

农业生物技术

水稻中 *cry1Ah1* 基因密码子优化方案的比较

周宗梁^{1,2}, 林智敏³, 耿丽丽², 苏军³, 束长龙², 王锋³, 朱延明¹, 张杰²

1 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

3 福建省农业科学院农业遗传工程重点实验室, 福建 福州 350003

周宗梁, 林智敏, 耿丽丽, 等. 水稻中 *cry1Ah1* 基因密码子优化方案的比较. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1184-1194.
Zhou ZL, Lin ZM, Geng LL, et al. Comparison of codon optimizations of *cry1Ah1* gene in rice. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1184-1194.

摘要: *cry1Ah1* 基因是本实验室克隆的具有自主知识产权的模式基因, 对鳞翅目害虫水稻二化螟等具有高毒力, 具有较好的应用前景。为提高 *cry1Ah1* 基因在水稻中的表达量, 探讨密码子使用频率对基因表达的影响, 依据水稻密码子使用频率设计 5 种不同的优化方案, 提高 GC 含量并去除剪切信号等不稳定因素后合成 *cry1Ah1* 基因杀虫活性区域。优化后的基因在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中正常表达了 65 kDa 蛋白, 表达蛋白对 2 龄小菜蛾和水稻二化螟初孵幼虫都具有良好的杀虫活性。优化的基因转化水稻日本晴后, PCR 阳性率达到 87% 以上, 实时荧光定量 RT-PCR 和 ELISA 分析表明全部采用最高频率密码子的优化方案效果最好, *Cry1Ah* 蛋白平均表达量占可溶性蛋白的 0.104%。

关键词: *cry1Ah1* 基因, 水稻, 密码子优化, 实时荧光定量 PCR, 酶联免疫

Comparison of codon optimizations of *cry1Ah1* gene in rice

Zongliang Zhou^{1,2}, Zhimin Lin³, Lili Geng², Jun Su³, Changlong Shu², Feng Wang³, Yanming Zhu¹, and Jie Zhang²

1 College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China

3 Fujian Provincial Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

Abstract: *cry1Ah1*, one of holo-type *cry* genes, cloned in this laboratory from *Bacillus thuringiensis* strain has been

Received: April 6, 2012; **Accepted:** May 7, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB118902), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A203), National Transgenic Major Program of China (No. 2008ZX08001-001).

Corresponding author: Jie Zhang. Tel: +86-10-62815921; Fax: +86-10-62812642; E-mail: jzhang@ippcaas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB118902), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A203), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2008ZX08001-001) 资助。

patented in China, and it encoded a protein with strong insecticidal activity against certain lepidopteran insect pests, such as *Chilo suppressalis*. *cryIAh1* gene is exhibiting good application prospects. In order to improve the expression level of *cryIAh1* gene in rice, and investigate the effect of codon usage preference of gene expression, we designed five different optimized schemes for *cryIAh1* insecticidal critical fragment in accordance with bias of rice codon, to improve G+C content, removed the shear signal and unstable factors. Optimized *cryIAh1* genes were transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) respectively, and 65 kDa polypeptides was expressed normally in inclusion body separately. All of these expressed polypeptides showed insecticidal activity against 2nd-instar larvae of *Plutella xylostella* and neonate of *Chilo suppressalis*. After transformation with modified *cryIAh1* genes into *Var nipobare*, the transgenic rice seedlings were detected by PCR, the positive rate containing target gene was more than 87%. Afterwards, the results of real-time RT-PCR and ELISA assay indicated that the highest expression level of five modified *cryIAh1* genes was that using the highest frequent codons. Average expression amount of CryIAh1 polypeptides was 0.104% of total soluble proteins from the positive transgenic rice.

Keywords: *cryIAh1* gene, *Oryza sativa*, codon optimization, Real-time PCR, ELISA

自 1996 年美国孟山都公司成功商业化种植抗虫棉以来, 转基因作物商业化已经 16 年, 至 2011 年年底, 全球转基因作物种植面积达到 1.67 亿公顷^[1]。国内外转 Bt 基因抗虫水稻在研发方面已经取得较大突破^[2-4], 其中我国政府于 2009 年批准了转基因抗虫水稻商业化应用生物安全证书, 预示着转 Bt 基因水稻等重要农作物在未来农业生产中将发挥重要的作用。

1987 年, Vaeck 等在研究转 Bt 基因烟草时发现野生型全长 *cryIA (b)* 基因转化烟草后不表达, 而改造后的基因在植株中却具有一定的杀虫活性^[5]。究其根本原因是原核生物与真核生物基因存在很大的差别, 例如: A/T (G/C) 含量和密码子的使用频率的差异, 并且原核生物不具有真核生物基因中的 5'非翻译区序列和 3'末端识别信号序列^[6-7], 使很多来源于原核生物的基因在真核生物中直接表达时效率不高^[8]。Wilbur 等发现了细菌与高等植物在密码子的使用方面的差异^[9], Tohru Hayakawa 等对 *cry4Aa* 基因改造时发现密码子偏好性是影响基因表达的重要原因^[10]。同时

发现生物体对同义密码子的选择不仅在基因表达水平方面发挥重要调节作用, 而且有利于提高翻译的准确性和效率^[11-13]。

随后人们发现影响外源基因表达水平的因素还有表达系统 (启动子强度、载体性质、RNA 二级结构)、外源基因结构 (终止密码子)、表达条件等^[14]。因此人们在对编码区进行密码子优化的同时, 提高基因的 G+C 含量^[15], 改造造成表达量过低的一些不稳定元件 (Instability elements), 包括类似植物内含子的 A+T 富含区^[16]、潜在的植物 polyA 序列 (Polyadenylation signal sequences)^[17]、对 mRNA 不稳定有影响的 ATTTA 序列^[15]以及植物少用或罕见的密码子等, 都是基因优化改造的必要内容。Koziel 等在改造 *cryIAb* 基因时, 将 GC 含量由 38% 提高到 65%, 去除不稳定元件后转化玉米, 发现 Bt 蛋白最高表达量占总可溶性蛋白的 4%^[18]。Perlak 等改造 *cryIA (b)* 和 *cryIA (c)* 基因转化番茄, 发现改造后 Bt 杀虫蛋白表达量提高 10~100 倍, 最高表达量占总可溶性蛋白的 0.3%^[19]。但目前对外源基

因密码子进行系统优化、分析比较研究在国内未见正式报道。

具有我国自主知识产权的新型 Bt 杀虫基因-*cryIAh1*^[20], 其编码的 CryIAh 蛋白对棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 等多种鳞翅目害虫具有很高的毒杀活性, 超过目前商业化的 *cryIAb*、*cryIAc* 等基因, 并明确了该基因的杀虫活性区域在第 28~640 个氨基酸^[21]。这将成为我国新一代抗虫转基因作物创制的重要保证。本研究根据水稻偏爱密码子对 *cryIAh1* 基因进行了 5 种不同优化, 通过比较转基因水稻的转录和翻译水平的差异, 分析了不同优化方案对基因表达的影响, 获得了最佳的优化方案, 此研究将为其他 Bt 基因的优化和转基因植物的研究提

供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本文所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 材料和试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Ex Taq 酶、M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。RNAprep pure Plant Kit 植物总 RNA 提取纯化试剂盒、RealMasterMix 购自天根公司。BCA Protein Assay Kit 可溶性总蛋白定量试剂盒、包被液等 ELISA 所有试剂购自康为公司。CryIAh 抗体由本实验室制备。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characterization	Resource
<i>E. coli</i>		
Rosetta (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsB</i> _B (<i>R_B⁻ m_B⁻</i>), <i>gal dcm λ</i> (DE3 [<i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7 gene 1</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i>]), pLysSRARE (Cam ^r)	This lab
JM109	<i>rpsL (str^r)</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> ¹ , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , <i>Δ (lac-proAB)</i> /[F ⁺ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZAM15</i>]	This lab
<i>Agrobacterium</i>		
LBA4404	Sm ^r , Rif ^r	Fujian Provincial Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences
Plasmids		
pMD19-T vector	<i>lacZ</i> operon, Amp ^r , multiple cloning site	TaKaRa
pEB1Ah1	<i>lac</i> operon, T7 promoter, multiple cloning site, His-Tag, HSV-Tag, <i>lacZ</i> start codon, <i>E. coli</i> promoter, modified <i>cryIAh1</i> (64 nt-1998 nt), Amp ^r	This study
pUPTn	Ubiquitin promoter, multiple cloning site, Tnos	Fujian Provincial Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences
pCAMBIA1300	CaMV35S promoter, Hm ^r , polyA, multiple cloning site	Fujian Provincial Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences
pCAMBIA1300UAh	CaMV35S promoter, Hm ^r , Ubiquitin promoter, modified <i>cryIAh1</i> (64 nt-1998 nt), Tnos, polyA, multiple cloning site	Fujian Provincial Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences

水稻日本晴 *Var Nippobare* 由福建省农业科学院农业遗传工程重点实验室提供。

小菜蛾 *Plutella xylostella* 由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供。水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 由中国农业科学院植物保护研究所水稻害虫研究组提供。

1.1.3 主要仪器和设备

荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。多功能酶标仪购自美国 Poten 公司。核酸蛋白分析仪购自美国 Berkam 公司。

1.2 方法

1.2.1 *cryIAh1* 基因的密码子优化

根据 CUTG (Codon Usage Tabulated from GenBank) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) 中水稻密码子使用频率表对 *cryIAh1* 基因编码区 (64~1998 nt) 杀虫关键区域^[21], 在不改变原有 645 个氨基酸序列前提下进行密码子优化, 同时综合真核生物中影响基因转录、翻译及 mRNA 稳定性等因素, 去除编码区中的剪切信号以及常用的限制性酶切位点, 起始密码子前加入 Ω 序列^[22]和 Kozak 序列^[23], 在双终止子 (TGATGA) 前加入 KDEL 序列^[24], 经 RNA 二级结构分析, 改掉存在二级结构臂或环上的错配碱基, 去掉连续 9 个以上配对的二级结构臂。优化的基因由南京金斯瑞公司合成。

1.2.2 原核表达载体的构建

将合成的优化后基因 1 959 bp 连接至 pEB 载体构建 pEB1Ah1 质粒, 经测序鉴定后转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株^[25]。

1.2.3 改造后基因的原核表达

表达菌株在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 30 °C、150 r/min 的条件下诱导 16 h^[25], SDS-PAGE 分析

可溶性与非可溶性蛋白, 利用 MaBiophotonics Image J 软件对目的蛋白定量。

1.2.4 杀虫活性测定

称取 3 g 小菜蛾人工饲料 (本实验室制备), 将目的蛋白稀释成 5、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度拌入饲料, 每个样品梯度 3 个重复, 每个重复接 30 头 2 龄敏感种群小菜蛾幼虫, 置于 25 °C 恒温培养箱中, 光照条件为 12 : 12 (L/D), 48 h 后检查活虫数。

称取 10 g 水稻二化螟人工饲料 (中国农业科学院水稻害虫组提供), 将目的蛋白稀释成 5、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度拌入饲料, 每个样品梯度 3 个重复, 每个重复接 30 头初孵敏感种群水稻二化螟幼虫, 置于 25 °C 恒温培养箱中 (保持黑暗), 7 d 后检查活虫数。

1.2.5 水稻遗传转化

水稻日本晴 *Var Nippobare* 的遗传转化由福建省农业科学院农业遗传工程重点实验室完成。采用 Ubiquitin^[26-27]为启动子的表达载体和农杆菌介导转化方法。五种方案优化的基因采用同样的启动子、载体和转化方法 (图 1)。

1.2.6 PCR 检测

以 CTAB 法^[26]提取的水稻叶片基因组为模板, 以非转基因日本晴为阴性对照, 利用表 2 引物对水稻抗性苗进行目的基因和潮霉素抗性基因检测。

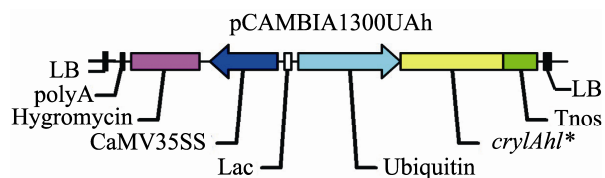


图 1 植物表达载体 pCambia1300Uah 示意图

Fig. 1 Construction of vector pCambia1300Ah.

所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.7 实时荧光定量 RT-PCR 检测

提取水稻叶片总 RNA (步骤见植物总 RNA

提取纯化试剂盒说明书), 反转录合成 cDNA 第一链 (步骤见反转录试剂盒说明书)。利用表 3 引物对采用四步法^[28]以含内参基因 actin (GenBank Accession No. NM_197297) 和优化后

表 2 引物

Table 2 The primers and their names

Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>OscrylAh1-1</i>	Zzl1PCR1F	GGACGTGGTGTCTTTGGC	497
	Zzl1PCR1R	CGTAGAGCGGAAGGTGAA	
<i>OscrylAh1-2</i>	Zzl2PCR1F	CAGAACCAGTGCCTGCCT	434
	Zzl2PCR1R	TGGATTTTGAGAACGGAGATT	
<i>OscrylAh1-3</i>	Zzl3PCR1F	GCATAGAGCGGAGCATTAGG	402
	Zzl3PCR1R	CGTTGTTGTTCTGTGGTGGTA	
<i>OscrylAh1-4</i>	Zzl4PCR1F	AAATGCGGCTCCACAACA	474
	Zzl4PCR1R	AACCGAACAAGATCCCCTC	
<i>OscrylAh1-5</i>	Zzl5PCR1F	CCTTTGAAGTCCAAGTCTC	429
	Zzl5PCR1R	GTGGGCTCCTAATGCTCC	
Hm ^f	HPCRf	ATCGGCGCAGCTATTTAC	225
	HPCRr	GCCCTTCTCCCTTTATT	

表 3 引物

Table 3 The primers and their names

Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>OscrylAh1-1</i>	Zzl1-1F	CCTCTTCCCGAACTACGAC	147
	Zzl1-1R	GGGCTCCTGATGCTCCTC	
<i>OscrylAh1-2</i>	Zzl2-7F	ACGGTGGATTTCGCTGGAC	188
	Zzl2-7R	TCCGATGCGATGATGTTG	
<i>OscrylAh1-3</i>	Zzl3-13F	GGGCTTTGTGGGTCCTTC	154
	Zzl3-13R	CTCGGCAAACGCAGTGGC	
<i>OscrylAh1-4</i>	Zzl4-16F	TCAGATCATGGCGTCTCCT	169
	Zzl4-16R	GATCCCGATGTTGAAAGGT	
<i>OscrylAh1-5</i>	Zzl5-2F	CGACCGAGACCTACATCAGC	132
	Zzl5-2R	GCCCCGAAGAACCACAT	
Actin	Actin-3F	GATGCTTATGTCGGTGAT	153
	Actin-3R	ATGCTCTTCTGGTGCTAC	

基因重组质粒为标准品进行反应,内参基因扩增反应条件:95 °C 2 min; 94 °C 15 s, 54 °C 15 s, 68 °C 20 s, 80 °C 6 s, plate read 40 个循环,目的基因扩增反应条件:95 °C 2 min; 94 °C 15 s, 58 °C 15 s, 68 °C 20 s; 82 °C 6 s, plate read 40 个循环。用 IQ5 软件读取数据。

1.2.8 BCA 法测定可溶蛋白含量和 ELISA 间接法测定 *Cry1Ah* 蛋白含量

测定可溶性总蛋白浓度 (步骤见 BCA Protein Assay Kit 试剂盒说明书),建立可溶性总蛋白标准曲线,计算各样品中可溶性总蛋白浓度。采用 ELISA 间接法^[26]测定 *Cry1Ah1* 标准品及待测样品在 450 nm 处的吸光值,建立目的蛋白的标准曲线,计算各样品中目的蛋白的浓度。

2 结果与分析

2.1 *cryIAh1* 基因的密码子优化和分析

五种方案 (方案一:将密码子全部替换为每个氨基酸中的最高频密码子;方案二:只将稀有密码子转变为最高频密码子;方案三:按照密码子频率使用表中各密码子使用频率优化;方案四:将序列中的密码子换为中等频率的密码子;

方案五:使用每个氨基酸最高频的两种密码子)优化后基因的 GC 含量提高到 45.5% 以上,同源率为 70.59% 以上且更倾向于使用植物偏爱的密码子。方案一优化后的基因除个别剪切位点外全部采用最高频率密码子,GC 含量最高,RNA 二级结构最稳定,与原序列的碱基相似性最小 (表 4)。

2.2 改造后基因的原核表达分析

SDS-PAGE 分析结果显示,非可溶组分中含有目的蛋白与预期大小相同,65 kDa 条带,与阳性对照一致。而在可溶性组分中没有该目的条带。表明改造后的基因能在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中正常表达 (图 2)。

2.3 生物活性测定

五种方案优化后表达的目的蛋白浓度分别为 0.60、0.90、0.360、0.30、0.48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,野生型阳性对照为 3.36 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。对小菜蛾生物活性测定结果表明,目的蛋白浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时校正死亡率为 100%,阴性对照死亡率为 10%;五种方案目的蛋白浓度在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下校正死亡率分别为 37%、37%、40%、41%、33%,野生型阳性

表 4 *cryIAh1* 基因优化前后物理参数的比较

Table 4 Comparison of parameters of modified *cryIAh1* gene with wild type gene.

Option	Content of G+C (%)	Minimum free energy of the structure (kcal/mol)	Identity (%)
Wild type	37.8	-269.84	100.00
1	63.7	-385.70	70.59
2	52.1	-300.75	85.84
3	51.1	-326.40	83.10
4	45.5	-309.56	78.76
5	57.5	-367.89	76.64

对照的校正死亡率为 52%，表明 5 种优化后蛋白小菜蛾都具有一定的杀虫活性。对水稻二化螟生物活性测定结果表明，5 种方案目的蛋白浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下死亡率为校正 100%，阴性对照的死亡率为 3%，5 种方案蛋白在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下的校正死亡率分别为 22%、21%、27%、26%、24%，野生型阳性对照的校正死亡率为 32%，表明 5 种优化后蛋白对水稻二化螟具有一定的杀虫活性。生测结果说明由于基因优化没有改变氨基酸的序列，不同优化的基因对靶标害虫杀虫活性

没有显著影响。

2.4 转基因水稻 PCR 鉴定

五种方案样品 PCR 检测抗性苗分别为 25、35、29、39、28 株。图 3 为方案一样品进行 PCR 检测，阴性对照和空白对照均没有条带，样品扩增得到与阳性对照相同大小的目的基因 497 bp 和潮霉素基因 225 bp 的条带，PCR 阳性率为 88%，其他 4 种方案阳性率分别为 94%、93%、87%、93%。表明各方案 PCR 阳性率较高，转化效率较高。

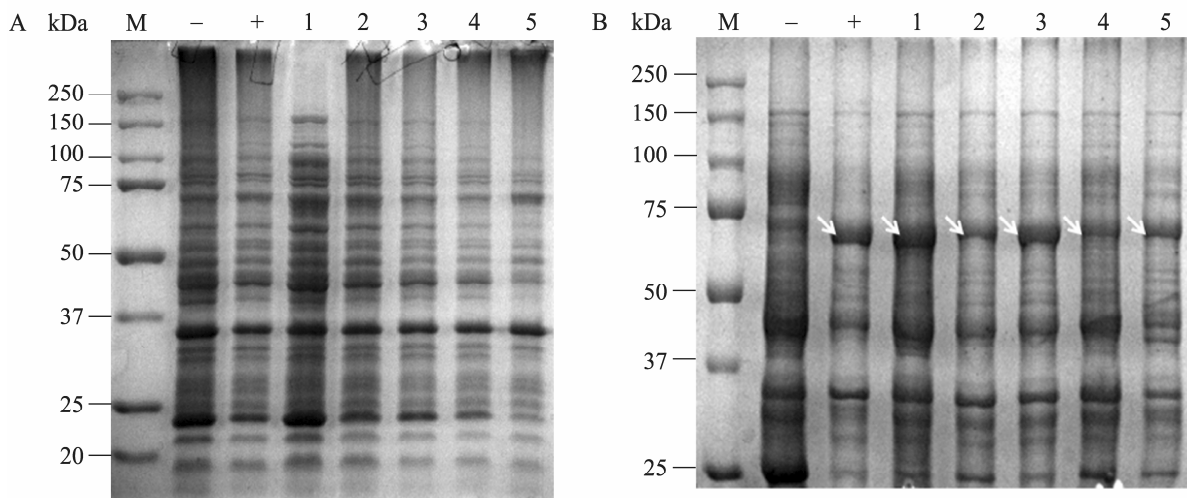


图 2 表达蛋白可溶组分 (A) 和非可溶组分 (B) 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of soluble and insoluble part. (A) M: protein marker; -: soluble part of pEB; +: soluble part of wild type; 1-5: soluble part of five program. (B) M: protein marker; -: insoluble part of pEB; +: insoluble part of wild type; 1-5: insoluble part of five program.

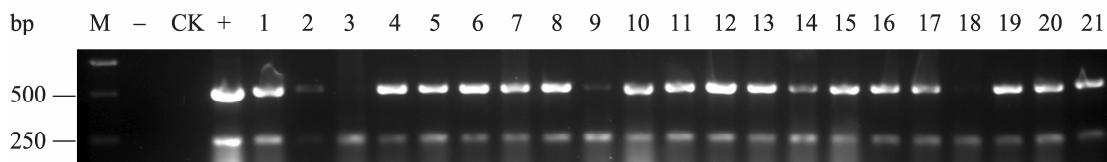


图 3 水稻基因组的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of rice genomic DNA by PCR. M: DNA marker; -: blank; CK: control; +: positive control; 1-21: sample.

2.5 SYBR green I 实时荧光定量 RT-PCR 鉴定分析

内参基因和目的基因的模板起始浓度的对数与模板 CT 值存在线性关系。图 4 为方案一的内参和目的基因标准曲线。内参基因的起始模板浓度的

对数与 CT 值的相关系数为 $0.995 > r_{0.01} = 0.9172$ ，达到了极显著水平。目的基因的起始模板浓度的对数与 CT 值相关系数为 $0.993 > r_{0.01} = 0.9587$ ，达到了极显著水平。根据回归方程计算出各方案目的基因/内参基因即相对转录水平。

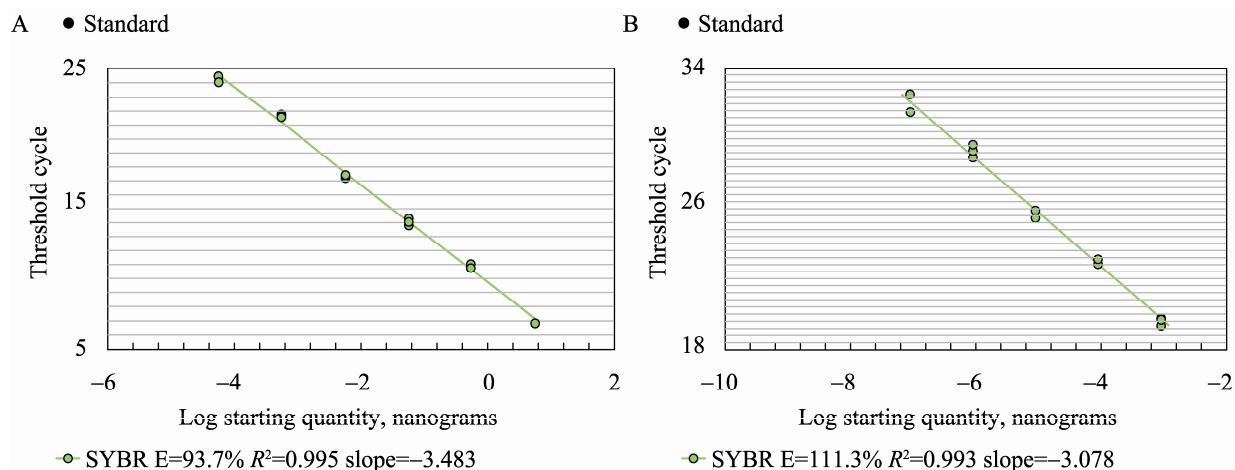


图 4 内参基因 (A) 和目的基因 (B) 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of actin (A) and target gene (B) between CT value and templates.

各方案中样品的相对转录水平的平均值和标准差如图 5 所示，其中方案一全部采用最优密码子的优化方案的平均相对转录水平高于其他方案，平均值为 0.273，方案三按照各密码子频率使用密码子的优化方案次之，平均值为 0.103 (图 5)。

2.6 ELISA 间接法检测目的蛋白的相对含量

如图 6 所示，光密度值与蛋白浓度存在线性关系。可溶性蛋白 BSA 标准品含量与相应的 OD_{562} 值的相关系数为 $0.9999 > r_{0.01} = 0.87453$ ，达到了极显著水平。Cry1Ah1 标准品含量与相应的 OD_{450} 值的相关系数为 $0.9383 > r_{0.01} = 0.87453$ ，达

到了极显著水平。计算得出目的蛋白/可溶性总蛋白即相对蛋白含量 (%)。

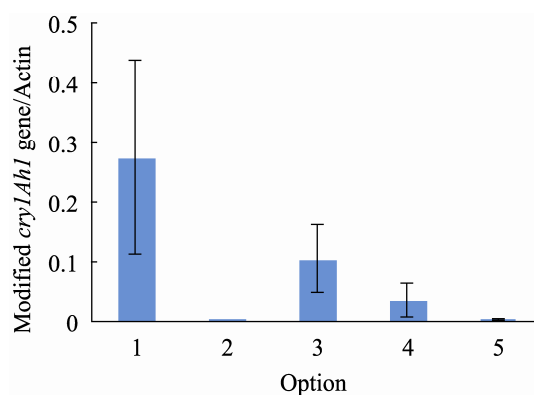


图 5 改造后基因的相对转录水平

Fig. 5 Relative transcript level of modified genes.

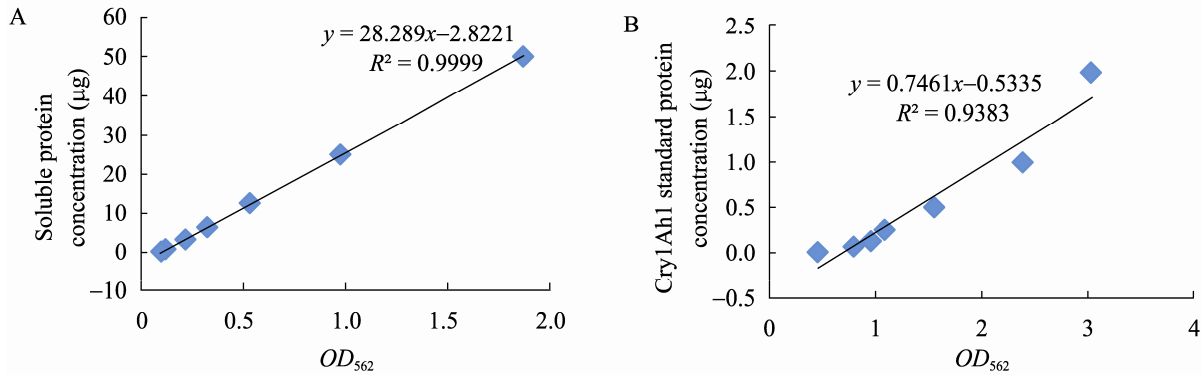


图 6 可溶性总蛋白 (A) 和目的蛋白 (B) 标准曲线

Fig. 6 Standard curve of soluble protein (A) and target protein (B) between OD and protein concentration.

全部采用最优密码子的优化方案相对蛋白含量优于其他方案, 平均相对蛋白含量为 0.104%, 而方案三次之, 平均相对蛋白含量为 0.091%, 各方案样品间相对蛋白含量较稳定 (图 7)。

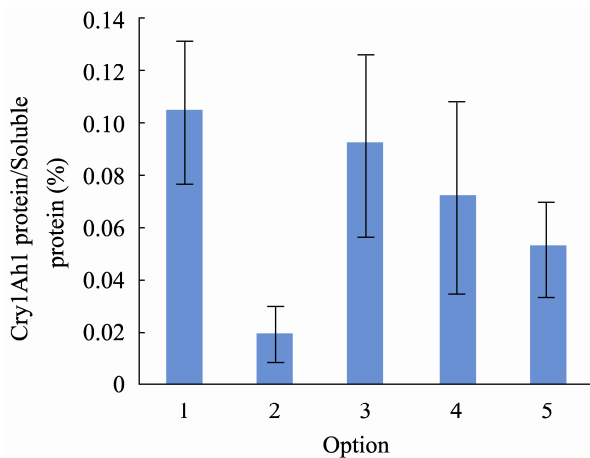


图 7 *Cry1Ah1* 蛋白的平均相对蛋白含量

Fig. 7 Relative protein content of *Cry1Ah1*.

3 讨论

本研究根据水稻氨基酸密码子的使用频率对 *cry1Ah1* 基因杀虫关键区域进行 5 种不同的优

化, 提高 GC 含量, 去除内含子剪切信号等不稳定因素, 并加以必要的修饰, 转化水稻日本晴后分子检测得出全部采用最高频率的密码子优化方案效果最好, 在转录和翻译水平上比较了不同优化方案之间的差别, 并获得最佳优化方案, 为 *Bt* 等原核生物基因优化和高效表达提供借鉴。为 *Bt* 抗虫转基因植物的研究奠定了坚实的基础。

在转录和翻译水平分析外源基因表达时, 往往容易出现个别样品在转录和翻译水平不一致的问题^[29], 本实验中个别样品也有此现象产生, 分析原因可能是 Real-time PCR 的灵敏度要远高于 ELISA, 所以个别样品的转录水平上的差距可能加大。同时密码子只是决定基因表达水平高低的因素之一。翻译起始区二级结构也会对基因的表达造成影响, 本研究将各优化基因的-4~+37 翻译起始区^[30]的二级结构自由能降到最低, 分别为-3.23、-2.50、-1.44、-2.03、-3.23 kcal/mol, 且没有明显差异, 以排除翻译起始区 RNA 二级结构自由能的较大差异对基因表达造成影响。此外 Murray 等发现在研究特异的密码子偏性时,

并不是所有的高表达基因（如编码核糖体蛋白和组蛋白的基因）都有显著的密码子偏性^[31]，说明真核生物中密码子的偏性并不是由翻译效率决定的，而可能是和基因组中的 isochore 结构及含 CG 二核苷酸的密码子使用有关。这些还有待今后进一步实验进行证实。本研究从转录和翻译等分子水平分析比较了各个优化方案的差异，但是，由于转基因植物耗时长，工作量巨大，尚未积累足够的转基因水稻进行温室和田间抗虫实验，这项工作也将在近期开展，完成后续的相关评价实验。

REFERENCES

- [1] Clive J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Ithaca: ISAAA, 2012, Brief No. 44.
- [2] Cohen MB, Gould F, Bentur JS. Bt rice: practical steps to sustainable use. International Rice Research Notes, 2000, 25(2): 4–10.
- [3] Ye GY, Shu QY, Yao HW, et al. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* berliner to two stem borers. J Econ Entomol, 2001, 94(1): 271–276.
- [4] Qiu CX, Sangha JS, Song FS, et al. Production of marker-free transgenic rice expressing tissue-specific *Bt* gene. Plant Cell Rep, 2010, 29(10): 1097–1107.
- [5] Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, et al. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 1987, 328(6125): 33–37.
- [6] Lin YJ, Zhang QF. The transformation of synthetic *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene of *cry2A*: China, ZL021390000. 2006-03-08. 林拥军, 张启发. 改造合成的苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry2A*: 中国, ZL021390000. 2006-03-08.
- [7] Leigh H, Susan M, James W, et al. Nucleic acid segments encoding modified *Bacillus thuringiensis* coleopteran-toxic crystal proteins: US, 6060594. 2000-05-09.
- [8] Mittler IJ, Plaisted DC, Houghton W, et al. DNA construct containing *Bacillus thuringiensis* gene and plants containing it: US, 6342660 B1. 2002-01-29.
- [9] Campbell WH, Gowri G. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. Plant Physiol, 1990, 92(1): 1–11.
- [10] Hayakawa T, Howlader MTH, Yamagiwa M, et al. Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry4Aa* gene: hyperexpression in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(6): 1033–1037.
- [11] Zhang L, Jin LG, Luo L, et al. Analysis of nuclear gene codon bias on soybean genome and transcriptome. Acta Agronom Sin, 2011, 37(6): 965–974. 张乐, 金龙国, 罗玲, 等. 大豆基因组和转录组的核基因密码子使用偏好性分析. 作物学报, 2011, 37(6): 965–974.
- [12] Li CL, Han L, Zheng ZY, et al. Optimization of plant *des-pGlu1-Brazzein* gene according to yeast biased codons and its expression in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2011, 27(8): 1158–1163. 李春丽, 韩露, 郑振宇, 等. 植物甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 的密码子优化及其在毕氏酵母中的表达. 生物工程学报, 2011, 27(8): 1158–1163.
- [13] Yang JK, Yan XX, Huang RB, et al. Codon optimization, expression and enzymatic comparison of *Rhizopus oryzae* lipases *pro-ROL* and *m-ROL* in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2011, 27(12): 1780–1788. 杨江科, 严翔翔, 黄日波, 等. 米根霉脂肪酶基因 *pro-ROL* 和 *m-ROL* 在毕赤酵母中的密码子优化、表达和酶学性质的比较分析. 生物工程学报, 2011, 27(12): 1780–1788.
- [14] Yin CG, Du LX, Zhao GP, et al. Optimizing the expression of *Mx* gene in *Escherichia coli* based on rare codon and mRNA structure. Hereditas, 2009, 31(1): 75–82.

- 尹春光, 杜立新, 赵桂平, 等. *Mx* 基因稀有密码子和 mRNA 结构及大肠杆菌表达优化. 遗传, 2009, 31(1): 75–82.
- [15] Nicolai S, Aviah Z, Menachem K, et al. Synthetic *Bacillus thuringiensis cryIC* gene encoding insect toxin: US, 6043415. 2000-3-28.
- [16] Goodall GJ, Filipowicz W. The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell*, 1989, 58(3): 473–483.
- [17] Dean C, Tamaki S, Dunsmuir P, et al. mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated at multiple sites *in vivo*. *Nucl Acids Res*, 1986, 14(5): 2229–2240.
- [18] Koziel MG, Beland GL, Bowman C, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(2): 194–200.
- [19] Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(8): 3324–3328.
- [20] Zhang J, Song FP, Huang DF, et al. *Bt-cryIAh* gene with high toxicity for lepidoptera and its expression product: China, ZL200410009918.9. 2005-05-11. 张杰, 宋福平, 黄大昉, 等. 对鳞翅目昆虫高毒力的 *Bt cryIAh* 基因及其表达产物: 中国, ZL200410009918.9. 2005-05-11.
- [21] Xue J, Zhou ZS, Song FP, et al. Identification of the minimal active fragment of the CryIAh toxin. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(3): 531–537.
- [22] Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, et al. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucl Acids Res*, 1987, 15(8): 3257–3273.
- [23] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl Acids Res*, 1984, 12(2): 857–872.
- [24] Wandelt CI, Khan MRI, Craig S, et al. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J*, 1992, 2(2): 181–192.
- [25] Zhang JT, Shu CL, Song FP, et al. Cloning, expression and insecticidal activity of *cry2Ad* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Bull*, 2009, (10): 146–150, 155. 张静涛, 束长龙, 宋福平, 等. 苏云金芽胞杆菌 *cry2Ad* 基因的克隆及其表达产物的活性分析. 生物技术通报, 2009, (10): 146–150, 155.
- [26] Wang GL, Fang HJ. *Plant Genetic Engineering*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002: 744. 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 744.
- [27] Christensen AH, Quail PH. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res*, 1996, 5(3): 213–218.
- [28] Zhang CY, Zhang GH, Yang M, et al. Elimination of primer-dimer effect in SYBR Green I Real-time RT-PCR using 4-step program. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, 20(3): 387–392. 张驰宇, 张高红, 杨敏, 等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 387–392.
- [29] Hiwasa-Tanase K, Nyarubona M, Hirai T, et al. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic *miraculin* gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 113–124.
- [30] Kudla G, Murray AW, Tollervey D, et al. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science*, 2009, 324(5924): 255–258.
- [31] Murray EE, Lotzer J, Eberle M. Codon usage in plant genes. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(2): 477–498.