起始虫数 No. of insects tested	18	3	15
	死亡数 No. of dead insects	1	1	6
	死亡率% Dead frequency	5.56	33.33	40.00
蛹期 Pupa instar	起始虫数 No. of insects tested	17	2	8
	死亡数 No. of dead insects	0	1	3
	死亡率% Dead frequency	0	50.00	37.50
总死亡数	Total number of dead insects	3	17	18
总死亡率%	Total dead frequency	15.00	94.44	72.00

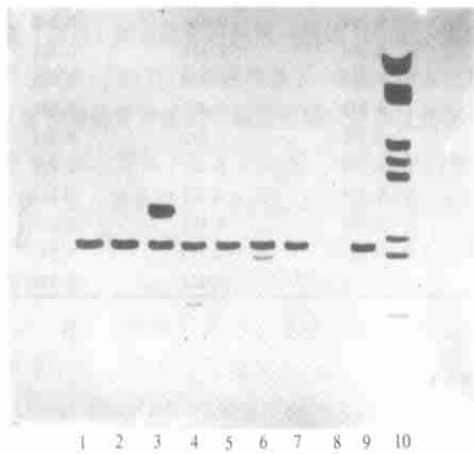


图1 转基因植株 PCR 检测结果

Fig 1 The result of analyzing transgenic plants by PCR
1~7. T₂代卡那霉素抗性植株的DNA经PCR扩增结果, 目标带为1.8 kb; 8 阴性对照, 未转化油菜的DNA经PCR扩增结果; 9. 阳性对照, 表达载体质粒 pFW Z10的Bt杀虫蛋白基因经PCR扩增, 目标带为1.8 kb; 10 分子量标记(λ DNA/EcoRI + HindIII)
Lane 1~7. amplification band of DNA of anti-kanamycin plants T₂ by PCR respectively; Lane 8 Negative control, DNA of non-transgenic plant; Lane 9 Positive control, amplification band of the plasmid pFW Z10 with Bt insecticidal protein gene by PCR; Lane 10 Molecular marker(λ DNA/EcoRI + HindIII)

因的表达就可能受生长发育基因的调控序列调控, 随着生长时期的不同而发生变化。Perlak等^[9]测得转Bt杀虫蛋白基因抗虫棉叶片中Bt杀虫蛋白含量为总可溶性蛋白的0.05%~0.10%, 就表现出较强的抗虫性。在转基因油菜植株中Bt杀虫蛋白占植物可溶性蛋白的比例达到了0.067%~0.105%, 符

合了转基因植物具有杀虫活性时对Bt杀虫蛋白表达量的要求, 抗虫试验的结果也说明了这一点, 转Bt杀虫蛋白基因油菜具有很强的杀虫活性, 其抗虫效果高达94.4%。

References

- [1] Lin L-B (林良斌), Guan Ch-Y (官春云). Plant gene engineering and rapeseed variety improvement *Crop Research* (作物研究), 1996, 10(1): 43~46
- [2] Lin L-B (林良斌), Guan Ch-Y (官春云), Li X (李琦), et al. Studies on efficient transforming system of oilseed rape *Acta Agr Sin* (作物学报), 1999, 25(4): 447~450
- [3] Lin L-B (林良斌), Guan Ch-Y (官春云), Li X (李琦), et al. Transgenic plants obtained by introducing Bt toxic protein gene into *B. brassica napus*. *J Hunan Agricultural University* (湖南农业大学学报), 1999, 25(5): 357~360
- [4] Jiang Ch-J (江昌俊), Chen Y (陈彦). A method isolating genomic DNA from *B. brassica* Plants. *Oil Crops of China* (中国油料), 1995, (4): 34~36
- [5] Spencer T M, O'Brien J V, Start W G, et al. Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 201~210
- [6] Srivastava V, Vasil V, Vasil I K. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 1031~1037
- [7] Carolyn N, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 23: 279~289
- [8] Matzke M A, Matzke J M. Gene interaction and epigenetic variation in transgenic plants. *Developmental Genetics*, 1990, 11: 214~223
- [9] Perlak F J, Deaton R W, et al. Insect resistant cotton plants. *Bio/technology*, 1990, 8: 939~943