

高效抗虫转基因烟草的研究*

李太元 田颖川 秦晓峰 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 中国科学院北京植物生物工程开放实验室, 北京 100080)

李文谷 何永刚 沈 蕾

(中国科学院上海昆虫研究所, 上海 200025)

摘 要

苏云金杆菌 HD-1 的杀虫蛋白基因经 5' 端改造, 3' 端进行 4 种不同长度缺失后插入到含有双增强子的 35S 启动子, 翻译增强子“Ω'”片段的双元载体中, 借助土壤农杆菌 LBA 4404 将在此双元载体上的杀虫蛋白基因及新霉素磷酸转移酶基因 (NPTII) 转入到生产品种烟草 NC89 的染色体上, 从而获得了抗卡那霉素的转化再生烟草植株. 用 1—3 龄烟青虫对这些转化植株进行大量重复虫试结果表明用 4 种不同长度 B.t. 基因转化的再生植株中都有抗性高的植株, 其中以 1.8 kb 的 B.t. Cry IA (c) 基因转化的植株杀虫效果最好, 这一组转基因植株的平均杀虫率在 90—100% 的约占该组总虫试植株的 50%. 对高抗性植株的子一代 (T1) 和子二代 (T2) 进行遗传分析, 分子生物学分析和进一步的抗虫试验表明 B.t. 基因已遗传到子代并初步选到了高抗性的转基因纯合株系 D8-14 和 D19-8 等.

关键词 苏云金杆菌杀虫蛋白基因、转基因烟草 NC89、抗虫纯合系

80 年代以来基因工程技术的飞速发展和 Ti 质粒基因转移系统的日趋完善激励了科学家们进行深入的植物分子生物学及定向改变植物某些性状的研究. Vaecck 等人^[1]首先报道了将 3' 端缺失的苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 B.t.) 杀虫蛋白基因 CryIA(b) 与卡那霉素抗性基因 (NPTII) 融合后通过 Ti 质粒系统转入烟草的结果, 转基因烟草获得了对烟草天蛾 (*M. sexta*) 的抗性. 接着 Fishhoff 等人^[2]和 Barton 等人^[3]相继发表了他们用 3' 端缺失的 B.t. CryIA (b) 和 CryIA(a) 基因转化蕃茄和烟草获得抗虫转基因植株的研究结果. 以上结果表明 B.t. 杀虫蛋白基因一旦转入到植物染色体上即可在植物中表达该基因编码的杀虫蛋白使植物获得对某些害虫的抗性.

为了开展我国的抗虫转基因植物研究, 我们克隆了 B.t. HD-1 的杀虫蛋白基因 CryIA(b) 和 CryIA(c) (原定名分别为 B.t. 5.3 kb 和 B.t. 6.6 kb 类型)^[4,5]. 经对这两个基因的 5' 端进行改

1993-03-08 收稿, 1993-07-16 收修改稿.

* 国家“七五”攻关资助项目, 并得到国际科学文化中心世界实验室 (WL, ICSC, 日内瓦, 洛桑) 的部分资助.

造, 3'端进行缺失后通过农杆菌 Ti 质粒系统转入烟草, 转基因烟草对烟青虫 (*Heliothis assulta*) 有一定抗性^[5]. 试验昆虫的生长受到严重抑制, 但其死亡仅率达 50%. 为了提高 B. t. 基因在植物中的表达水平, 我们又进一步对 B. t. CryIA(c) 基因 3'端进行了不同长度的缺失; 对表达载体进行了改造, 在双增强子的 35S 启动子下游, B. t. 基因起始密码子上游插入了可提高翻译水平的烟草花叶病毒基因组“Ω”片段的 cDNA. 用带有 B. t. 基因的新表达载体转化了生产品种烟草 NC89 并得到了对烟青虫有高毒杀虫活性的转基因植株. 经过 T1 代和 T2 代的遗传分析选到了转 B. t. 基因的抗虫纯合品系. 对这些纯合株系在大田条件下的抗虫性尚待进行试验. 本文报道了用新表达载体转化烟草获得高效抗虫转基因烟草纯合系的结果.

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 含有 B. t. CryIA(c) 完整基因的质粒 pB48.110 和表达载体 pBin437 为本实验室构建^[5]. 农杆菌 LBA4404 和质粒 pRAJ275 由英国 Jefferson 教授惠赠.

1.1.2 植物 温室培养或无菌培养的生产品种烟草 NC89, 植株长到 4—5 叶期时即可用于转化实验.

1.1.3 生化试剂 限制性内切酶及其它核酸修饰酶购自 Boehringer 公司; α -³²P-dCTP 购自 NEN 公司; Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品. 寡核苷酸引物由本所技术室合成. DNA 测序盒为 Pharmacia 产品.

1.1.4 测试昆虫 烟青虫 (*Heliothis assulta*) 由中国科学院上海昆虫研究所人工饲养.

1.2 方法

1.2.1 CryIA(c) 基因 5'端修饰和 3'端缺失 (1) 5'端修饰 5'端修饰后的 B. t. 基因克隆 pB48.110 的构建见前文所述^[5]. (2) B. t. 基因 3'端缺失 利用该基因内部的内切酶位点^[6] HindIII, KpnI 和 XhoI 及 pB48.110 中 B. t. 基因 3'端的 SalI 位点将 B. t. 基因分别从 3'端缺失到 2.8 kb, 2.1 kb 和 1.8 kb 以构建 pB48.101, pB48.102 和 pB48.103 3 个在大肠中表达的质粒.

1.2.2 植物表达载体的改造和农杆菌的转化 (1) 植物表达载体的改造 pD511 为含有带双重增强子的 35S 启动子, TMV“Ω”片段翻译增强子的质粒, 用 HindIII 和 BamHI 将含这两个元件的 0.8 kb 片段切下与用同样酶酶解的 pBin437^[5] 大片段连接即得双元表达载体 pBin438. pBin438 中“Ω”片段及其与 35S 启动子连接处的序列已经测定证实. 用 BamHI 和 SalI 将 pB48.110, pB48.101, pB48.102, pB48.103 中的 B. t. 基因切出后分别插入到用同样酶酶解的 pBin438 中即得 B. t. 基因的双元表达载体 pB48.212, pB48.213, pB48.214 和 pB48.215 (见图 1). (2) 双元表达载体质粒向农杆菌 LBA4404 的直接转化 见前文所述^[5].

1.2.3 烟草的转化及再生 按文献[5]进行. 在选择转化子的 MS 培养基中卡那霉素(Kn)浓度为 300 μg/ml.

1.2.4 植物 DNA 的分析 植物 DNA 的提取按前文所述^[5]进行. 以植物 DNA 为模板用 35S 启动子序列 (-59) — (-78) 的合成引物及 B. t. 基因序列^[6]的 345—363 bp 的负链合成引物进行 PCR 反应, 取 PCR 反应混合物 10 μl 在 1% Agarose 胶上电泳检查反应产物的大小, 然后将胶上的 DNA 按文献[5]所述转移到 Z-probe 膜上, 与 ³²P 标记的 1.8 kb B. t. 基因片段探针进行杂交.

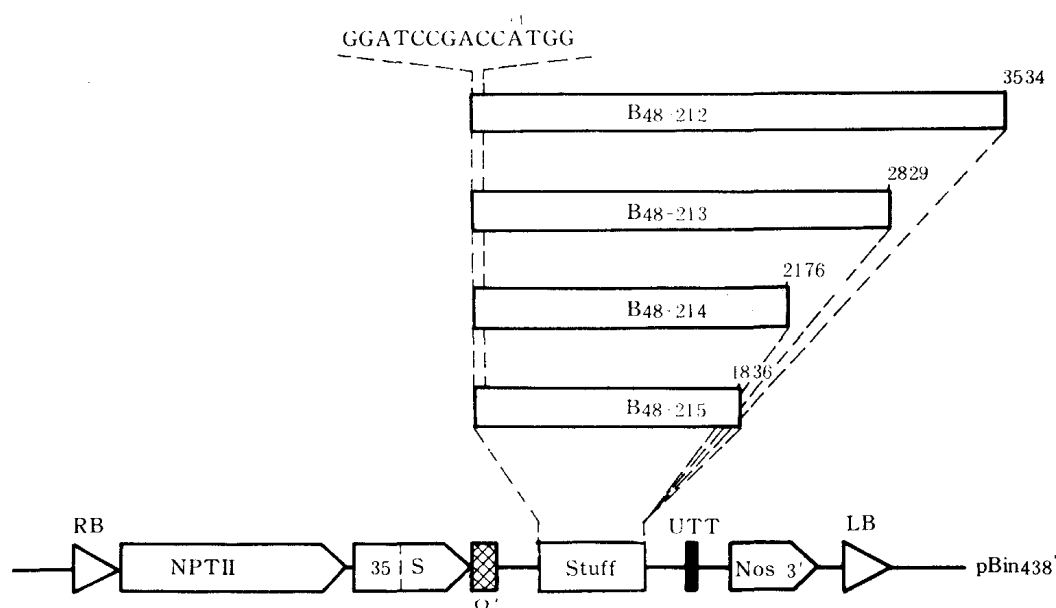


图 1 双元载体 pBin438 及嵌合 B. t. 杀虫蛋白基因表达载体的结构

1.2.5 转基因植物的 Northern 印迹分析 取有杀虫作用的表达不同长度 B. t. 基因的转基因植株按相同基因长度合并叶片, 按 Nagy 等人^[7]方法提取 poly(A)⁺ RNA, 如前所述方法^[9]进行 Northern blot 分析, 所用探针同上所述。

1.2.6 转基因植物的抗虫试验 将一龄或三龄烟青虫装入有转基因植物(或对照植物)叶条的玻璃管(2×10 cm)中, 每管放一头虫, 每个植株用 10—30 头虫, 用棉塞封口, 在 26℃, 90% 相对湿度温箱内饲养 3—6 天, 检查死亡率, 计算校正死亡率。在整株上进行虫试时, 每株上放 5 头二龄幼虫 3—6 天后检查活虫再现率, 以估计死亡率, 同时检查叶片的损坏程度。

1.2.7 抗虫转基因植株的子代遗传分析 选取杀虫率最高的转基因植株(T0)的种子, 进行卡那霉素(Kn)抗性试验, 种子在含 200 μg/ml Kn 的 1/2MS 无机培养基上萌发后 30 天左右统计绿苗率; 同时用 T1 代植株进行虫试检查抗虫植株比例, 选取有高抗虫性的 T1 代植株自交种子如上进行 Kn 抗性, 虫试以及 DNA 的 PCR-Southern 分析。

2 结果与讨论

2.1 B. t. CryIA(c) 基因两端的修饰, 植物表达载体的构建及向土壤农杆菌的转化

已有报道表明 B. t. 杀虫蛋白的 mRNA 在植物中不稳定, 蛋白表达水平难以定量检出或表达量很低^[1-3, 5, 8]。低效翻译可能是 mRNA 不稳定的因素之一。为了提高 B. t. 毒蛋白基因的表达水平, 获得高效抗虫转基因生产品种烟草 NC89 我们采取了以下措施:

(1) 对 B. t. CryIA(c) 基因的两端进行了修饰 在 B. t. CryIA(c) 基因 5' 端非翻译区内有 5 个多余的 ATG 翻译起始码子, 为了使 B. t. 基因在植物中能有效表达, 按材料与方法所述对 B. t. 基因 5' 端进行了定点突变, 除去多余的 ATG 最后构建成使 B. t. CryIA(c) 基因可在原核中表达的表达载体 pB48.110。由于 B. t. 杀虫蛋白的活性部分在 N 端一半^[9], 而且我们在前文^[9]

也初步报道了3'端缺失长度不同对 B.t. 基因表达的影响, 为了进行系统比较我们对 B.t. 基因 3'端进行了不同长度的缺失, 最后构建成分别含全长基因 3.6kb, 3'端缺失后形成的 2.8, 2.1 和 1.8kb 的原核表达载体 pB48.110, pB48.101, pB48.102 和 pB48.103. pB48.110 和 B48.101 的图谱在前文^[9]已发表, 其它两个质粒图谱与 pB48.101 相同, 只是 B.t. 基因的长度不同而以. 用烟青虫、扬尺蠖和舞毒蛾进行的虫试结果表明这些基因仍能表达出有活性的 B.t. 杀虫蛋白 (文献[5] 及中国林业科学院未发表资料).

(2)中间载体的改造及 B.t 基因表达载体的构建 为了提高外源基因在植物中的翻译效率我们将已知有增强翻译作用的烟草花叶病毒基因组 5 端的“Ω'”片段^[10]共 67bp 按方法 1.2.2 所述插入到中间载体 pBin437^[9]中, 使其位于 35S 启动子转录起始点下游, 外源基因插入位点 BamHI 上游, 这个新的中间载体 pBin438 结构见图 1. 任何外源基因都可用 BamHI-SalI 这两个位点插入到 pBin438 的 35S-Ω'-UTT-Nos3'这个植物表达框架中.

将不同长度的 B.t. 基因以 BamHI 和 SalI 片段插入到 pBin438 的上述位置即构成了表达 3.6, 2.8, 2.1 和 1.8kb B.t. 基因的植物表达载体 pB48.212, pB48.213, pB48.214 和 pB48.215 (图 1). 这些载体转入土壤农杆菌 LBA4404 后即可用于转化植物.

2.2 转化再生植株的抗虫试验及 RNA 分析

转化再生植株长到 6—7 个片叶时用离体叶片按方法 1.2.6 所述用一龄和三龄烟青虫进行虫试, 结果表明用 4 种不同长度 B.t. 基因转化的植株中都有抗虫性高的植株, 但以 3'端缺失多的 1.8kb 基因效果最好, 近一半的植株杀虫率在 90—100% (在图 2 中以 70—100% 的范围表示). 这 4 组植株的虫试结果归纳如表 1 和图 2. 表 1 为用一龄和三龄虫试的结果, 两次结果基本一致. 从这些结果可以看出, 与我们前文报道一致, 即在一定范围内似乎 B.t. 基因 3'端缺失越多在植物中表达的杀虫活性越高, 以 1.8kb 的 B.t. 基因所得植株杀虫活性最高. 另外带“Ω'”的 2.8kb 基因与不带此片段的同样长度 B.t. 基因的转基因植株 (R14x-7)^[9]相比, 前者抗虫活性明显高于后者, 在同一次试验中后者的杀虫率仅为 53.8% (数据未列出), 而前者就有 34% 的参试植株的杀虫率在 70—100% (图 2). 同样, 可能由于 Ω'片段的增强翻译作用我们从全长基因 (A) 的转化植株中也选到了杀虫率在 80% 以上的转基因植株. 图版 I-1 和图版 I-2 分别为用当代 (T0) 转基因烟草离体叶片和 (T2) 代纯合转基因烟草植株进行虫试 3 天后的照片, 与对照相比转基因植株抗虫效果非常明显, 充分证明我们已得到了高抗虫性的转 B.t. 基因植株.

取来自不同长度 B.t. 基因转化的抗虫植株叶片提取 poly(A)⁺RNA, 如方法 1.2.5 所述进行 Northern 印迹法分析, 结果与前文报道的情况^[9]一样, B.t. mRNA 仍大部分以降解状况存

表 1 抗卡那霉素再生烟草植株对烟青虫的毒力测验

植株类群	B.t. 基因 长度 (kb)	初孵幼虫 ^{a)}		三龄幼虫 ^{b)}		一龄和三龄虫 ^{b)}	
		株数	死亡率 (%)	株数	死亡率 (%)	株数	平均死亡率 (%)
A	3.6	14	4.0±21.2	8	39.9±32.3	8	48.2±23.1
B	2.8	28	56.3±27.3	16	45.2±37.4	16	57.3±28.9
C	2.1	28	46.8±22.7	16	72.2±23.7	16	66.9±18.2
D	1.8	40	66.3±27.1	23	76.0±25.4	23	81.1±16.9

a) 除去死亡率小于 10% 的植株. b) 按比例 14:8 选择用初孵幼虫测定效果最好的植株进行三龄虫虫试, 并计算一、三龄的平均死亡率.

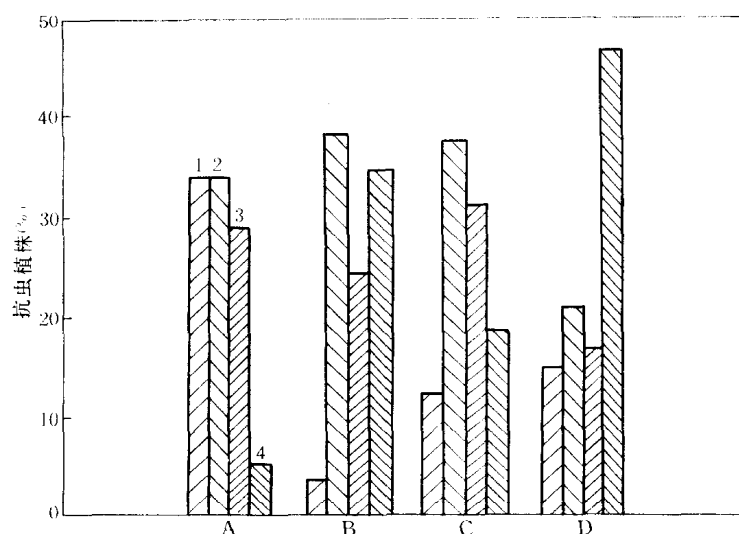


图 2 不同长度 B.t. 基因转化植株中的毒力分布图

A, B, C, D 分别代表 3.6 kb, 2.8 kb, 2.1 kb 和 1.8 kb B.t. 基因转化再生植株, 纵坐标表示具有不同杀虫率的转化植株占各组总虫试植株的百分比

在(结果未列出)说明虽然“Ω’”片段提高了翻译效率但仍未明显提高 mRNA 的稳定性, 看来要进一步提高 B.t. 基因的表达水平以获得有更重要经济价值的抗虫转基因作物就必须根据植物基因的特点对 B.t. 基因的核苷酸序列进行全面的改造以提高其 mRNA 在植物中稳定性及进一步提高翻译水平, 在这方面 Perlak 等人^[1]的抗虫转基因棉花研究结果给我们提供了一个成功的范例。

2.3 抗虫转基因植株的子代遗传分析及纯合系的选择

(1) T1 代分析 从原代转基因植株(T0)选择 16 个高抗虫性的植株收获其自交的种子(T1), 如方法 1.2.7 所述在含 Kn 的培养基上进行萌发试验, 同时进行抗虫性试验。结果表明有的 T0 植株子代在 Kn 抗性方面或在抗虫性方面都有典型的 3:1 分离, 但也有不少植株不符合此分离比。与 T2 代分析有关的几株 T1 代植株分析结果列于表 2。形成非 3:1 分离比的原因还不清楚, 可能是由于同一细胞受到两次独立转化两段 T-DNA 分别插入到两条非同源染

表 2 抗虫烟草植株子一代(T1)遗传分析

原代植株号	抗卡那霉素植株/总株数	χ^2	p	3:1 分离	抗虫株数 ^{a)} /总株数	3:1 分离 ^{b)}
A13	188/269	3.75	0.1—0.05	Y	—	—
B34	253/253	—	N	N	20/20	N
C13	162/219	0.12	>0.5	Y	28/30	N
D1	191/263	0.79	>0.25	Y	24/30	Y
D8	292/305	69.95	<0.005	N	21/23	N
D19	474/474	153.4	<0.005	N	28/30	N
CK	0/266	—	—	—	0/3	—

a) 校正死亡率大于对照 30% 者为抗性植株, p - 概率, N- 否, Y- 是; b) 由于参试植株数有限不宜进行 χ^2 测验, 此项结论仅为估计结果。

染色体上所至, 转化效率越高, 出现这样植株的可能性越大, 如 D8 株系即不符合 3:1 而更符合 15:1 的分离比. 有些子代分离比界于 3:1 和 15:1 之间, 很可能是一次转化细胞与两次转化细胞分裂物混合形成的嵌合体植株所至. 有的株系如 D8 和 C13 的 Kn 抗性分离与抗虫性分离比不一致, 这可能是由于插入位置对两个基因表达影响的不同或基因重组所至. 也有些植株子代, 如表 2 中的 B34, 全部抗 Kn, 也全部有 70—100% 的杀虫率所以很可能是纯合子, 这可能反映了在植物染色体上某些区域可能更容易接受 T-DNA 插入, 这种可能性尚需进一步的分析和分子生物学方面的证据.

(2) T2 代分析及纯合系选择 选取 T1 代中抗虫力高的植株种子如上进行 Kn 抗性, 抗虫性及 PCR-Southern 分析以选择抗虫纯合系的部分试验结果见表 3 及图版 I-3, 图版 I-4. 结果表明从抗 Kn 的性状看, B34-7, C13-10, D8-14 和 D19-8 为纯合株系, 个别幼苗不抗 Kn 可能是由于种子发育不良所至. 随机取 6 株叶进行 DNA 的 PCR 反应然后对 PCR 产物进行 Southern blot 分析, 结果表明所有检查过的植株在 PCR 反应中都能产生 528bp 的预期 DNA 片段, 而且该片段可与 B.t. 基因探针进行特异杂交 (见图版 I-3), 虫试结果也表明多数植株具有对烟青虫的抗性. 以上结果说明 D8-14, D19-8 为抗虫转基因烟草纯合系, 而 B34-7, C13-10 在 T2 代中没有表现出 100% 植株有抗虫性, 所以很可能不是纯合系. 由于我们分析的植株数有限特别是 PCR 分析和抗虫试验的株数少, 所以这里只能初步证明这些株系的纯合性, 要最终肯定一个高抗虫性的转基因纯合系还需对 T3 代进行进一步的遗传分析.

表 3 抗虫转基因烟草植株子二代 (T2) 遗传分析

子代植株号	抗卡那数/卡那 霉素敏感数	抗卡那霉素 植株 (%)	PCR-Southern (阳性数/阴性数)	抗虫数 ^{a)} / 不抗虫数	纯合性
B34-7	191/10	100	6/0	5/1	未定
C13-10	237/2	99	6/0	6/1	未定
D1-5	449/147	75	—	—	N
D8-14	163/5	97.6	6/0	5/0	Y
D19-8	168/5	97	6/0	4/0	Y
CK	0/300	0	0/2	0/2	—

a) 同表 2.

在抗虫性方面有些 T2 代植株的抗虫能力与其亲本 (T1 代) 相比有所下降, 如 D8-14 在 T1 代时其 3 次试验平均杀虫率为 93.3%, 其 T2 代中有的植株则下降到 55.7% (资料未列出), 这种抗虫能力下降的原因还不清楚, 也可能由于基因重组后 B.t. 基因的位置变化而影响了其表达水平. 但也有抗性稳定的株系, 如 D19-8 其 T1 代平均杀虫率为 100%, T2 代所试 4 株的杀虫率最低的也达 92%, 而且不同生长时期 (7, 9, 10, 11 月) 测试的结果都很一致. 最近用 31 株 D19-8 的子二代 (T3 代) 植株进行虫试的结果表明所有植株都 80—100% 的昆虫较正死亡率, 进一步确证该株系为高效抗虫的转 B.t. 基因的 NC89 纯合系 (资料未列出). 对该株系的子代 (T3) 进行进一步的遗传分析和小面积田间试验以进一步确定其抗虫稳定性及在大田条件下的抗虫能力将为该株系应用于生产创造必要条件.

参 考 文 献

- [1] Vaeck, M. *et al.*, *Nature*, 1987, **328**: 33—37.
- [2] Fischhoff, D. A. *et al.*, *Bio/Technology*, 1987, **5**: 807—813.
- [3] Barton, K. A. *et al.*, *Plant Physiol.*, 1987, **85**: 1103—1109.
- [4] 田颖川等, 生物工程学报, 1989, **5**(1): 11—18.
- [5] 田颖川等, 生物工程学报, 1991, **7**(1): 1—10.
- [6] 乔利亚等, 微生物学报, 1993, **33**(5): 383—386.
- [7] Nagy, F. *et al.*, *EMBOJ*, 1987, **6**: 2537—2542.
- [8] Murrery, E. *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 1991, **16**: 1035—1050.
- [9] Schnepf, H. E., Whiteley, H. R., *J. B. C.*, 1986, **260**(10): 6273—6280.
- [10] Gallie, D. R. *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 1987, **15**(8): 3257—3273.
- [11] Perlak, F. J. *et al.*, *Bio/Technology*, 1990, **8**: 939—943.