

文章编号 :1003-8701(2008)06-0035-03

转基因抗虫玉米 Bt 毒蛋白的时空表达分析

姜志磊 ,刘德璞 ,李晓辉 ,孔祥梅 ,李葱葱 ,李飞武 ,孙传波 ,袁 英 *

(吉林省农业科学院生物技术研究中心 ,长春 130033)

摘要 :对 2 个转 Bt 基因玉米抗虫系株系进行 Bt 毒蛋白表达量的分析测定。结果显示 ,转基因株系中的毒蛋白可以在其后代稳定的遗传和表达 ,毒蛋白的表达为组成性表达 ,在玉米的各个发育时期和植株的各个部位均有表达 ,但其表达的量有显著差异 ,毒蛋白表达量随着植株的生长而减少 ,比较植株的各个器官 ,叶片毒蛋白含量最高 ,茎次之 ,根、种子和花丝中的毒蛋白含量较少。

关键词 :玉米 ;Bt ;转基因

中图分类号 :S513

文献标识码 :A

Studies on the Temporal and Spatial Expressions of Bt Toxin Protein of Bt Transgenic Maize

JIANG Zhi-lei, LIU De-pu, LI Xiao-hui, KONG Xiang-mei,

LI Cong-cong, LI Fei-wu, SUN Chuan-bo, YUAN Ying

(*Biotechnology Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China*)

Abstract: The content of Bt (*Bacillus thuringiensis* Berliner) toxin protein of two Bt transgenic maize was tested. The results showed that Bt toxin protein was detected in all the test organs and phase of the transgenic maize, but its contents varied significantly among different organs in different stages. The expression of Bt toxin protein in Bt transgenic maize decreased with advance of plant development. Among different organs, the highest Bt toxin protein content in the leaves, less in stem, and the least in root, seed and faliment.

Key words : Maize; Bt; Transgenic

目前在玉米抗螟育种中常用的外源基因是 Bt 杀虫蛋白基因。国内外已成功地运用 PEG 介导法、农杆菌法、基因枪轰击法、子房注射法等多种转化方法 ,将 Bt 杀虫蛋白基因导入玉米的基因组中 ,成功获得了 Bt 玉米。表达 Cry1Ab 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米对食叶和蛀茎的一二代欧洲玉米螟和亚洲玉米螟都有较高的抗性^[1]。国产 Bt 玉米于 1997~2000 年在河南、山东、黑龙江、吉林和辽宁等省进行环境释放试验。袁英^[2]采用基因枪

法将由 CaMV 35S 启动子驱动的苏云金杆菌(简称 Bt) 的杀虫毒蛋白基因 GFM CryIA 导入东北春玉米自交系铁 7922 的幼胚中 ,对转基因株系通过田间接玉米螟虫卵 ,根据不同生长时期的危害指数 ,筛选出抗玉米螟自交系。但是转 Bt 基因作物杀虫蛋白的表达存在着时空差异 ,不同生育期 ,不同部位 ,杀虫效果不同。转 Bt 基因玉米的抗虫性的强弱与植物体内的杀虫蛋白含量直接相关 ,亦即与 Bt 基因在植物体内的表达水平直接相关 ,因此准确地定量出植物器官、组织中 Bt 毒蛋白的含量 ,对于指导抗虫玉米生产具有特别重要的意义。

ELISA 检测法是一种利用免疫学原理检测抗原或抗体的技术 ,在生物医学等领域已得到了广泛应用 ,ELISA 方法检测外源基因表达蛋白的灵敏度高于 0.1%。本试验利用 ELISA 方法对袁英

收稿日期 2008-08-15

基金项目 :本研究由国家转基因中试及产业化基地专项 (JY03-17-1)资助

作者简介 :姜志磊(1981-) 男 硕士 主要从事玉米转基因育种研究。

通讯作者 :袁 英 ,女 ,硕士 ,副研究员 ,E-mail: yuanying2003

@sohu.com。

等于2000年用基因枪法转GFM CryIA基因获得的2个转Bt基因东北春玉米抗虫系在生长发育4个时期的5个部位Bt蛋白含量进行实时检测,从蛋白水平上阐明Bt转基因玉米表达的时空变化规律及其与抗虫性动态变化,以期对转Bt玉米的应用及虫害防治管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2个转Bt基因玉米抗虫系由吉林省农业科学院生物技术中心培育,与非转基因材料铁7922种植于吉林省农业科学院转基因试验基地。ELISA试剂盒购自美国Agdia公司。

1.2 方法

在转基因和非转基因玉米生长至5片叶、10片叶、15片叶、抽丝、开花、乳熟末等各生育期,选取生长一致的植株,按株系取样,每次取3株,分叶片、茎、根、花丝、种子等,取样量约0.5g。液氮速冻,-86℃低温冰柜保存。

在样品中加入PBST(0.14 mol/L NaCl、0.008 mol/L 磷酸盐、0.002 6 mol/L KCl、0.7%(V/V)吐温,pH 7.4)提取缓冲液5 mL,匀浆搅拌、离心,取上清液。按ELISA试剂盒说明进行试验操作,

Multiskan MK3酶标仪测定其OD 450 nm值。

2 结果与分析

对Bt玉米和对照各生育期的根、茎、叶、花丝、种子中Bt毒蛋白含量进行了测定。将Bt蛋白提取液经过50倍和100倍稀释后,再经ELISA检测用肉眼就可以清楚地从酶标板上看到结果(图1):转Bt基因抗虫玉米颜色反应呈深桔黄色,但深浅不一致,说明Bt玉米各生育期都含有一定量的Bt毒蛋白,但各生育期和各器官Bt毒蛋白含量不一样,而与其相对应的各时期、各器官非抗虫玉米对照显色很淡,与空白对照孔的颜色一致,说明非转基因玉米均检测不到Bt毒素蛋白的存在。



图1 毒蛋白的显色反应

利用酶标仪测定数据对株系345(表1)和株

表1 株系345的毒蛋白测定结果

毒蛋白鲜重($\mu\text{g/g}$)	5叶期				10叶期				15叶期		抽丝散粉期	
叶片	23.14	19.98	22.02	12.20	14.66	16.26	12.13	15.36	10.38	11.24	12.72	10.96
茎	6.36	5.73	7.62	5.62	4.39	5.37	2.58	2.60	2.72	2.35	1.36	2.46
根	5.21	4.48	3.71	2.86	3.09	3.28	2.03	1.37	2.15	1.39	1.89	1.38
种子										1.28	1.31	1.38
花丝										1.66	1.34	1.37

表2 株系356的毒蛋白表达量

毒蛋白鲜重($\mu\text{g/g}$)	5叶期				10叶期				15叶期		抽丝散粉期	
叶片	19.11	19.73	20.97	16.71	14.99	12.93	13.12	13.56	11.29	8.74	9.36	6.13
茎	6.46	8.15	6.48	5.75	4.48	2.02	2.60	2.60	2.72	2.24	1.61	2.19
根	2.58	3.06	3.28	2.33	2.61	1.77	1.48	1.14	1.98	0.87	0.39	1.09
种子										1.05	1.03	1.01
花丝										0.55	0.37	0.37

系356(表2)的毒蛋白占鲜重含量统计分析表明,株系345的毒蛋白含量明显高于株系356;植株在不同时期的蛋白表达量有极显著差异,蛋白表达量随着植株的生长而减少;各器官的毒蛋白表达也有极显著的差异,叶片最高,茎次之,根、种子和花丝中的毒蛋白含量较少。株系345叶片在5叶期时达到平均每克鲜重含21.71 μg 毒蛋白的高含量,而株系356根在抽丝散粉期每克鲜重只含0.8 μg 毒蛋白。

3 讨论

本试验得到转Bt基因玉米毒蛋白表达量随着玉米植株的生长而减少的结果,与王建武对美国和中国4种Bt玉米品种的研究,随生育期的延长Bt蛋白的表达量降低相一致^[3]。陈松^[4]、孙伟^[5]和张小四^[6]分别在2000年和2005年对转Bt基因抗虫棉(美国33B)的研究表明,随着棉花生长发育进程的推进,Bt基因在叶片中的表达强度逐渐减弱。

本试验得出转Bt基因玉米各器官的表达有极显著的差异,叶片>茎>根,种子和花丝中的毒蛋白含量比较少。在一些其他作物研究中也有相似的结论,如:王保民得出转基因棉花不同器官中的

毒蛋白含量存在着明显差异,叶片中的毒蛋白含量远远高于蕾、花、铃^[7];陈松和孙伟得出转Bt基因棉花在苗期全展功能叶中Bt毒蛋白含量最高,根、茎和叶柄中含量较低^[4-5];张小四^[6]得出棉叶和花瓣杀虫蛋白含量最高,铃和蕾次之;朱路青在对转Bt基因大豆植株中毒蛋白的表达研究中得出根中的毒蛋白含量最高,茎其次,叶中毒蛋白含量最低^[8]。

由于 Bt基因在不同器官和同一器官不同发育阶段毒蛋白含量不同,即Bt基因表达强度不同,致使植株不同发育阶段、不同器官的抗虫性存在很大差异。玉米生育后期毒蛋白表达明显减少,造成玉米抗虫性下降。此外我们在转Bt基因玉米成熟期的茎秆中发现大量的玉米螟(未发表)。因此,在生产上对转Bt基因玉米后期的玉米螟防治不容忽视。此外加强转基因抗虫玉米生育后期毒蛋白表达和各器官的平衡表达,是转基因抗虫玉米面

临的重要问题。

参考文献:

[1] 李 霞,何康来,王振营.用转基因技术进行玉米抗螟育种的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(15):3616-3618.
 [2] 袁 英,李晓辉,孔祥梅,等. Bt 基因转化玉米培育抗玉米螟自交系[J].分子植物育种,2007,5(4):572-576.
 [3] 王建武,冯远娇,骆世明. Bt 玉米抗虫蛋白表达的时空动态及其土壤降解研究[J].中国农业科学,2003,36(11):1279-1286.
 [4] 陈 松,吴敬音,周宝良,等.转 Bt 基因棉 Bt 毒蛋白表达量的时空变化[J].棉花学报,2000,12(4):189-193.
 [5] 孙 伟,曹玉洪.转 Bt 基因抗虫棉 Bt 毒蛋白表达量的时空变化[J].安徽农业科学,2005,33(2):202-203.
 [6] 张小四,李松岗,许崇任.转 Bt 棉不同生长期及不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定[J].北京大学学报(自然科学版),2000,36(4):478-484.
 [7] 王保民,李召虎,李 斌.转 Bt 抗虫棉各器官毒蛋白的含量及表达[J].农业生物技术学报,2002(3):215-219.
 [8] 朱路青,曹越平.转 Bt 基因大豆植株中毒蛋白的表达 [J].上海交通大学学报(农业科学版),2005(9):234-238.



(上接第 20 页)

果穗长筒型,穗长21 cm,14行,穗轴红色,单穗粒重253.7 g,结实性好,粒深轴细。子粒黄色,马齿,百粒重44.9 g。

经农业部谷物及制品质量监督检验测试中心(哈尔滨)检测,子粒含粗蛋白10.95%、粗脂肪4.03%、粗淀粉71.82%、赖氨酸0.29%,容重714 g/L。

3.3 抗逆性

2003~2004年,经吉林省农科院植保所、吉林农业大学人工接种鉴定:高抗茎腐病、抗丝黑穗病、黑粉病、灰斑病、大斑病,中抗弯孢菌叶斑病、玉米螟。

4 适宜种植区及栽培技术要点

4.1 适应区域

适宜在东北春玉米区吉单 180、郑单 958 适

应区域种植。

4.2 播种期及密度

北方春玉米区 4 月中下旬至 5 月初播种,清种密度公顷 5.0~5.5 万株,一般产量 11 000~12 000 kg/hm²。

4.3 施肥水平

一般施 N、P、K 复合肥 200 kg/hm² 作种肥,大喇叭口期施尿素 300~400 kg/hm²,有条件的地区加施优质农肥 30 000 kg/hm² 作底肥,可获得更高产量。

4.4 制种技术

父母本同期播种,行比 1:5。母本公顷保苗 6 万株。原种繁殖,选择土质较好的安全地块,公顷保苗 6 万株。