

文章编号:1003-8701(2014)05-0026-04

利用农杆菌介导的共转化法获得含 双 *Bt* 基因转基因水稻

金永梅,马 瑞,于志晶,林秀峰*

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所,长春 130033)

摘 要:利用农杆菌介导的共转化法,将分别携带不同 *Bt* 杀虫基因 *Cry1C**和 *Cry2A**的两个植物表达载体同时导入吉林省主栽超级粳稻品种吉粳 88 中,获得 598 株草丁膦(Basta)抗性独立转化植株。以 *Cry1C**和 *Cry2A**特异性引物对独立转化植株进行双引物 PCR 扩增,结果得到 35 株 *Cry1C**和 *Cry2A**基因双阳性植株,双基因共转化率为 6.28%。以目的基因 *Cry1C**和 *Cry2A**为探针进行 Southern blot 分析,获得 3 个双基因单拷贝株系。利用 RT-PCR 检测 *Bt* 基因在这 3 个株系中的 mRNA 表达情况,结果表明两个 *Bt* 基因在转录水平上同时得到了有效表达。

关键词:农杆菌介导的共转化;*Bt* 基因;水稻

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:A

Development of Transgenic Rice Plants Harboring Two *Bt* Genes by Agrobacterium-Mediated Co-Transformation

JIN Yong-mei, MA Rui, YU Zhi-jing, LIN Xiu-feng*

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Two *Bacillus thuringiensis Cry1C** and *Cry2A** genes (*Bt*) on individual plasmids were simultaneously introduced into Japonica rice variety Jijing 88 by Agrobacterium-mediated co-transformation. Five hundred and ninety eight independent basta-resistance transgenic plants were obtained by 30 mg/L basta-screening. PCR verification revealed that 35 were co-transgenic plants harboring the two *Bt* genes, and the co-transformation frequency was 6.28%. Three of two-*Bt* gene single copy insertion lines were identified among 35 co-transgenic lines by Southern blot analysis. RT-PCR analysis demonstrated that the two *Bt* transgenes were simultaneously expressed in these 3 lines at the transcription level.

Key words: Agrobacterium-mediated co-transformation; *Bt* gene; rice

水稻是世界重要的粮食作物,为全球一半的人口提供粮食。但是每年因虫害的发生,水稻的产量和品质受到严重影响。近十多年来,为解决水稻虫害主要利用 *Bt* 杀虫基因来培育抗虫转基因水稻并取得了显著成效。然而,转单个杀虫基因的水稻存在抗虫谱窄、靶标昆虫易产生抗性等问题。

协同转化无交互抗性的多个杀虫基因是培育抗谱更广、昆虫产生抗性几率低的转基因水稻的有效途径^[1]。多基因转化是获得多抗性作物的主要基因工程技术手段。目前使用的多基因转化方法中最为快捷和简单易行的方法是共转化法,它是将多个外源基因同时转化到同一植物中的一步法转化方法^[2]。

为实现多个目的基因在植物中的表达,在载体构建上可以采取两条途径:一种是将多个目的基因分别用表达结构隔开或者直接融合在一起构建多基因表达载体;另一种是将一个目的基因构建成一个表达载体,然后进行多个表达载体的共转化。采用第一条途径会受到载体容量的限制及插入的 DNA 大小对载体转化基因能力的影响,而

收稿日期:2014-03-10

基金项目:吉林省科技发展计划项目(201205068);农业部转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08001-001);吉林省留学回国人员择优资助项目(RL201322)

作者简介:金永梅(1974-),女,博士,副研究员,主要从事水稻转基因育种研究。

通讯作者:林秀峰,女,硕士,研究员,E-mail:linxiufeng8581@163.com

采用第二条途径不必顾虑载体容量及目的基因数目。截至目前,许多实验室采用第二条途径把多个目的基因分别构建到不同载体上并进行共转化获得了较好的效果。刘永巍等^[3]利用农杆菌介导的共转化法将分别位于不同质粒上的抗潮霉素基因和反义蜡质基因转化到水稻粳稻品种中,获得了多基因共转化植株;汪秀志等^[4]利用农杆菌介导的双质粒/双菌株共转化法将2个外源基因 *gus* 和 *npt II* 成功地导入粳稻中,实现了多基因共转化;郭嘉等^[5]将磷高效利用基因 *phy* 和钾高效利用基因 *AIHAK1* 分别构建到两个不同的载体中,成功获得了转多基因玉米。

本研究利用农杆菌介导的共转化法,将分别含有 *Cry1C** 和 *Cry2A** 的两个表达载体同时导入吉林省主栽粳稻品种吉粳 88,获得 Basta 抗性植株,并对其进行分子检测以获得转双 *Bt* 基因抗虫水稻。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

本实验中所转化的水稻品种为吉林省主栽粳稻品种吉粳 88,由吉林省农业科学院水稻研究所提供。

1.1.2 植物表达载体和农杆菌菌株

人工合成的目的基因 *Cry1C** 和 *Cry2A** 分别插入在已改造过的 pCambia3300 植物表达载体上,构建成 $P_{rbcS}-Cry1C*$ ^[6] 和 $P_{ubi}-Cry2A*$ ^[7] 两个植物表达载体(图 1)。两个植物表达载体分别由 *RbcS* 和 *Ubi* 启动子驱动,筛选标记基因为 *Bar*(草丁膦抗性基因),均由华中农业大学林拥军教授惠赠。农杆菌菌株为 *EHA105*,由本实验室保藏。

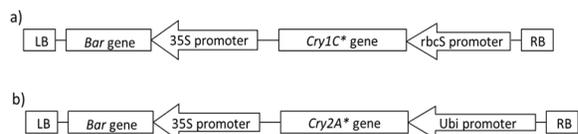


图 1 植物表达载体的 T-DNA 区

a) 植物表达载体 $P_{rbcS}-Cry1C*$; b) 植物表达载体 $P_{ubi}-Cry2A*$

1.2 实验方法

1.2.1 农杆菌介导的共转化

去掉颖壳的水稻种子经过消毒后诱导愈伤组织。分别携带 $P_{rbcS}-Cry1C*$ 和 $P_{ubi}-Cry2A*$ 植物表达载体的农杆菌 *EHA105* 菌液,以 1:1 浓度比混合后与愈伤组织共培养,3 d 后转入筛选培养基上继续培养;2~3 次 PPT 抗性筛选培养后,经过

预分化、分化、生根最终获得转化苗。愈伤组织的诱导、分化、生根与移栽方法参照转 *Cry1C** 基因抗虫水稻的研究^[8]。

1.2.2 转基因植株的 PCR 检测

提取转基因植株叶片基因组 DNA 并检测其质量,用 *Cry1C** 和 *Cry2A** 特异性引物进行双引物 PCR 检测。引物序列见表 1。

表 1 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列
<i>Cry1C*</i> -F	5'-TTAGTGTGGACGTAACCTCTACTG-3'
<i>Cry1C*</i> -R	5'-GAATGTTCTAGATGTGAGGTTCTCT-3'
<i>Cry2A*</i> -F	5'-GACTACTTCATCCGCAACATTAG-3'
<i>Cry2A*</i> -R	5'-CAGGTAGAGGTTGTAGGAGTTAC-3'
<i>OsActin1</i> -F	5'-TCCATCTTGGCATCTCTCAG-3'
<i>OsActin1</i> -R	5'-GTACCCTCATCAGGCATCTG-3'

PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,35 循环,最后延伸 7 min,PCR 产物大小分别为 384 bp 和 767 bp。

1.2.3 转基因植株的 Southern Blot

利用 CTAB 法提取水稻叶片基因组 DNA,各取 60 μg 基因组 DNA 分别用 *Dra I* 和 *Hind III* 限制性内切酶(Takara)完全酶切,酶切产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后转膜(Amersham),用地高辛(Roche)标记的 *Cry1C** 和 *Cry2A** 探针分别与之进行杂交,再用 X-光胶片化学发光自显影。

扩增探针引物序列为:*Cry1C**-F: 5'-TTC-TACTGGGGAGGACATCG-3', *Cry1C**-R: 5'-CGG-TATCTTGGGTGATTGG-3'; *Cry2A**-F: 5'-CGTGT-CAATGCTGACCTGAT-3', *Cry2A**-R: 5'-GATGCC-GGACAGGATGTAGT-3'。

1.2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测

用 MiniBEST Universal RNA 提取试剂盒(Takara)提取转基因植株嫩叶总 RNA,利用 Prime-Script one-step RT-PCR 反应试剂盒(Takara)进行 RT-PCR 检测。用 500 ng 总 RNA,以 *Cry1C** 和 *Cry2A** 特异性引物(序列同表 1)进行 RT-PCR 扩增。利用水稻 *OsActin 1* (*Os03g0718100*) 基因作内标(引物序列见表 1)。25 μL RT-PCR 反应体系,含有 12.5 μL 2 倍的 1 step Buffer,1 μL 10 μM 的引物,2 μL 250 ng/μL 的总 RNA,1 μL 的 1 step Enzyme Mix。反应条件为:50℃反转录

反应 30 min ,94℃ PCR 预变性 2 min ,94℃ 变性 30s ,57℃退火 30s ,72℃延伸 40s ,32 循环。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得

将 $P_{rbcS}-CryIC^*$ 和 $P_{ubi}-Cry2A^*$ 植物表达载体分别转化到农杆菌 *EHA105* ,把携带不同载体的两种农杆菌菌液以 1 : 1 浓度比混合之后共转化 3000 块愈伤组织 ,经过 30 mg/L Basta 筛选得到抗性愈伤组织 646 块 ,抗性愈伤率为 21.54%。抗性愈伤组织经过分化、生根、移栽成活 598 株独立转化植株。

2.2 转基因植株的 PCR 检测

提取 T_0 代独立转化植株基因组 DNA ,将两个 *Bt* 基因的特异性引物同时加入到一个 PCR 反应体系中进行双引物 PCR 检测 ,筛选转基因植株 ,剔除假阳性苗。 结果发现 557 株 PCR 阳性植株中 35 株为 $CryIC^*$ 和 $Cry2A^*$ 双基因共转化植株 ,双基因共转化率 (双阳性植株/总阳性植株) 为 6.28 % (图 2)。

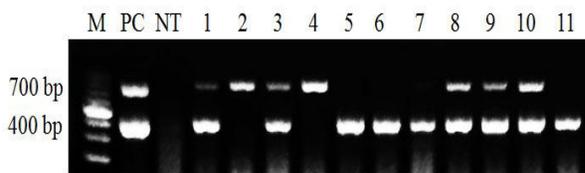


图 2 转基因植株的目的基因 PCR 检测

M ,Marker 100bp Ladder ;
PC ,pBar33- $CryIC^*$ 质粒和 pBar- $Cry2A^*$ 质粒混合物 ;
NT ,对照未转化植株为模板 ;
1 ~ 11 , T_0 代独立转化植株

2.3 双 *Bt* 基因共转化植株的 Southern 杂交

为了确证双 *Bt* 基因共转化株系基因组中目的基因的整合性和拷贝数 ,采用 Southern blot 方法进行分析。提取 T_1 代双 *Bt* 基因共转化株系的基因组 DNA 和对照品种基因组 DNA ,分别用 *Dra* I 和 *Hind* III 进行完全酶切。 $P_{rbcS}-CryIC^*$ 和 $P_{ubi}-Cry2A^*$ 载体的 T-DNA 区单侧分别包含 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切位点 ,而基因特异性探针区分别不包含该酶切位点^[7-8]。酶切产物经转膜之后 ,分别与 $CryIC^*$ 和 $Cry2A^*$ 基因特异性探针进行分子杂交。杂交结果表明 *Bt* 基因已经整合到水稻基因组中 ,插入拷贝数分布为 1 ~ 4 个 ,其中 3 个株系 (命名为 ac-2、ac-6、ac-8) 为双基因单拷贝共转化株系 (图 3)。

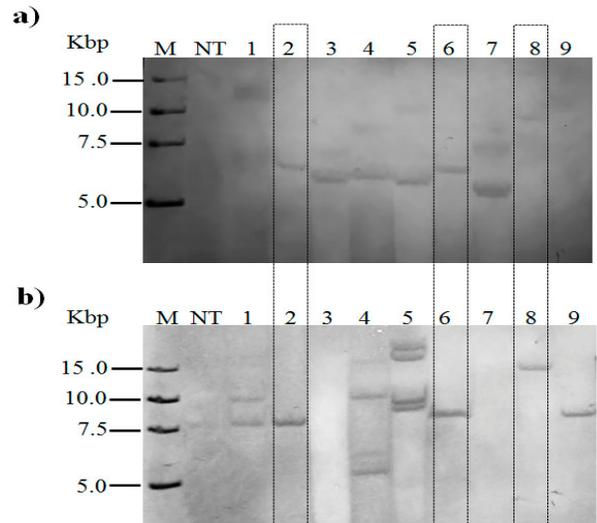


图 3 T_1 代双基因共转化株系两个 *Bt* 基因

Southern Blot 分析

- 双基因共转化株系基因组 DNA 用 *Dra* I 酶切后与用地高辛标记的 $CryIC^*$ 基因特异性探针杂交 ;
- 双基因共转化株系基因组 DNA 用 *Hind* III 酶切后与用地高辛标记的 $Cry2A^*$ 基因特异性探针杂交。 M ,DNA 分子量标准 ;NT ,非转基因对照 ;2 ~ 9 , T_0 代双基因共转化株系 (2 ,ac-2 ;6 ,ac-6 ;8 ,ac-8)

2.4 双 *Bt* 基因共转化株系中 *Bt* 基因 mRNA 表达量检测

提取双基因单拷贝共转化株系 ac-2、ac-6、ac-8 的嫩叶总 RNA ,利用 One step RT-PCR 方法对 $CryIC^*$ 和 $Cry2A^*$ 基因的 mRNA 表达量进行检测。结果表明 (图 4) 3 个双基因共转化株系的 mRNA 表达量都很高 ,而非转基因对照则没有表达。 $Cry2A^*$ 基因的 mRNA 表达量略高于 $CryIC^*$ 基因。

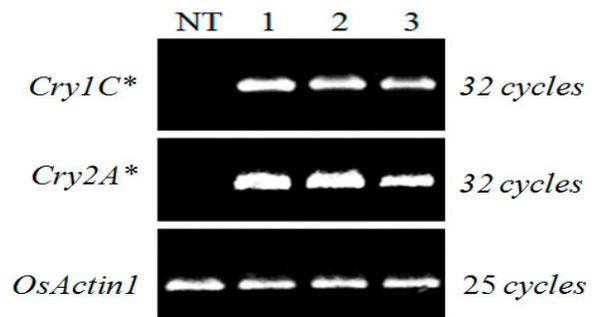


图 4 $CryIC^*$ 和 $Cry2A^*$ 基因的 mRNA 表达量检测

NT ,非转基因对照 ;1 ~ 3 , $CryIC^*$ 和 $Cry2A^*$ 双基因共转化株系 ac-2、ac-6、ac-8

3 结论与讨论

通过农杆菌介导的共转化法将分别含有不同

基因的两个或多个载体导入受体植物的研究已有很多报道^[3-5, 9]。但目前已有的报道大都只侧重于影响共转化效率的各种因素分析,而对农业生产上实际需要的有意目的基因进行多基因共转化研究的报道较少。本研究将两个 *Bt* 抗虫基因植物表达载体分别导入同一种农杆菌菌种 *EHA105* 中,以 1:1 浓度比把分别携带两个载体的农杆菌菌液混合之后侵染北方粳稻品种吉粳 88,获得了转双 *Bt* 基因粳稻。前人的研究结果表明^[3, 9],通过混合菌株法进行共转化时,选择同一菌种或是特性接近的不同菌种进行载体转化,并且携带两种不同载体的农杆菌菌液按 1:1 浓度比混合时会获得较高的共转化效率。本研究中两个 *Bt* 基因的共转化率达到了 6.28%,这与前人的研究结果相似^[9]。

在转基因植物中,外源基因的拷贝数明显影响插入基因的遗传稳定性和表达量。多拷贝转基因植物会导致后代基因分离复杂,因此在后代中筛选纯合系难度非常大。单一位点插入的拷贝数较多时,插入的重复序列会自发配对发生甲基化,导致基因沉默^[10]。因此,确定外源基因在基因组中的拷贝数,对于研究其外源基因的表达和功能十分重要^[11]。本研究通过 Southern 杂交,从 35 个双 *Bt* 基因共转化株系中筛选出 3 个双基因单拷贝插入株系(图 3)。为了保证后代的遗传稳定性,避免转基因沉默现象,本研究从 T_0 代筛选单拷贝插入株系并淘汰多拷贝插入株系。

本研究中联合使用的 *CryIC** 和 *Cry2A** 基因序列之间没有明显的相似性,并且它们所编码的 *Bt* 毒蛋白在昆虫体内能够分别识别不同受体^[12],不会因为昆虫一种受体的变异而失去对它们的控制作用,因此这两个基因可以联合使用。两个 *Bt* 基因分别由不同的启动子来驱动(*rbcS* 和 *Ubi* 启动子),可减少两个基因聚合后表达量下降或发生基因沉默的可能性。在本研究中获得的 3 个双基因共转化株系,两个 *Bt* 基因的 mRNA 表达量都很高(图 4),说明这两个 *Bt* 基因在转录水平上同时得到了有效表达,并未发生转基因沉默现象。

组成型启动子 *Ubi* 驱动下的 *Cry2A** 基因的 mRNA 表达量略高于组织特异性启动子 *rbcS* 驱动下的 *CryIC** 基因的 mRNA 表达量,这也许跟驱动它们的启动子类型有关。本研究利用两个无交互抗性的 *Bt* 基因 *CryIC** 和 *Cry2A** 进行共转化,通过 PCR、Southern 杂交、RT-PCR 等方法进行筛选和检测,得到 3 个转双基因单拷贝株系,为水稻抗虫育种提供了种质资源。

参考文献:

- [1] 唐 丽,谭炎宁,韩小霞,等. 抗虫转基因水稻研究进展及发展趋势[J]. 杂交水稻, 2011,26(1):1-6.
- [2] 尹明智,李 桐. 共转化法及其在转基因植物研究中的应用[J]. 作物研究, 2008, 22(5):305-309.
- [3] 刘永巍,田红刚,孟巧霞,等. 利用农杆菌介导的共转化法获得转基因水稻[J]. 黑龙江农业科学, 2008(3):5-7.
- [4] 汪秀志,张红宇,汪旭东,等. 农杆菌介导的水稻双基因共转化初步研究[J]. 核农学报, 2009, 23(1):28-32.
- [5] 郭 嘉,孙传波,陶 瑞,等. 基因枪共转化法获得玉米转基因植株的研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(1):44-47.
- [6] Ye R, Huang H, Yang Z, et al. Development of insect-resistant transgenic rice with *CryIC**-free endosperm[J]. Pest management Science, 2009, 65 (9):1015-1020.
- [7] Chen H, Tang W, Xu C, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests[J]. Theoretical Applied Genetics, 2005, 111 (7):1330-1337.
- [8] 于志晶,刘 丽,李淑芳,等. 转 *CryIC** 基因抗虫水稻的培育[J]. 分子植物育种, 2011,9(6):702-708.
- [9] 陆美芳,刘巧泉,于恒秀,等. 农杆菌介导的水稻双载体共转化法中部分影响因素的研究[J]. 生物技术通报, 2005 (5):55-62.
- [10] Taline E, Florence P, Hervé V. Arabidopsis RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication[J]. Journal of Current Biology, 2005, 25 (21):1919-1925.
- [11] 罗 滨,陈永康,王 莹. 植物外源基因拷贝数及插入位点的检测方法与技术[J]. 河南师范大学学报, 2012, 40(6):111-116.
- [12] Alcantara EP, Aguda RM, Curtiss A, et al. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borders[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2004, 55 (4):169-177.