

## 获得高抗虫转双基因烟草

赵荣敏 范云六 石西平 王京红 纵微星

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学室 北京 100081)

**摘要** 利用 DNA 合成仪人工合成了豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 的 cDNA 编码全序列。合成的基因经过克隆和序列分析后, 克隆到植物高效表达载体上, 并转化农杆菌, 通过共转化的方法, 将 CpTI 基因和经人工改造的苏云金芽孢杆菌 (*B. t*)  $\delta$ -内毒素基因共转化烟草, 得到经 PCR 扩增并 Southern-blotting 验证的分别含有 CpTI 和 *B. t* 基因的植株以及同时含有 CpTI 和 *B. t* 基因的植株。利用棉铃虫幼虫进行的杀虫测试表明, 转基因烟草和对照烟草相比具有明显的杀虫活性, 同时转双基因的烟草和转单一基因的烟草相比具有增强的杀虫活性。

**关键词** 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI), *B. t*  $\delta$ -内毒素, 共转化, 高抗虫烟草

植物抗虫基因工程近年取得了很大的进展, 但近年实验表明, 单一的抗虫基因产物, 特别是 *B. t*  $\delta$ -内毒素很容易使昆虫产生抗性, 为解决昆虫对抗虫植物产生抗性, 同时转化两种或两种以上的基因是一种比较现实的方法<sup>[1]</sup>。

植物蛋白酶抑制剂是一类天然的抗虫物质, 有许多种类, 豇豆 (*Vigna unguiculata*) 来源的胰蛋白酶抑制剂属于 Bowman-Birk 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 和 I 型、II 型蛋白酶抑制剂类似, 能抑制存在于昆虫肠中的蛋白酶的活性, 具有广谱杀虫性。*B. t*  $\delta$ -内毒素是一类来源于细菌并最早应用于植物基因工程的基因之一, 但 1990 年以前报道的均为天然的 *B. t* 基因, 在植物中的表达水平极低, 需要经过改造才能达到杀虫目的<sup>[2]</sup>。王京红等<sup>[3]</sup>根据植物偏爱密码子以及有利于 *B. t* 基因在植物中高效表达等因素已经人工改造了天然的 *B. t* 基因, 使其适于在植物中高效表达。同时参照已发表的 CpTI 基因的 cDNA 序列<sup>[4]</sup>, 我们又人工合成了 CpTI 全基因, 利用农杆菌介导的共转化方法<sup>[5]</sup>, 将上述 CpTI 基因和经人工改造的 *B. t* 基因共转化烟草, 获得含有双基因的高抗虫转基因烟草, 表现出比转单基因烟草有更强的杀虫活性, 这些转基因植物对于研究延缓昆虫对 *B. t*  $\delta$ -内毒素产生抗性具有重要意义。

### 1 材料和方法

#### 1.1 CpTI 基因的合成与构建

按文献[4]报道的 CpTI 基因 cDNA 的编码序列设计合成。为便于克隆, 设计时将编码区中的 EcoRI 和 NcoI 位点除去。在不改变氨基酸序列的前提下, 在第一个 ATG 之后加上 GTC 使产生 NcoI 位点, 5' 端加上 EcoRI 位点, 3' 端加上 SalI 和 HindIII 位点, 合

成基因全长 461bp, 编码区 441bp。利用本室的 Millipore 公司 DNA 合成仪分段合成基因。片段退火后, 利用 EcoRI 和 HindIII 将基因克隆进 pUC19, 得到 pFZCOW, 进行序列测定后, 利用 NcoI 和 SalI 将基因克隆进魏富圣构建的 5' 端为 2 个 CaMV35S 启动子和一个  $\Omega$  序列, 3' 端为 NOS 终止子的植物高效表达载体 pFW03 上<sup>[6]</sup>, 然后利用 HindIII 将基因克隆进 Ti 质粒 pGN 上, 得到 pFZY1 (图 1), 图 2 所示为含有人工改造的 B. t 基因的 Ti 载体 pFWZ10。

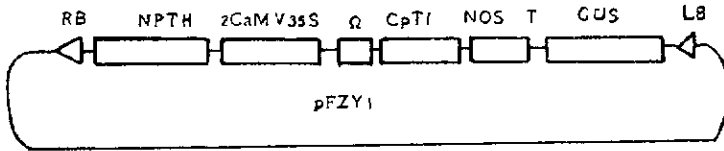


图 1 含有 CpTI 基因的 Ti 载体 pFZY1

Fig. 1 Ti plasmid containing CpTI gene

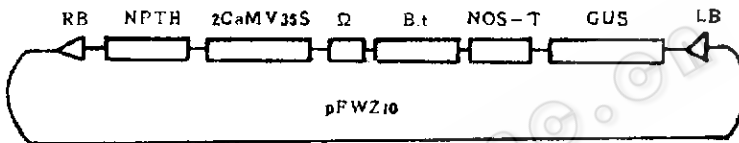


图 2 含有人工改造 B. t 基因的 Ti 载体 pFWZ10

Fig. 2 Ti plasmid containing B. t gene

## 1.2 pFZY1 和 pFWZ10 质粒转化根癌土壤农杆菌 LBA4404

按文献[7]将质粒 pFZY1 和 pFWZ10 转化至根癌土壤农杆菌 LBA4404, 分别得到工程菌株 L36 和 L004。

## 1.3 烟草转化

所用的烟草材料为栽培品种 NC89。种子消毒、无菌苗培养及转化方法按文献[7]进行。

## 1.4 共转化植株的筛选及 PCR-Southern 验证

烟草转化后, 在含有卡那霉素 (100 $\mu$ g/ml) 再生培养基上再生植株, 按文献[8]方法测定叶片中的 GUS 活性。将 GUS 活性阳性植株分别提取植物总 DNA, 用 pFZCOW 的 EcoRI-HindIII 片段制备探针进行点杂交, 点杂交阳性植株经 PCR 扩增证实 CpTI 的存在, 然后再经 PCR 扩增检测点杂交阳性及阴性植株中 B. t 基因, 并用 Southern-blotting 杂交进行验证。B. t 基因探针为本实验室提供。

## 1.5 转基因烟草的杀虫活性测定

用两种方法进行杀虫测试。一种方法是以盆栽烟草为对象, 在盆内种植的烟草上放置 8 头初孵的棉铃虫幼虫, 用玻璃罩盖住, 每株烟草繁殖两盆, 一周内连续观察。另一种方法是在培养皿中放置两层滤纸, 无菌水浸湿后, 上面放置大小合适的叶片, 每株烟草共做 20 皿, 每皿放置一头初孵棉铃虫幼虫, 盖上培养皿盖, 一周内连续观察。

# 2 结 果

## 2.1 CpTI 基因合成及工程菌株的构建

基因合成后克隆时, 选取 pUC19 为载体, 受体菌采用 DH5 $\alpha$ , 在含有 X-gal、IPTG 以及氨卞青霉素的选择性培养基上, 阳性克隆子呈现白色菌落, 挑取白色菌落, 检测其所含有的质粒大小, 经酶切鉴定, 克隆子含有一大约 460bp 片段, 见图版 I-A。利用 Pharmacia 测序试剂盒对合成的基因进行测序, 克隆子序列与设计序列一致, 定名为 pFZ-COW。图版 I-B 所示为经过一系列克隆后将 CpTI 基因及 B. t 基因分别克隆进根癌土壤农杆菌 LBA4404 得到的 L36 和 L004 的质粒图谱, 图中所示 L36 和 L004 不仅含有内源大质粒, 而且含有转化进的 Ti 质粒。

## 2.2 烟草的遗传转化及初步筛选

烟草转化采用叶盘法。L36 和 L004 等量混合, 共培养 3 天, 然后转至含有 100 $\mu$ g/ml 卡那霉素、2 $\mu$ g/ml 6-卞基嘌呤的选择培养基上再生。一个月左右, 卡那霉素抗性芽形成, 将大约 250 棵芽转至另外含有卡那霉素的培养基中生根, 此时测定叶片中的 GUS 基因活性, 共获得 55 株 GUS 活性阳性植株。图版 I-C 所示为部分植株的 GUS 底物染色结果。其中 1-4 号为阳性, 5 号为阴性。

## 2.3 转化植株的 PCR-Southern 验证

将 55 株 GUS 表达阳性植株分别提取其总 DNA, 用 pFZCOW 的 EcoRI-HindIII 片段 (CpTI 基因) 制备探针的斑点杂交实验表明, 有 26 株呈阳性反应。用 CpTI 引物以及 B. t 引物对该 26 株进行的 PCR 扩增结果表明, 26 株全部为 CpTI 阳性, 用 B. t 引物对 29 株斑点杂交阴性植株进行 PCR 扩增, 有 21 株含有 B. t 基因。另外在 26 株 CpTI 阳性植株中有 3 株含有 B. t 基因, 分别编号为 16 号、25 号、30 号, 见图版 I-D、I-E, 也即这三株既含有 CpTI 基因又含有 B. t 基因。



图 3 三种转基因烟草的杀虫活性

Fig. 3 Bioassay of transgenic plants

1. Plant NC89 (CK)
2. Plant containing CpTI gene
3. Plant containing B. t gene
4. Plant containing CpTI、B. t gene

## 2.4 转基因植物的杀虫测试

将初孵棉铃幼虫接在盆栽烟草上,

每盆接 8 头, 5 天后结果表明, 转 B. t 基因植株、共转化 CpTI 及 B. t 植株和对照相比都有明显的杀虫活性, 转 CpTI 植株表现出不同程度的杀虫活性, 其中有 12 株杀虫效果较显著。从棉铃幼虫取食烟草叶面积来看, 转基因烟草受到的危害和对照比要小得多。转

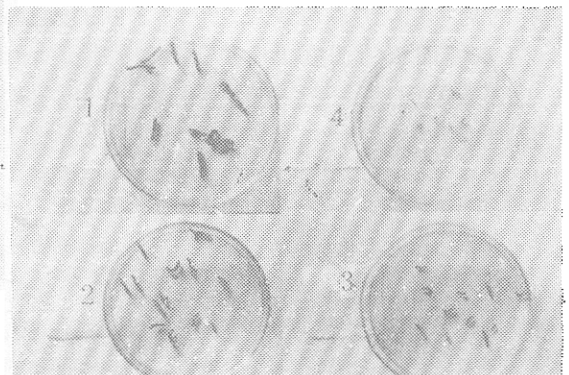


图 4 取食三种转基因烟草的棉铃虫

Fig. 4 1st instar larvae fed on leaves for 4 days

1. Fed on control leaves
2. Fed on leaves containing CpTI gene
3. Fed on leaves containing B. t gene
4. Fed on leaves containing both CpTI and B. t genes

双基因烟草和转单基因烟草相比具有更强的杀虫活性,其中尤以 30 号杀虫性最强(图 3)。用棉铃幼虫在培养皿中取食叶片,也得到相同的结果。对于一龄棉铃幼虫,取食转 CpTI 烟草或转 B. t 烟草,4 天后,和对照相比,个体小,部分幼虫死亡,取食转双基因烟草幼虫,4 天后全部死亡(图 4)。死亡率见表 1,从表中可以看出,各转基因植物都具有杀虫活性,B. t 的杀虫活性比 CpTI 要强,而转双基因植物杀虫效果最强。

表 1 转基因烟草的杀虫活性

Table 1 Insecticidal activity of transgenic plants to *Heliothis armigera* larvae

Plants	Original weight (mg)	Average weight of sur- vivals after 4 days (mg*)	Death rate after 4 days* (%)
Control	2.5	20.4±7.0	0
Contain CpTI gene	2.5	9.5±3.6	20
Contain B. t gene	2.5	4.7±1.2	80
Contain CpTI and B. t gene	2.5	0	100

\*: The average weight of survivals and death rate are the result from 12 CpTI gene containing plants, 21 B. t gene containing plants and 3 both gene containing plants.

### 3 讨 论

本文利用共转化方法将 CpTI 及 B. t 基因共转进烟草,在构建载体时,外源基因靠近 Ti 质粒的右边界序列,GUS 基因比外源基因更远离右边界,在这种构建中,根据农杆菌转化的机理<sup>[9]</sup>,GUS 基因表达阳性植株,含有外源基因的可能性很大,实验证明,55 株 GUS 阳性中有 47 株检测到外源基因(CpTI 或 B. t)。

我们在实验中选取棉铃虫进行实验,一方面是由于棉铃虫和烟青虫同属于鳞翅目夜蛾科的害虫,也危害烟草,另一方面是由于棉铃虫已达人工饲养的水平,我们采用人工饲养的棉铃虫,可以减少昆虫个体之间的差异,保证实验的准确性。从实验结果来看,转 CpTI 基因烟草的杀虫活性和文献[10]报道的类似,转 B. t 植株的杀虫活性较强,转 CpTI 及 B. t 双基因植株的杀虫活性最强,在我们的实验中,它可以 100%地杀死棉铃幼虫。另外从理论上来看,转双基因植物由于其含有蛋白酶抑制剂及 B.t δ-内毒素具有不同的杀虫机制,其对防止昆虫产生抗性方面将起到一定的作用。

### 参 考 文 献

- [1] 范云六. 中国农业生物技术学会暨首次学术研讨会论文集, 1993, 9—14.
- [2] Pelark *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991. 88: 3324—3328.
- [3] 王京红等. 农业生物技术学报, 1994. 2 (1): 100—102.
- [4] Hilder V A *et al.* Plant Molecular Biology, 1989. 13: 701—710.
- [5] 华学军等. 科学通报, 1993. 38: 747—751.
- [6] 魏富圣. 硕士毕业论文, 中国农业科学院研究生院, 1992.
- [7] Gynheung An *et al.* In: Plant Molecular Biology Manual, Stanton B., Gelvin *et al.* eds., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. 1—19.
- [8] Jefferson R A. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5 (4): 387—405.
- [9] Elizabeth Howard *et al.* In: Plant Gene Transfer, Christopher J. Lamb. *et al.* eds. UCLA Symp. Mol Cell Biol. New Series, New York: Wiley Liss, 1989. 129: 3—18.
- [10] 刘春明等. 科学通报, 1992. 18: 1425—1428.

## Highly Insect-resistant Transgenic Tobacco Plants Containing Both *B. t* and CpTI Genes

Zhao Rongmin Fan Yunliu Shi Xiping Wang Jinghong Zong Weixing

(Laboratory of Molecular Biology, Biotechnology Research Center,

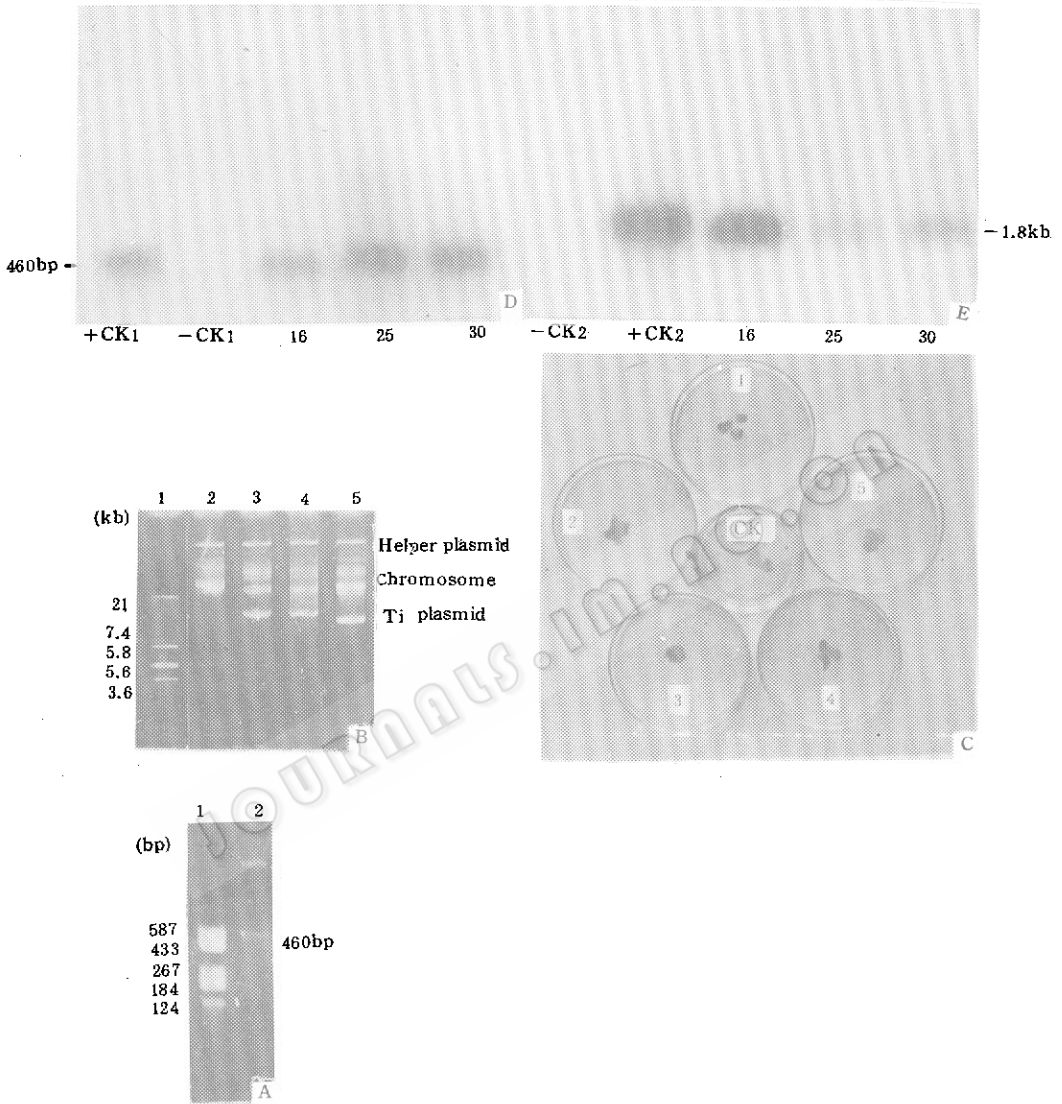
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract** The cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene was synthesized according to its cDNA sequence using DNA Synthesizer and confirmed by DNA sequencing. The CpTI gene and modified *Bacillus thuringiensis* (*B. t*)  $\delta$ -endotoxin gene were cotransformed to tobacco explants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The integration of *B. t* and CpTI gene was confirmed by PCR and Southern hybridization. Three kinds of transgenic plants were obtained; (1) containing CpTI gene, (2) containing *B. t* gene, (3) Containing both CpTI and *B. t* genes. Bioassays showed that the transgenic plants were insecticidal to the larvae of *Heliothis armigera*, and that the tobacco plants containing both genes had enhanced toxicity to larvae by comparison with plants containing only CpTI or *B. t* gene.

**Key words** Cowpea trypsin inhibitor, *B. t*  $\delta$ -endotoxin, cotransformation highly insect-resistant tobacco

### 《生物工程学报》入选最新“中国自然科学核心期刊”

中国自然科学核心期刊研究课题组不久前公布了最新的“1992—1993年中国自然科学核心期刊”300种。这是根据国家标准“GB/T13745—92”规定的学科分类标准，优选30种中国出版的各学科代表性期刊，对它们在92、93年所发表的论文，使用“引文法”进行客观统计后得到的结果。在仅占目前期刊总数4%比例的300种核心期刊中，综合性期刊及数理科学等学科期刊占28%，医药卫生期刊占28%，地学天文期刊占20%，生物农林类占24%。全部核心期刊名单及详尽评述将在国际核心期刊研究会的综合性学术期刊《科学技术学报》磁盘周刊上发表。按被引用频次从高到低的顺序排列，《生物工程学报》名列核心期刊第64名。



A. pFZCOW digestion map

1. pBR322 HaeIII marker
2. pFZCOW digested by EcoRI-HindIII

B. The plasmid in L36, L004

1.  $\lambda$  DNA EcoRI marker, 2. LBA4404, 3. L004
4. L004, 5. L36

C. GUS activity of transgenic plants

- CK: Leaves from tobacco plants NC89  
1-5: Leaves from transformed tobacco plants

D. PCR-Southern hybridization of cotransformed plants using CpTI gene primers and probe

- CK1: plant NC89, +CK1: plasmid pFZY1, 16: plant No. 16, 25: plant No. 25, 30: plant No. 30

E. PCR-Southern hybridization of cotransformed plants using *B. t* gene primers and probe

- CK2: plant NC89, +CK2: plasmid pFWZ10, 16: plant No. 16, 25: plant No. 25, 30: plant No. 30