

转雪花莲外源凝集素基因烟草对桃蚜的抑制作用

周 岩 田颖川 吴 标 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技术实验室 北京 100080)

摘 要 将编码雪花莲外源凝集素成熟蛋白的 cDNA GNA12 和其前体蛋白 cDNA GNA34 插入到二元载体 pBin438 的双倍增强子 CaMV 35S 启动子或二元载体 pBcop1 的 CoYMV 启动子下游,分别构建成植物表达载体 pBGna12、pBGna34、pBCGna12 和 pBCGna34。土壤农杆菌介导的转化再生植株的 PCR 和 Southern blot 分析表明,GNA 基因已整合到烟草 DNA 中。Western blot 分析发现 pBGna34 和 pBCGna34 的转基因植株能有效地表达外源 GNA,表达量约占可溶性总蛋白的 0.08%~0.15%,并且前体蛋白基因编码的蛋白在植物体内进行了正确的加工,而 pBGna12 和 pBCGna12 的植株几乎检测不到外源 GNA 的表达。有效表达外源 GNA 的 pBGna34 和 pBCGna34 的转基因植株具有较强的抗蚜活性,平均能够抑制桃蚜 (*Myzus persicae*) 45%~60% 蚜口密度,有的高达 90% 以上。在转基因烟草中含双倍增强子的 CaMV 35S 启动子与韧皮部特异表达的 CoYMV 启动子介导 GNA 基因表达具有相似的强度,但它们的抗蚜活性存在差异。

关键词 雪花莲外源凝集素基因 转基因烟草 蚜虫

学科分类号 Q789

蚜虫是世界性危害最严重的农业害虫之一。蚜虫引起植物营养恶化,产量下降,生长畸形。蚜虫的蜜露覆盖植物表面,影响植物光合作用和呼吸作用,并导致霉菌孳生。更为严重的是,蚜虫是植物病毒传播的介体。在植物病毒传播介体中,蚜虫位居昆虫介体第一位,26 个植物病毒中有 13 个为蚜虫传播^[1],农业生产上极其重要的病毒,大多为蚜虫传播。

抗虫基因工程为抗虫育种提供了一种新的途径。在抗虫基因工程中,目前较常用的外源基因有苏云金杆菌毒蛋白基因、植物蛋白酶抑制剂基因、 α -淀粉酶抑制剂基因和植物外源凝集素(Lectin)基因等。Lectin 为一类具有至少一个能可逆结合特异单糖或寡聚糖的植物蛋白^[2]。其中雪花莲外源凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)在体外或转基因植物的抗虫试验中,已证实对某些咀嚼式和刺吸式昆虫均有抗性,如烟草原夜蛾、豇豆象、飞虱、叶蝉和蚜虫^[3],但对高等动物没有毒性^[4]。Hilder 等^[5]利用 CaMV 35S 启动子和 GNA 基因的嵌合基因转化烟草,获得的转基因烟草在整株抗虫试验中,转基因植物能抑制蚜虫口密度约 50%,并且蚜虫的大小、体重和繁殖率明显下降。

我们运用自己克隆的 GNA 成熟蛋白基因和前体蛋白基因片段(包含 5'-信号序列、成熟蛋白序列和 3'-末端序列)^[6]利用组成型表达的带双倍增强子的 CaMV 35S 启动子和

该项目得到国家 863 计划资助并得到国际科学和文化中心(ICSC,洛桑,瑞士)世界实验室部分资助。

收稿日期:1997-04-01,修回日期:1997-08-20。

韧皮部特异表达的 CoYMV 启动子,分别构建植物中间表达载体,通过土壤农杆菌转化烟草,对转基因植株进行了抗蚜试验及分子检测。本文报道这些实验的主要结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:用于构建外源基因植物表达载体的中间载体质粒 pBin438^[7]和 pBcop1 为本实验室构建。含 CoYMV 启动子的质粒 pColBam302 由明尼苏达大学 N. E. Olszewski 教授惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 和根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 由本实验室保存。

1.1.2 植物:4~5 叶期的无菌培养烟草(*Nicotiana tabacum*)K326,是转化实验的外植体来源。

1.1.3 测试昆虫:将采自本所温室油菜上的桃蚜(*Myzus persicae*),转接到非转基因的健康烟草上,在 22~30℃ 相对湿度为 75%左右的条件下繁殖。

1.1.4 生化试剂:所有限制酶和各种 DNA 修饰酶为 Boehringer Mannheim 和 Promega 公司产品;同位素 α -³²P-dCTP 为 NEN 公司产品;雪花莲外源凝集素购自 Sigma 公司;雪花莲外源凝集素兔抗血清由中科院遗传所实验动物中心协助制备;碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗体购自 BRL 公司。其它试剂购自 Sigma 公司或国内有关厂家。

1.1.5 PCR 引物:GNA 成熟蛋白基因片段的引物 P1、P2^[6]引物由华美生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 中间载体的构建及其向农杆菌的转移:二元载体 pBin438 前文已有报道^[7]。用 HindIII 酶解 pBin438,经 Klenow DNA 聚合酶补平后,再用 BamHI 酶解,分离载体大片段与用 SalI 酶解 Klenow DNA 聚合酶补平,然后 BamHI 酶解 pColBam302 产生的 CoYMV 启动子片段(1kb)连接后得二元载体 pBcop1。用 BamHI 和 XhoI 双酶切将 pGna12 和 pGna34^[6]中的 GNA12、GNA34 基因片段切出后,分别插入到经 BamHI 和 SalI 双酶切的 pBin438 和 pBcop1 中,即得到 GNA 基因的中间载体 pBGna12、pBGna34、pBCGna12 和 pBCGna34。中间表达载体向农杆菌 LBA4404 的直接转化参见文献[8]。

1.2.2 烟草外植体的转化及再生:按文献[8]进行。

1.2.3 转化再生植株的 PCR 分析:转基因烟草叶片总 DNA 的提取按文献[8]的方法。用 P1、P2 引物按 Taq DNA 聚合酶厂家提供的方法进行 PCR 反应,取反应混合物 10 μ l 在 1% Agarose 胶上电泳检查反应产物大小。

1.2.4 转基因烟草的 Southern blot 分析:按文献[8]提取烟草总 DNA。取 20 μ g DNA,用 BamHI 彻底酶解后,在 0.8% Agarose 上电泳,将胶上的 DNA 真空转移到 Zeta-Probe 膜上。按 Pharmacia 公司 DNA 标记盒(Ready-To-GoTM)提供的方法用³²P-d-CTP 标记 GNA12 基因片段,按“分子克隆”所述方法进行杂交^[9]。

1.2.5 转基因烟草的 Western blot 分析:选取 PCR 阳性的转基因植株的第二或第三层幼嫩叶片,按文献[10]的方法进行 Western blot 分析。一抗为兔抗 GNA 抗血清,二抗为碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗体。用 Pharmacia 公司的 Image Master 软件和 Sharp

JX330 扫描仪对 Western blot 的结果进行扫描和定量分析。

1.2.6 转基因烟草的抗蚜试验：用小毛笔将 8 头一龄桃蚜 (*M. persicae*) 接种到 8~10 叶龄的转基因烟草和非转基因烟草植株的中层叶片上，隔日记录每株烟草上蚜虫的数量，直至第 12 天。抗蚜试验重复一次。

2 结果与讨论

2.1 植物表达载体的构建及烟草的转化

载体 pBin438 为含有双增强子的 CaMV 35S (D35S) 启动子以及 TMV “ Ω ” 片段翻译增强子的双元表达载体，它介导外源基因的组成型表达^[7]。GNA34 和 GNA12 基因片段插入到 pBin438 分别获得 pBGna34 和 pBGna12 植物中间表达载体 (见图 1A)。

如本文 1.2.1 中所述，pBcop1 是用 CoYMV 1038bp 全长启动子取代 pBin438 的 35S 启动子后构建而成的植物表达载体，它介导外源基因在烟草韧皮部特异表达。GNA34 和 GNA12 基因片段插入 pBcop1 分别获得 pBCGna34 和 pBCGna12 植物中间表达载体 (见图 1B)。

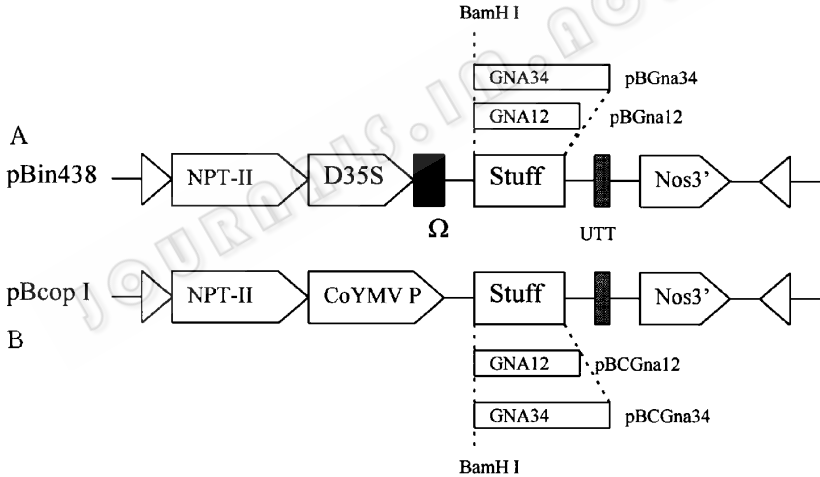


图 1 GNA 基因表达载体的结构

Fig. 1 Structure of expression vectors for aphid-resistant gene

A. Binary vector pBin438 and expression vectors pBGna12 and pBGna34 for GNA gene

B. Binary vector pBcop1 and expression vectors pBCGna12 and pBCGna34 for GNA gene

以上表达载体按材料和方法部分所述转化土壤农杆菌 LBA4404 后用于植物的转化。

土壤农杆菌 Ti 质粒介导的植物遗传转化是以烟草无菌苗外植体叶片作为转化受体，用分别含有 pBGna12、pBGna34、pBCGna12 和 pBCGna34 质粒的农杆菌侵染，在含 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素和 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素的 MS 培养基上选择不定芽，共获得 29 株转化再生的植株。

2.2 转化再生植株的 PCR 检测

多聚酶链式反应(PCR)方法可以快速测定外源基因在转化再生植株中的整合。用 P1 和 P2 引物对所有转化再生植株进行 PCR 检测,结果均扩增得到一条约 350bp 的 DNA 片段,阳性率为 100%。图 2 结果初步表明外源基因已整合到植物 DNA 中。

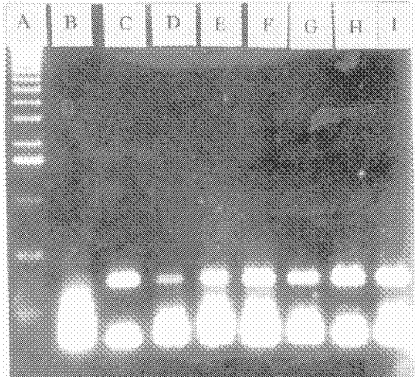


图 2 转化再生植株的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of transgenic tobacco plants

Lane A, DNA 1kb ladder; lane B, nontransformed tobacco control; lanes C, D, E, F, G, H and I, kanamycin resistant, regenerated tobacco plants

2.3 转基因烟草的 Southern blot 检测

在 PCR 检测的基础上,为了进一步确定 PCR 阳性植株的性质,对总 DNA 经 BamHI 完全酶解后进行 Southern blot 分析,同时设立 BamHI 和 XhoI 双酶切 pGna34 的阳性对照,及非转基因植株的阴性对照。在我们所构建的四个中间载体的 GNA 基因前有 BamHI 单一切点,所以由 BamHI 酶解产物与 GNA 基因探针杂交后在杂交膜上形成的条带数将反映外源基因的拷贝数。Southern blot 结果(见图 3)表明所检测的 4 株植株有 1 个或 2 个特异的杂交带,非转基因对照植株没有杂交带,阳性对照(泳道 F)在预期的 480bp 位置有一杂交带,进一步证明这 4 个植株均有 GNA 外源基因插入,其插入拷贝数为 1 个(C、D、E)或 2 个(B)。

2.4 转基因烟草的 Western blot 检测

对 PCR 检测阳性的 29 株植株均进行了 Western blot 分析。图 4 为其中 4 个植株的 Western blot

分析结果,尽管在分子量处(凝胶顶部)有较强的非特异性的免疫反应带出现,但与非转基因对照(泳道 G)相比,转基因植株(泳道 A、B、C、D、E)在天然 GNA(泳道 H)蛋白相同的位置都有一个特异的免疫反应带,这些结果表明转基因植株可表达分子量与 GNA 相当而且可与 GNA 抗血清起特异免疫反应的蛋白质。

Medberry 等^[11]比较了 CaMV 35S 启动子和 CoYMV 启动子介导 GUS 基因在转基因烟草叶片中的强度,认为这两个启动子的强度相似。另外,已有证据表明含双增强子的 35S 启动子的强度是 CaMV 35S 启动子的 10 倍左右^[12]。所以,在转基因烟草中含双增强子的 35S 启动子比 CoYMV 启动子的强度似乎应该高 10 倍,但从我们的实验结果看,并未达到这个水平。根据对 Western blot 产生的免疫反应带及标准 GNA 产生的免疫反应带进行扫描后计算的各类转基因植株中 GNA 的表达量见表 1 所示。在 Western blot 阳性的 6 株 pBGna34 和 4 株 pBCGna34 的转基因植株中,其外源基因的植物表达框架相同,仅启动子不同,前者为双增强子的 35S 启动子,后者为 CoYMV 启动子,它们的外源蛋白表达量均占总蛋白的 0.08%~0.15%,这似乎说明这两种启动子介导 GNA 在烟草中的表达强度相近。这一结果与 Medberry 报道的有所不同,其原因有待进一步研究。

GNA34 和 GNA12 在转基因烟草中的表达量也存在差异。在双增强子的 35S 启动子或 CoYMV 启动子的控制下,以 GNA34 转化的 13 株植株中,10 株较好地表达了外源蛋白(表 1)。从 Western blot 显示的分子量来看(图 4),转基因植株产生的 GNA 与天然

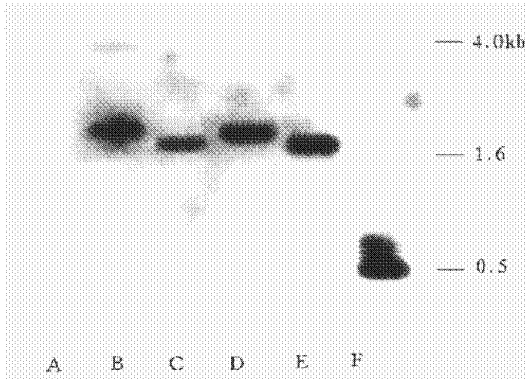


图 3 转基因烟草的 Southern 分析

Fig.3 Southern blot analysis of transgenic tobacco plants

Genomic DNA were digested with BamHI and southern blotting and hybridization were done as described in material and method.

Lane A. nontransformed control ;B, C, D and E. pBGna34 and pBCGna34 transformed plants # 8 , # 24 and # 32 , # 34 respectively.

F. Plasmid pGna34 digested with BamHI + XhoI

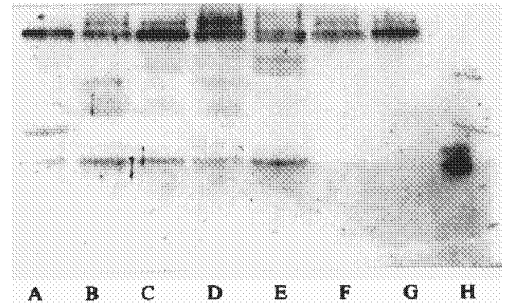


图 4 转基因烟草的 Western 分析

Fig.4 Western blot analysis of transgenic tobacco plants

A and B. pBGna34 transformed plants # 8 , 24 ;C, D and E. pBCGna34 transformed plants # 32 , 33 , 34 ;F. pBCGna12 transformed plant # 36 ;G. nontransformed control plant. Ten μ g total soluble protein/lane was loaded. H. GNA control(40ng)

成熟 GNA 的分子量一致 表明前体蛋白的 N 端信号肽及 C 端延伸部分已被切除 ,所以外源蛋白在烟草体内已得到正确加工。

GNA12 转化的植株中 ,仅有 1 株植株能检测到少量外源蛋白表达(图 4 ,泳道 F) ,表达量约占总蛋白的 0.02% (见表 1) 。这表明 GNA 基因在转基因烟草中的稳定表达很可能需要其前导序列及 3' 末端序列的存在 ,这是一个值得探索的基因表达调控问题。

表 1 GNA 在转基因烟草植株中的表达量

Table 1 Expression level of GNA in transgenic tobacco plants

Gene construct	No. of plants	No. of plants with positive react.	Percentage of GNA in total proteins
pBCGna34	4	4	0.08~0.15
pBGna34	9	6	0.09~0.14
pBCGna12	8	1	~0.02
pBGna12	8	0	ND

ND not detected

2.5 转基因烟草对蚜虫生长的抑制作用

在转基因植株的蚜虫试验中 ,我们观察到虽然新生蚜虫被接种到中层叶片上 ,但经过一段时间后 ,蚜虫逐渐向上层叶片迁移 ,最后几乎都集中到最上面三层叶片上。因此为了更精确地反映蚜口密度与 GNA 表达量的关系 ,我们在进行 Western blot 分析时 ,选择的是上层叶片。

pBCGna34、pBGna34、pBGna12 和 pBCGna12 转基因植株的抗蚜试验结果(图 5)表明 pBGna34 和 pBCGna34 的植株对蚜口密度有明显的抑制作用 ,能抑制蚜口密度约

45%~60% ,有几株具有强烈的抗蚜活性 ,最高的能抑制蚜口密度达 90% 以上。pBGna12 和 pBCGna12 的植株对蚜口生长的抑制程度较弱 ,约 12%~20%。GNA 表达水平较高的植株的抗蚜效果优于表达水平低或没有表达的转基因植株 ,说明 GNA 的表达量与其对蚜虫的抗性呈正相关。pBGna12 和 pBCGna12 的植株抑制蚜口密度较低的原因 ,可能是它们的蛋白表达水平太低。

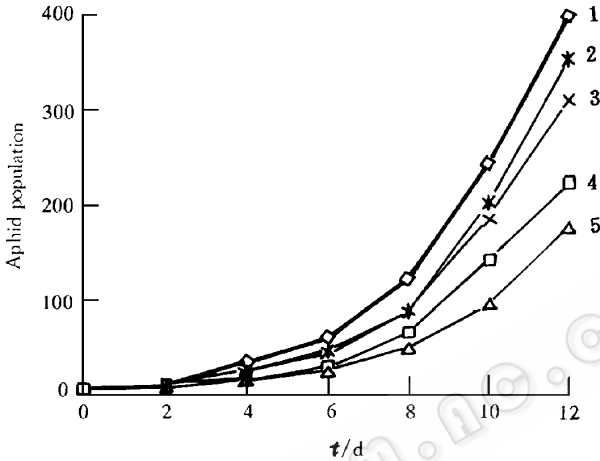


图 5 转基因烟草对蚜口密度增长的抑制作用

Fig. 5 Inhibition effect of transgenic tobacco plants on the population development of *M. persicae*

The population data were the average from two separate experiments.

Eight eight six ,four and five plants were used for pBGna12 ,pBCGna12 , pBGna34 ,pBCGna34 and nontransgenic plants respectively.

Ordinate :aphid population ;Abscissa :time (days P. I.) P. I. :post inoculation

1. Control ; 2. pBGna12 ; 3. pBCGna12 ; 4. pBGna34 ; 5. pBCGna34.

由图 5 可知 ,pBCGna34 比 pBGna34 的转基因植株能更好地抑制蚜口密度 ,前者为 60% ,后者为 45%。蚜虫是刺吸式昆虫 ,主要吸食植物韧皮部汁液 ,因此在蚜虫主要取食部位(即韧皮部)表达 GNA 能更好地抑制蚜虫生长。含双倍增增强子的 CaMV 35S 启动子和 CoYMV 启动子介导 GNA34 基因在烟草中表达的强度相似 ,但由于 CoYMV 启动子介导外源基因在烟草韧皮部表达 ,GNA 在韧皮部的表达量会更高。利用 CoYMV 启动子驱动 GNA34 基因获得的转基因烟草 ,能更好地抑制蚜口密度。

我们正在对这些转基因植株进行子代遗传分析及纯合系的选择 ,以进一步确定其抗蚜特性及稳定性。

参 考 文 献

- 1 裘维蕃. 植物病毒学(修订版). 北京:农业出版社,1982
- 2 Peumans W J ,Van Damme E J S. *Plant Physiol.* 1995 ,**109** :347~352
- 3 Gatehouse A M R ,Powell K S ,Peumans W J *et al.* . Insecticidal properties of plant lectins :their potential in plant protection. In Puzstai A J *et al.* (eds) *Biomedical Perspectives ,Lectins* :Taylor and Francis ,1995 :35~37
- 4 Puzstai A ,Ewen S W B ,Grant G *et al.* . *Digestion* 46 ,1990 ,**2** :308~316
- 5 Hilder V A ,Power K S ,Gatehouse A M R *et al.* . *Transgenic Res.* 1995 ,**4** :18~25
- 6 周岩,田颖川,陶惠中等. *生物工程学报* ,1996 ,**12** (4) :495~498
- 7 李太元,田颖川,秦晓峰等. *中国科学* ,1994 ,**24** (3) :276~282
- 8 田颖川,秦晓峰,徐丙寅等. *生物工程学报* ,1991 ,**7** (1) :1~10
- 9 Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Lab. Press ,1989
- 10 贾盘兴,蔡金科等. *微生物遗传学实验技术* ,北京:科学出版社,1992
- 11 Medberry S L ,Olszewski N E. *Plant J* ,1993 ,**3** :619~626
- 12 Kay R ,Chan A ,Daly M *et al.* . *Science* ,1987 ,**236** :1299~1302

Inhibition Effect of Transgenic Tobacco Plants Expressing Snowdrop Lectin on the Population Development of *Myzus Persicae*

Zhou Yan Tian Yingchuan Wu Biao Mang Keqiang

(*Institute of Microbiology ,Plant Biotechnology Laboratory ,*

The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract The cDNAs of snowdrop lectin mature protein and its precursor protein , GNA12 and GNA34 , were inserted downstream of 35S promoter with double enhancer and “ Ω ” fragment of TMV-RNA cDNA in the binary vector pBin438 ,or the phloem-specific CoYMV promoter in the vector pBcop1 , respectively ,resulting in the construction of four plant expression vectors pBGna12 , pBGna34 , or pBCGna12 and pBCGna34. Leave stripes of *Nicotiana tabacum* var. K326 were transformed with *A. tumefaciens* LBA4404 harboring the above expression vectors respectively. PCR and Southern blot analysis showed that foreign GNA genes were inserted into the genome of transformed tobacco plants. Western blot analysis indicated that GNA could be expressed efficiently up to 0.08% ~0.15% of total soluble proteins in transgenic tobacco plants with pBGna34 or pBCGna34 ,while in those with pBGna12 and pBCGna12 GNA was hardly detected by immunoassay. The results from insect bioassay with peach aphid (*Mizus persicae*) showed that the transgenic plants of pBGna34 and pBCGna34 were aphid-resistant evidenced by a 45% ~60% reduction in insect population density , even over 90% for some individual transgenic lines. In addition ,it was evident that 35S promoter with double enhancer and CoYMV promoter had similar abilities to direct GNA gene to express in transgenic tobacco plants ,but because CoYMV promoter drives foreign gene in a phloem-specific expression manner ,the transgenic plants of pBCGna34 showed higher aphid resistance.

Key words Snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin ,GNA)gene ,transgenic tobacco plant , *M. persicae*