

表达昆虫特异性神经毒素 AaIT 基因的 转基因烟草的抗虫性

姚斌* 范云六 曾勤 赵荣敏

(中国农业科学院生物技术中心 北京 100081)

摘要 经改造的昆虫特异性神经毒素 AaIT 基因插入植物高效表达载体得到重组质粒 pNGY-2。重组质粒中 AaIT 基因 5'端与烟草花叶病毒 (TMV) 的 Ω 序列 3'端融合,受两个串联的 35S 启动子控制,通过土壤农杆菌 LBA4404 介导转化烟草 NC89,经 NPT II 选择后再经 GUS 染色挑选出阳性再生植株, Southern blotting 进一步证实了 AaIT 基因已经整合到烟草基因组中,对棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 的抗虫实验表明,转基因烟草有显著的抗虫活性。

关键词 AaIT 基因, 转基因烟草, 抗虫活性

近年来植物抗虫基因工程发展迅速,取得了显著进步。多种抗虫基因已得到克隆并得到相应的转基因植株。但除了转 B. t. 毒素基因的植株进入了田间试验以外,别的还仅在实验室阶段,其原因是各抗虫基因在植物中表达水平较低。B. t. 毒素基因也是经过多年的探索,综合 Codon usage 以及影响 mRNA 不稳定的可能因素等理论知识,对 B. t. 毒素基因编码序列的核苷酸加以改变,使其表达量提高了 50~100 倍,达到抗虫效果。

昆虫特异性神经毒素 AaIT 来源于北非蝎子 *Androctonus australis*⁽¹⁾。它是由 70 个氨基酸组成的多肽,对鳞翅目,特别是夜蛾科的一些重要的农业害虫有毒杀作用⁽²⁾。它具有高效、特异性强、安全性好等优点⁽¹⁾,是抗虫基因工程中有很大发展潜力的优良基因材料。

本研究采用的昆虫特异神经毒素 AaIT 基因,是经过人工改造的⁽³⁾,并在昆虫杆状病毒中已证明有杀虫活性⁽⁴⁾,而且预期能在植物中高效表达。我们把此基因重组到植物高效表达载体上,获得了有明显抗虫活性的转 AaIT 基因的转基因植物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 实验过程中所用菌种和质粒均为本室构建、保存。

1.1.2 酶和生化试剂: 购自华美公司、Promega 公司、Pharmacia 公司、BRL 公司等。

1.1.3 烟草植物材料: 优良品种 NC89。

1.1.4 测试昆虫: 棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 幼虫购自中国农业科学院植物保护研究所。

Rockefeller foundation 国际水稻生物技术项目资助。

* 现工作地址: 中国农业科学院饲料研究所,北京 100081。

本文于 1995 年 8 月 9 日收到。

1.2 重组植物高效表达载体的构建

通过 PCR 的方法从质粒 pFY-1⁽³⁾ 中获得以起始密码子 ATG 起始的 AaIT 基因, AaIT 基因插入植物高效表达载体中与 TMV 的 Ω 序列正确拼接, 并通过序列测定证实其拼接的正确性。

1.3 烟草的转化

重组植物表达载体质粒通过 Hofgen 等⁽⁵⁾ 的冻融法导入农杆菌 LBA4404。按 Horsch 等的叶盘转化法进行转化。浸过农杆菌的小叶片先在不含抗菌素的 MS 培养基上 25℃ 暗培养 2d, 随后转至含 100 μ g/ml 卡那霉素、500 μ g/ml 羧苄青霉素、2 μ g/ml BA 的 MS (a) 培养基上, 25℃、16 h 光周期培养, 待出芽, 将幼芽移至含 100 μ g/ml 卡那霉素、2mg/ml BA 的 MS (b) 培养基上生长, 生根后植株移入土壤中栽培。

1.4 GUS 组织化学检测

取烟草植株的嫩根于 70% 乙醇中处理 5min, 再用无菌水洗两遍, 浸泡于 X-Gluc 检测缓冲液 (2mmol/L X-Gluc, 50mmol/L 铁氰化钾, 5mmol/L 亚铁氰化钾, 0.02% NaN₃) 中, 37℃ 保温 8h, 用 70% 乙醇脱色后观察。被染成蓝色的即为 GUS 阳性。

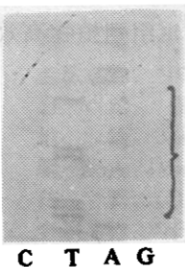
1.5 转基因烟草中 AaIT 基因的 PCR 扩增及 Southern blotting

从植株中提取 DNA, 纯化后作为模板。通过 PCR 仪 (Precision Scientific) 进行 AaIT 基因的体外扩增, 扩增时循环参数为 93℃、20s, 55℃、45s, 72℃、45s, 循环 35 轮。反应混合物进行电泳检测并进一步进行 Southern blotting 检测。

1.6 转基因烟草的抗虫性测定

将大小一致、已称重的二龄棉铃虫放入装有转基因烟草或对照烟草叶片的培养盒中, 每培养盒中放入一头幼虫, 每株植株用 40 头幼虫。叶片通过培养盒底部铺放的几层湿润滤纸保湿。26℃ 光照培养箱内培养 10 d, 每天观察幼虫的取食、生长状况。

2 结果



5' TTTACAATTACC ATGAAGAAG 3'
3' end sequence of Ω 5' end sequence of AaIT gene

图 1 Ω 序列 3' 端与 AaIT 基因
5' 端拼接处的序列分析

Fig. 1 DNA sequence analysis of conjunction of the 3' end sequence of Ω sequence and the 5' end sequence of AaIT gene

2.1 重组植物表达载体的结构

通过 PCR 的方法, 以质粒 pFY-1 上的 AaIT 基因为模板, 得到以起始密码子 ATG 起始的 AaIT 基因, 与 TMV 的 Ω 序列 3' 末端拼接, 通过序列分析, 证实了拼接的正确性 (图 1)。重组植物表达载体 pNGY-2 的结构见图 2。

从图 2 可以看出, 在重组双元表达载体质粒 pNGY-2 中, AaIT 基因的上游有 2 个串联的 35S 启动子和 Ω 序列, AaIT 基因下游是 NOS 终止子。另外, 载体上还带有由 35S

驱动的 GUS 基因和 NOS 启动子驱动的 NPT I 基因, 因此转基因烟草植株可用卡那霉素进行筛选, 并可通过 GUS 的检测来初步判断外源基因的整合。

2.2 烟草的转化再生

重组植物高效表达载体 pGNY-2 通过冻融法导入农杆菌 LBA4404, 在 $10\mu\text{g/ml}$ 四环素的 LB 平板上筛选含重组质粒的农杆菌, 通过从农杆菌中提取重组质粒并作酶切分析进一步证实了质粒 pGNY-2 已导入农杆菌中。

浸染过含重组质粒农杆菌的烟草叶片, 在 MS (a) 培养基上培养 2~3 周后, 100% 的外植体均分化出愈伤组织和芽, 而 80% 的芽能在 MS (b) 培养基上生根, 生根后的烟草移入土壤后成活率达 100%。

2.3 GUS 的组织化学检测

将 90 株转化再生植株和 2 株未转化植株进行 GUS 组织化学检测, 观察到 40% 左右的转化再生植株有 GUS 基因的表达, 但 GUS 呈阳性的植株中其蓝色的程度有差异, 这可能与 T-DNA 插入染色体的位置有关。

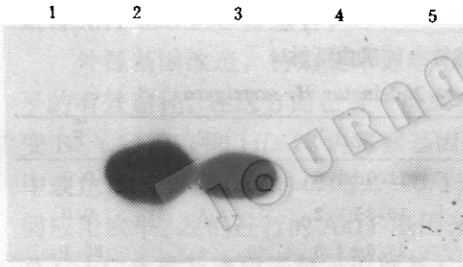


图 3 转基因烟草中 AaIT 基因的 PCR-Southern blotting

Fig. 3 PCR-Southern blotting of AaIT gene in transgenic plants

1. Nontransgenic plant, 2. AaIT gene in plasmid pFY-1, 3. AaIT gene in recombinant expression vector through PCR, 4, 5. AaIT gene in transgenic plants through PCR



图 2 重组植物高效表达载体 pNGY-2 的物理图谱

Fig. 2 Physical map of recombinant expression vector pNGY-2

2.4 植物 DNA 中 AaIT 基因的 PCR 扩增及 Southern blotting

以 GUS 染色阳性的烟草植株 DNA 为模板, 以 AaIT 基因 5' 和 3' 端的合成寡核苷酸片段为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物的电泳分析表明, 10 株转化再生植株中均扩增出一条约 260bp 的特异带, 这与 AaIT 基因的大小一致, 而对照植株无任何 DNA 扩增带。用 AaIT 基因为探针对 PCR 扩增后的条带进行 Southern blotting, 结果 (图 3) 表明: (1) 在对照烟草中没有杂交带; (2) 在以质粒 pFY-1 为模板的 PCR 产物正对照中出现一条大小约 260bp 的杂交特异带; (3) 在转化再生植株中出现杂交特异带, 其位置与阳性对照位置相同。这进一步证明了 AaIT 基因已整合到烟草的基因组中。

2.5 转基因烟草的抗虫性

取 10 株经 Southern blotting 验证为阳性的转基因植株的嫩叶饲喂 2 龄棉铃虫, 每片叶子喂养一头棉铃虫, 每株烟草取 40 片叶子分别作 40 个重复, 结果表明 (表 1, 图 4、图 5): 9 株烟草均有明显的抗虫活性, 但植株间的抗虫活性有差异。喂养 3 d 后, 植株

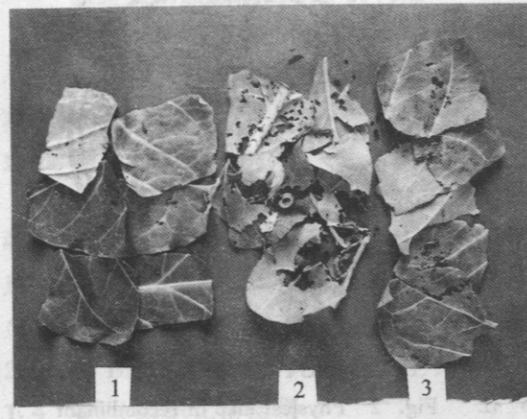


图 4 转 AaIT 基因烟草的抗虫活性的生物测定
Fig. 4 Bioassay of transgenic plants to 2nd-instar larvae of *H. armigera*

1. Leaves of transgenic tobacco plants with AaIT gene and dead larvae
2. Leaves of control tobacco plants and healthy larvae
3. Leaves of transgenic tobacco plants with AaIT gene and inhibited larvae

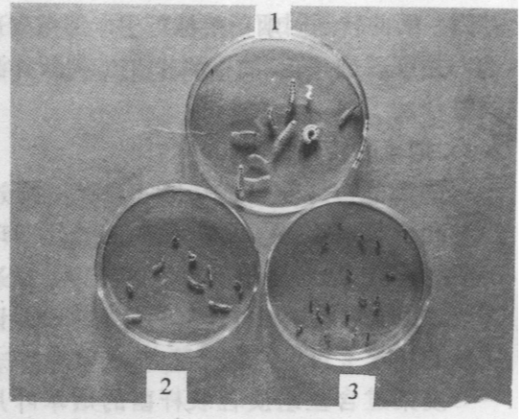


图 5 取食转基因烟草 6 d 后的棉铃虫
Fig. 5 Larvae of *H. armigera* fed on tobacco leaves for 6 days

1. Healthy larvae fed on leaves without AaIT gene
2. Inhibited larvae fed on leaves containing AaIT gene
3. Dead larvae fed on leaves containing AaIT gene

表 1 转 AaIT 基因烟草对二龄棉铃虫的抗虫活性

Table 1 Bioassay of transgenic plants with AaIT gene to 2nd-instar *H. armigera*

No.	A	B	C	D	E	F
NC89-AaIT-2	4.6	10.0	82.5	11.0±1.6	3	0.0
NC89-AaIT-3	4.6	45.0	80.0	10.8±1.2	3	0.0
NC89-AaIT-4	4.6	12.5	12.5	25.6±4.3	4	85.7
NC89-AaIT-6	4.6	10.0	65.0	12.0±1.7	3	0.0
NC89-AaIT-7	4.6	15.0	72.5	8.0±1.7	3	0.0
NC89-AaIT-8	4.6	80.0	100.0	—	—	0.0
NC89-AaIT-9	4.6	70.0	90.0	7.5±1.0	3	0.0
NC89-AaIT-11	4.6	0.0	80.0	11.1±2.8	3	0.0
NC89-AaIT-12	4.6	42.5	80.0	7.9±3.4	3	0.0
NC89-AaIT-13	4.6	17.5	62.5	6.8±2.5	3	0.0
C K	4.6	0.0	2.0	27.5±6.6	4	97.5

A. Average weight of larvae/mg, B. Mortality of 3 days/%, C. Mortality of 6 days/mg, D. Average weight of living larvae after 6 days/mg, E. Instar of living larvae after 6 days, F. Percent of forming chrysalis of living larvae after 10 days

NC89-AaIT-8 和 NC89-AaIT-9 能使高达 85% 和 70% 的昆虫死亡, 其余植株 NC89-AaIT-2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 13 均能使部分幼虫死亡, 而未转基因的烟草对照无一死亡。喂食 6 d 后, NC89-AaIT-8 和 NC89-AaIT-9 能使 100% 和 90% 的幼虫死亡, 其余的植株除 NC89-AaIT-4 外, 均能使 60% 以上的昆虫死亡, 而未转基因的植株仅死亡 2.5%。

在实验过程中还观察到, 饲喂转 AaIT 基因烟草的棉铃虫除大部分死亡外, 其余未死的幼虫生长受到明显的抑制, 饲喂 6 d 后, 未死的幼虫体重仅为对照的 30% 左右, 只发育到 3 龄, 而对照已发育到 4 龄。从饲喂 10 d 后的化蛹情况来看, 饲喂对照烟草的有 97.5% 已化蛹, 而饲喂转基因烟草 NC89-AaIT-2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 的棉铃虫均无化蛹现象。实验还观察到, 转 AaIT 基因烟草中, 幼虫取食叶片的面积比对照显著减少, 尤其是 NC89-AaIT-8, 取食面积仅为对照的 1%。另外, 我们还发现, 取食转 AaIT 基因烟草叶片的棉铃虫, 在死亡前 8~12 h 就出现麻痹、活动能力低、停止取食等症状, 这与 AaIT 毒素毒杀昆虫所引起的典型症状相符。这些结果表明, 转 AaIT 基因具有杀虫生物学活性, 对少数幸存的幼虫也具有抑制虫体生长、延缓发育、大幅度减少幼虫取食的作用。在 10 株转 AaIT 基因的烟草中有 2 株 (NC89-AaIT-8, NC89-AaIT-9) 具有高抗虫性。

3 讨 论

转基因烟草植株对棉铃虫的抗性实验表明, 它们有显著抑制虫体生长、大幅度降低幼虫的取食量、延缓幼虫蜕皮、化蛹并使幼虫致死的作用。这证明, AaIT 基因已整合到烟草基因组中并得到表达。

为了使 AaIT 基因能在烟草中高效表达, 我们依据分子生物学研究进展, 综合影响外源基因转录、翻译及 mRNA 稳定性等各因素, 优化了高效表达各元件, 包括: (1) 有利于 AaIT 基因在植物中高效表达的基因本身的优化设计; (2) 在转录和翻译二个水平上的最佳元件 35S-35S- Ω 组合。

外源基因改造, 特别是来源于植物基因以外的基因改造, 是提高其在植物中表达水平的有效途径。在这方面已有一些成功的报道, 如 Monsanto 公司的 Perlak 等^[6,7]通过改变 B. t. HD-1 和 HD-73 内毒素基因的 codon usage、G+C 含量等, 使其在转基因棉花中表达量达到总蛋白的 0.05%~0.1%, 比没有改造的基因提高了 50~100 倍, 达到了田间应用水平。我们进行的 AaIT 基因改造包括密码子优化 (根据植物密码子使用偏向^[8])、总 G+C 含量及密码子第三位碱基 G+C 含量的提高、去除一些可能影响表达的序列如 A+T 富含序列^[9]、潜在的植物多聚腺苷化信号序列^[10]、mRNA 代谢识别信号序列^[11]等。从抗虫实验结果来看, 我们的改造是成功的。

Ω 序列是烟草花叶病毒 (TMV) 上的 5' 端非编码序列, 它能与核糖体 80S 亚基形成二聚体起始复合物从而增加翻译水平^[12]。Gallie 等^[13]曾报道 TMV 的 Ω 序列能在体内和体外增强报告基因表达 2~10 倍。本研究在启动子之下连接 Ω 序列, 并使之与 AaIT 基因正确拼接, 这无疑也是本研究取得良好结果的因素之一。

启动子的强弱是影响外源基因表达水平的关键因素之一。Kay 等^[14,15]曾将 CaMV35S 启动子进行重复, 得到一个含两个 35S 启动子的表达载体, 其功能比一个 35S 启动子提高了 3~15 倍。在我们的研究中, 采用了两个 35S 启动子串联的构建, 从转基因烟草的抗虫效果来看, 其表达效率是很高的, 这也是本研究成功的关键因素之一。

昆虫特异性神经毒素 AaIT 毒效很高, 只需几纳克到几十纳克就能使昆虫死亡, 同时它还具有特异性强、安全性好等优点, 它的杀虫范围主要集中在鳞翅目夜蛾科昆虫, 如棉铃虫 (*H. armigera*)、烟青虫 (*H. assulta*)、烟草夜蛾 (*H. virescens*)、谷实夜蛾

(*H. zea*) 等。这些昆虫在农业生产上危害严重,同时用一般杀虫剂(包括 *B. t.* 等)其防治效果不理想,因而高效表达 AaIT 基因的转基因抗虫植株的获得无疑具有重要的理论意义和广泛的潜在应用前景。

在抗虫实验中还观察到,棉铃虫取食转基因烟草后,其死亡前 8~12 h 就出现麻痹、不取食现象,这在农业生物防治中有很重要的意义,因为这时幼虫已失去了进一步危害农作物的能力。

另外,还发现取食转基因烟草的幼虫即使能幸存下来,其发育也迟缓,不能正常化蛹或不化蛹,从而可能影响其繁殖,这对害虫的长期防治是有重要意义的。

本研究成功地获得了转 AaIT 基因的抗虫烟草,为植物抗虫基因工程提供了优良的基因材料,并为进一步利用 AaIT 基因、获得能实际应用的抗虫作物打下基础。

参 考 文 献

- [1] Zlotkin E, Fraenkel G, Miranad F. *Toxion*, 1971, 9: 1~8.
- [2] Zlotkin E. *Insect Biochem*, 1983, 13 (3): 219~236.
- [3] 姚 斌, 范云六. *农业生物技术学报*, 1995, 3 (3): 86~92.
- [4] 姚 斌, 范云六, 赵荣敏等. *中国科学 (c)*, 1996, 26 (1): 78~84.
- [5] Hofgen R. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 9877.
- [6] Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A *et al.* *Bio/Technology*, 1990, 8: 939~943.
- [7] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A *et al.* *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1991, 88: 3324~3328.
- [8] Murray E E, Lotzer J, Eberle M. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17 (2): 477~498.
- [9] Godall G J, Filipowicz W. *Cell*, 1989, 58 (3): 473~483.
- [10] Dean C, Tamaki S, Dunsmuir P *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1986, 14 (5): 2229~2240.
- [11] Shaw G, Kamen R. *Cell*, 1986, 46 (5): 659~667.
- [12] Richards K, Guilly H, Jonard G *et al.* *Eur J biochem*, 1978, 84: 513~519.
- [13] Gallie O R, Sleat D E, Watts J W *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 3257~3273.
- [14] Key R, Chan A, Daly M *et al.* *Science*, 1987, 236: 1299~1302.
- [15] Philip N B, Chua N H. *Science*, 1990, 250: 959~966.

Insect-resistant Tobacco Plants Expressing Insect-specific Neurotoxin AaIT

Yao Bin Fan Yunliu Zeng Qin Zhao Rongmin

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract The recombinant plant expression vector pNGY-2 with designed and synthesized AaIT gene had been constructed. The AaIT gene was fused downstream the Ω sequence of TMV and inserted into expression vector under the control of two linked 35S promoters. The recombinant plasmid pNGY-2 was transferred into tobacco NC89 by agrobacterium-mediated leaf-disc gene transfer system. The GUS activity analysis and Southern blotting of regenerated plants indicated that AaIT gene had been introduced into tobacco genome. Insect bioassays showed that transgenic plants had notable insect-resistant activity.

Key words AaIT gene, transgenic tobacco plants, insect-resistant activity