

转抗虫基因三系优良保持系的获得

马炳田^{1,2,3} 王玲霞^{1,2} 李平^{1,2,*} 朱祯^{3,*} 周开达¹

(¹ 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; ² 四川省农业生物技术工程研究中心, 四川温江 611130; ³ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要 以质粒 pBUSCK-HPT 作抗虫基因供体, 优良籼型保持系 D62B 为受体, 采用基因枪转化法, 获得了转抗虫基因 *scK* 的植株。将转基因保持系与不育系 D62A 回交, 获得转抗虫基因不育系。分子证据表明, 外源基因能稳定转移到不育系中。蛋白活性测定显示, 转基因在不育系中得到表达。本文还讨论了转基因技术在水稻育种中的作用。*

关键词 水稻; 籼稻; 抗虫性; 转基因; 修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因

中图分类号: S511

Obtaining Transgenic Elite Indica Maintainer Line Containing Modified CpTI (*scK*)

MA Bing-Tian^{1,2}, WANG Ling-Xia^{1,2}, LI Ping^{1,2,*}, ZHU Zhen^{3,*}, ZHOU Kai-Da¹

(¹ Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan; ² Sichuan Agricultural Biotechnology Engineering Research Center, Wenjiang 611130, Sichuan; ³ Institute of Genetics & Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The transgenic D62B, an elite *indica* maintainer line, containing modified *CpTI* (*scK*), was obtained by bombardment. With the transgenic D62B as donor, D62A containing *scK* was developed. PCR and Southern blotting analyses indicated that *scK* gene could be delivered to CMS line stably. The field performance of transgenic plants was similar to the non-transgenic control, but the resistance to insects was increased. The use of genetic transformation in rice breeding was also discussed.

Key words *Oryza sativa* L.; *Indica*; Resistance to insects; Transgene; Modified *CpTI* (*scK*)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是最重要的粮食作物之一, 全世界有近半数的人口以稻米为主食。在我国, 水稻年播种面积在 3 000 万公顷以上, 其中杂交稻的播种面积占 50% 左右, 达 1 600 多万公顷, 部分省市如四川、江西杂交稻占 90% 以上^[1]。杂交稻与常规稻相比, 具有产量优势, 但易于受病虫害的攻击, 造成严重减产、米质变劣, 其中虫害尤为严重。常规采用化学防治虫害, 但防治效果不理想, 长期使用后害虫还产生抗药性, 造成环境污染和人畜危害。农业技术措施及生物防治也不能有效控制水稻虫害的发生。抗虫品种的应用是最为经济有效的办法。在杂交稻的选育过程中, 不育系 (保持系) 的抗性是最难解决的, 还受种质资源稀少和生殖隔离的限制。基因工程技术的出现和成熟, 为我们解决这个问题提供了一种全新的手段。1986 年 Uchimiya 等首先通

过基因工程技术获得了转基因水稻细胞组织^[2]、1989 年 Shimamoto 等获得可育的转基因粳稻^[3]、1990 年 Datta 等获得可育转基因籼稻植株^[4]以来, 水稻转基因已从实验室走向田间。

豇豆胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea Trypsin Inhibitor, *CpTI*) 基因是植物抗虫基因工程中运用最为广泛抗虫基因之一。早在 1993 年, 美国康奈尔大学就采用直接转化法将 *CpTI* 导入水稻并获得转基因植株, 经虫试发现转基因植株对水稻二化螟、三化螟具有一定的抗性^[5]。中国科学院遗传与发育生物学研究所遗传操作实验室通过 3 引物 PCR (TP-PCR) 对 *CpTI* 基因进行了修饰。修饰的 *CpTI* 基因 (signal-*CpTI*-KEDL, *scK*) 表达产物在内质网定位信号的引导而富集于内质网及其衍生的蛋白体上, 转基因水稻表现出抗虫能力的提高)。我们通过转基因技术将 *scK*

*基金项目: 国家“863”计划、国家转基因植物研究与产业化专项 (J2000-B-011)、四川省“九五”生物技术攻关等项目资助。

作者简介: 马炳田 (1971 -), 男, 博士, 研究方向: 植物基因工程。*通讯作者 (Corresponding author): 李平、朱祯。

Received (收稿日期): 2002-07-22, Accepted (接受日期): 2002-10-15.

基因转入三系杂交稻保持系,并实现向不育系转移,测定其田间表现,试图为杂交稻抗虫育种提供一条有效的途径。

1. 材料与方法

1.1 供试材料

转基因受体水稻材料为优良粳型三系保持系 D62B,由四川农业大学水稻研究所选育。

转基因供体质粒为 pBUSCK-HPT:由中国科学院遗传与发育生物学研究所遗传操作实验室构建,主要结构为 Ubi-Signal-CpTF KDEL-Tnos。含豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*),并在 5'端添加信号肽 SKTI,3'端连接内质网滞留信号 KDEL 进行修饰(*scK*),赋予转基因水稻抗鳞翅目害虫的能力。*Ubi* 为玉米泛素启动子,筛选标记基因为 *hpt*,编码潮霉素磷酸转移酶(hygroscopic phosphotransferase)。

1.2 培养基

基本培养基为 NMB:N₆ 大量元素、MS 微量元素、B₅ 有机成分、附加水解酪蛋白 250 mg/L、脯氨酸 500 mg/L、蔗糖 30 g/L、凝固剂 gelrite 2.3 g/L,pH 5.8。诱导和继代培养基为 NMB + 2,4-D (2 mg/L)。高渗培养基为继代培养基附加 0.6 mol/L 甘露醇。筛选培养基为继代培养基附加 20 或 30 mg/L 潮霉素 B。分化培养基为 NMB + 6-BA (3 mg/L) + NAA (0.3 mg/L) 附加 20 mg/L 潮霉素 B。生根培养基为 1/2 MS 固体培养基。

1.3 水稻胚性愈伤组织的诱导及培养

水稻胚性愈伤组织的诱导和继代按文献^[6]进行。将开花后 12~15 d 未成熟种子或成熟种子去壳后,先用 75% 的乙醇表面消毒,再用 30% 的次氯酸钠灭菌 30 min,无菌水清洗后无菌滤纸吸干表面水,放于诱导培养基中诱导胚性愈伤组织。愈伤组织培养成功后,可在继代培养基上扩大繁殖,增加胚性愈伤组织块的数量,用作基因枪转化的受体。

1.4 转化方法

采用 PDS-1000/He 基因枪法按文献^[7]进行。将 D62B 胚性愈伤组织块在高渗培养基中培养 4 h 后进行枪击。枪击后继续在高渗培养基上过夜后,将受体愈伤组织块移到筛选培养基中筛选转化子。经过 2~3 次的筛选后,将抗性愈伤组织块转移到分化培养基中进行绿苗再生。当分化的绿苗长到 3 cm 以上时,移到生根培养基中进行生根壮苗培养。然后进行开放炼苗培养并移栽到大田中。田间管理同

常规。

1.5 转基因的纯合及向不育系的转移

采用含潮霉素 B (40 mg/L) 的 1/2 MS 培养基进行转化植株的潮霉素 B 抗性种子筛选,并推测转基因的纯合与否。将潮霉素 B 抗性植株种植到田间,选取转基因 D62B 作父本,不育系 D62A 作母本回交。

1.6 分子检测

基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[8]:将 2.5 g 水稻叶片用液氮研磨成细粉,加入 10 mL 65℃ 预热的 CTAB 提取液,摇匀保温 (65℃) 30 min。加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1,0.2% -巯基乙醇),充分混匀后 10 000 ×g 离心 10 min,上清液用预冷的异丙醇沉淀 DNA。将 DNA 吸出用 70% 乙醇洗 2 遍,再用无水乙醇洗 2 遍,超净台上吹干后溶于超纯水中,电泳或分光光度法定量,用作 PCR 或 Southern blotting 模板。

多聚酶链反应 (PCR):采用 25 μL 体系。*scK* 引物为:P1:5'-AAA ATG AAG AGC ACC ATC TTC-3'; P2:5'-TCT AGA GTT CAT CTT TCT CAT C-3',扩增的目的片段为 415 bp。*hpt* 引物为:P3:5'-TAC ACA GCC ATC GGT CCA GA-3'; P4:5'-TAG GAG GCC GTG GAT ATG TC-3',扩增的目的片段为 832 bp。反应条件:94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,循环开始前 94℃ 预变性 4 min,循环结束后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 0.8% 的琼脂糖凝胶 90 V 电压电泳分离后,紫外光下观察并拍照。

Southern blotting 分析:20 μg 基因组 DNA 充分酶切,用 0.8% 的琼脂糖凝胶 40 V 电泳过夜后,碱法转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜 (Amersham) 上^[8],80℃ 烘干。预杂交、杂交均用 7% SDS 磷酸缓冲液于 65℃ 反应。探针标记依随机引物标记试剂盒进行 (Promega),在 37℃ 反应 1 h,热变性后加入到杂交液内。杂交膜用 0.1 ×SSC + 0.1% SDS 洗去背景后,压 X-光片 (Fuji) 放射自显影后观察结果。

1.7 转基因植株的豇豆胰蛋白酶抑制剂活性测定

取 0.3 g 水稻新鲜叶片,液氮研磨后加入 600 μL 提取液 (50 mmol/L Tris-HCl,含 DDT 1.0 mmol/L,pH 9.5) 充分混匀,以 11 000 r/min 4℃ 离心 10 min,将上清液作为待测样品。将 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 10 mmol/L Ca²⁺,pH 8.0) 200 μL、蒸馏水 720 μL、牛胰蛋白酶 (0.1 μg/μL) 50 μL、样品 30 μL 充分混匀

后,置于 27 °C 温箱保温 60 min。保温后上述反应管各取 100 μ L 分别与 1 mL BAEE (N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯)底物反应液混匀,置于 27 °C 保温 15 min。保温完成后,立即于 $\lambda = 254$ nm 处测定各反应管吸光值 (OD_{254})。以大豆来源的胰蛋白酶抑制剂 (TRYPsin INHIBITOR from SOYBEAN TYPE 1-S) 为标准品作标准曲线。

1.8 转抗虫基因保持系农艺性状的测定

将获得的转基因后代植株种植在试验田中,按 17 cm \times 26 cm 规格栽插。管理同常规,但不施杀虫剂。按常规进行农艺性状考察。

1.9 转基因植株的室内抗虫性测定

于分蘖盛期取 10 g 转基因水稻叶片液氮研磨,加入 20 mL PBS (pH 9.5) 蛋白提取液,4 °C 浸提 4 h, 10 000 r/min 离心 10 min,获得上清液。将虫试饲料用上清液充分浸泡后凉干表面水,放于平皿中。然后接种 20 ~ 30 头一龄未玉米螟幼虫,27 °C 培养 (饲料过剩)。12 d 后统计死亡率和虫体重。

2 结果与分析

2.1 转基因 D62B 的获得及外源基因的纯合

通过基因枪法,将供体质粒 pBUSCK-HPT (含抗虫基因 *scK*) 转入 D62B 的胚性愈伤组织,然后用含抗生素潮霉素 B 的筛选培养基进行转化子的筛选。供体质粒中含有筛选标记基因 *hpt*, 编码潮霉素磷酸转移酶。当 *hpt* 基因整合到水稻基因组中并正确表达时,能够将磷酸共价结合到潮霉素 B 上,使培养基中的潮霉素 B 失活;而非转化细胞中不含 *hpt* 基因,不能合成潮霉素磷酸转移酶,当潮霉素 B 进入非转化细胞后,就与 30 S 核糖体结合而阻止细胞蛋白的合成,使非转化细胞因缺乏蛋白而变褐死亡。因此,转化子能够在筛选培养基上正常生长,而非转化细胞逐渐变褐死亡。

我们共转化 617 块胚性愈伤组织,经 2 ~ 3 次

筛选,获得 26 个克隆的潮霉素抗性愈伤组织,抗性愈伤获得率为 4.21%。将抗性愈伤进行分化、再生等处理后,获得 11 个无性系的绿苗植株 (T_0),占受体愈伤的 1.78%。将 T_0 植株栽培到田间,自交结实,选取结实率高的单株,待种子成熟后收获,去壳、表面灭菌后放到含 40 mg/L 潮霉素 B 的 1/2 MS 培养基上进行抗性筛选。所测试 17 个单株中,有 15 个单株种子的潮霉素抗性符合 3:1,说明外源基因是以单位点方式整合到受体基因组中,并按孟德尔单基因显性方式在后代中遗传;另 2 个不符合 3:1。将符合 3:1 植株的转基因二代 (T_1) 种子按同样方法进行潮霉素 B 抗性筛选,发现有 3 个株系的外源基因纯合 (测试单株种子全部抗潮霉素 B),并且农艺性状与未转基因的对照一致,即获得了纯合株系。将转基因 D62B 植株作父本,不育系 D62A 作母本回交,得到转基因不育系。不育系的育性没有发生变化。因此,转基因 D62B 的保持力没有因外源基因的插入而发生变化。

2.2 转基因的表达情况

通过测定豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 活性,发现 *scK* 基因在 D62B 或经杂交转移到不育系中仍然能正常表达并具有生物活性。转基因 D62B 的 23 个 T_2 代单株平均 CpTI 含量为占可溶性总蛋白的 3.31%,而对照为 1.99%;转育的 D62A 中,平均 CpTI 含量占可溶性总蛋白的 3.46%,而对照为 1.94% (见表 1、图 1)。很显然,转基因在受体或转育植株中均得到表达。

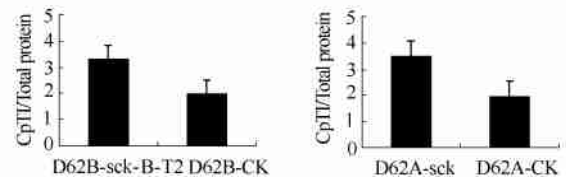


图 1 转 *scK* 基因水稻的 CpTI 含量

Fig. 1 Expression of *scK* in transgenic rice lines

表 1 转基因植株的 CpTI 含量测定

Table 1 Expression of *scK* in transgenic rice lines

材料名称 Line	检测单株数 Number of plants tested	总蛋白含量 Total protein (mg/mL)	剩余活力 Residual activity of CpTI (%)	CpTI 含量 Amount of CpTI (mg/mL)	CpTI/总蛋白 CpTI/Total protein (%)
D62B- <i>scK</i> -B- T_2	23	37.99	24.05	1.25	3.31 \pm 0.88
D62B-CK	12	30.27	61.07	0.63	1.99 \pm 0.86
D62A- <i>scK</i> -B	12	37.95	22.57	1.27	3.46 \pm 0.76
D62A-CK	12	35.39	59.73	0.65	1.94 \pm 0.96

2.3 转基因水稻的抗虫性

采用植物蛋白粗提物浸泡昆虫饲料的方法,我们测定了转基因水稻 T₂ 代植株在室内对玉米螟的抗性。转基因植株的蛋白粗提物浸泡的饲料饲喂玉米螟 12 d 后,3 个不同单株处理的平均每头虫重在 20 mg 左右;未转基因植株蛋白粗提物处理的饲料喂虫后的虫重达 30.21 mg,不用蛋白粗提物处理的饲料喂虫的虫重达 37.60 mg。转基因水稻与对照相比,对玉米螟有显著抗性,抑制了玉米螟的生长发育进程,但致死率没有明显提高(见表 2)。

2001 年四川农业大学海南育种站水稻田中螟虫为害严重。不施杀虫剂的情况下,未转基因的水稻发虫率为 100%,转基因植株也受到螟虫的严重侵犯。转 *scK* 基因 D62B、D62A 及对照感虫株率均为 100%,但感虫分蘖率却分别为 28.13%、27.97% 和 43.70%。很明显,这种表达量的 CpTI 仅影响害虫的发育进度,而不能杀死害虫,导致感虫株率与对照相当而感虫分蘖率下降的现象。这与上述室内结果一致。

2.4 转抗虫基因水稻的农艺性状

将转基因 T₂ 经筛选后栽插于苗床,然后移栽到

大田中,栽培管理同常规,但不施杀虫剂。从田间表型上看,转基因水稻植株长势良好,整齐一致,与对照相当。考种结果发现转基因水稻与相应对照在株高、单株平均分蘖数、平均穗长、结实率、千粒重等主要农艺性状无明显差异(见表 4)。这些结果表明外源基因的插入没有改变 B62B 的优良农艺性状。因此,可通过转基因技术定点改良优良杂交稻保持系的某些不良性状。

2.5 外源基因的分子检测

用 CTAB 法提取转基因植株及其回交的不育系基因组 DNA 作为模板,以 P1、P2 或 P3、P4 为引物进行 *scK* 或 *hpt* 基因的 PCR 反应。结果表明,从转基因 D62B 和相应的 D62A 植株中都能扩增到外源基因与阳性对照(质粒 DNA 作模板)一致的 415 bp 的 *scK* 和 832 bp 的 *hpt* 目的扩增特异带,而未转基因的阴性对照植株中却没有相应的片段(见图 2、图 3),说明转基因 D62B 及其回交的不育系中都含有外源基因。另外,外源基因是整合到 D62B 的核染色体上的,因为不育系中也扩增到了同样的片段,它只能从作为父本的转基因 D62B 的核染色体中才能得到。

表 2 转基因水稻的室内抗虫性测定结果

Table 2 Effect of the total protein extracts from transgenic lines on the growth of corn borer larvae

材料 Line	田间编号 Code in field	0 d 虫头数 Number of larvae tested	12 d 虫头数 Number of larvae after 12 days	死亡率 Percentage of dead larvae (%)	12 d 虫总重 Weight of Total larvae after 12days (mg)	12d 虫重 Average weight of one larva after 12 days (mg)
D62B- <i>scK</i> -B-T ₂	103-5	20.0	18.0	10.00	407.33	22.63 ±0.13Cc
	105-5	20.0	17.0	15.00	359.67	21.13 ±2.01Cc
	111-3	20.0	19.0	5.00	344.00	18.13 ±1.73Dd
CK2	D62B-CK	20.0	18.3	8.33	554.67	30.21 ±1.11Bb
CK2		20.0	18.3	8.33	689.00	37.60 ±0.43Aa

注:表中数据为 3 次重复的平均值;0 d 虫重为 0.04 mg/头。12 d 虫重(mg/头)栏中字母不同代表差异显著(大写: $P=0.01$;小写: $P=0.05$)。CK:相应未转基因水稻蛋白提取液处理饲料;CK2:饲料不经水稻蛋白提取液处理。

Notes: Data in table were the averages of three replicates; Average weight of one larva in 0 days was 0.04 mg. Within the colour of average weight of one larva after 12 days, means followed by the same (capital/small) letter indicated no significant difference at 0.01/0.05 level. CK: the forage treated with the total protein extracts from the nontransgenic rice plants; CK2: the forage untreated with the total protein extracts from rice plants.

表 3 转基因水稻的田间抗虫性

Table 3 The resistance of transgenic rice plants to rice borers in field

材料 Line	调查株数(株) Number of plants tested	分蘖数(个) Number of total tillers	感虫株率 Plants affected (%)	感虫分蘖率 Damaged tillers/plant (%)
D62B- <i>scK</i> -B-T ₁	154	1984	100.00	28.13
D62A- <i>scK</i>	46	556	100.00	27.97
D62B-CK	20	254	100.00	43.70

表4 转基因植株的农艺性状
Table 4 The agronomic traits of transgenic rice lines

材料 Line	调查株数 Number of plants tested	株高 Plant height (cm)	分蘖数 Tillers /plant	穗长 Panicle length (cm)	穗着粒密度 (粒/cm) Grains/cm	结实率 Seed setting /panicle (%)	千粒重 1000-grain weight (g)
D62B- <i>skc</i> -T ₂	3	84.3 ±0.6	15.3 ±1.5	18.7 ±1.1	9.2 ±0.5	77.80 ±7.53	24.5 ±0.5
	9	78.4 ±3.6	16.2 ±2.4	18.6 ±1.8	9.1 ±0.6	80.11 ±2.29	24.3 ±0.4
	7	78.6 ±3.8	16.3 ±2.1	18.4 ±0.6	8.5 ±0.3	82.96 ±3.85	24.4 ±0.5
	6	78.6 ±3.8	14.2 ±1.7	17.8 ±1.6	8.3 ±0.4	83.22 ±4.76	23.8 ±0.3
	5	82.8 ±1.9	15.8 ±2.4	17.4 ±0.7	8.3 ±0.3	79.60 ±2.82	24.3 ±0.6
	5	80.2 ±2.9	15.8 ±2.2	17.5 ±1.2	8.0 ±0.5	82.47 ±4.49	24.2 ±0.4
	5	77.4 ±4.9	14.6 ±1.5	17.7 ±1.1	8.2 ±0.6	83.24 ±2.57	24.5 ±0.3
	8	79.1 ±3.4	16.0 ±2.4	17.9 ±1.4	8.0 ±0.4	83.65 ±4.80	24.4 ±0.4
D62B-CK	14	72.3 ±3.4	16.7 ±2.9	16.8 ±1.5	7.9 ±0.3	84.04 ±4.43	24.3 ±0.4
		82.3 ±5.1	15.4 ±2.1	18.3 ±0.8	8.5 ±0.3	83.70 ±2.13	24.5 ±0.2

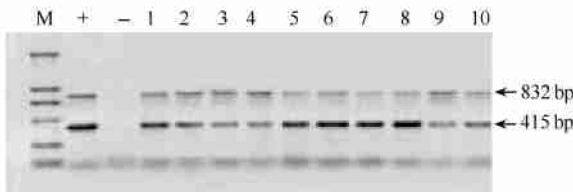


图2 PCR检测 D62B-*skc*-*hpt*

Fig. 2 PCR analysis of D62B-*skc*-*hpt* plants

skc 和 *hpt* PCR 产物等量混匀电泳; M: DL2000 marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); + : 阳性对照; - : 阴性对照; 832 bp : *hpt*; 415 bp : *skc*; 1—10; T₂ 植株。

Electrophoresis of mixture of equivalent respective *skc*-product and *hpt*-product of PCR. M: DL2000 marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp). + : positive control; - : negative control; 832 bp : *hpt*; 415 bp : *skc*. 1—10; T₂ plants.

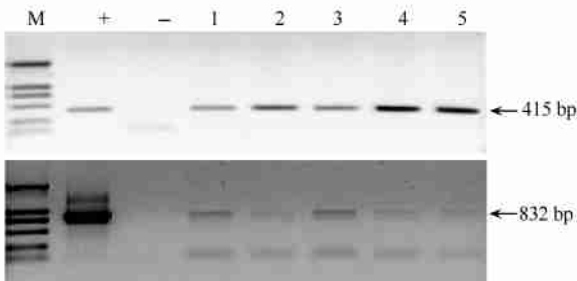


图3 PCR检测 D62A-*skc*-*hpt*

Fig. 3 PCR analysis of D62A-*skc*-*hpt* plants

M: DL2000 marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); + : 阳性对照; - : 阴性对照; 832 bp : *hpt*; 415 bp : *skc*; 1—5 : D62A/D62B-*skc*-*hpt* (T₂ 纯合)。

M: DL2000 marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); + : positive control; - : negative control; 832 bp : *hpt*; 415 bp : *skc*; 1—5 : D62A/D62B-*skc*-*hpt*.

用转基因 D62B 两个单株基因组 DNA 作模板, 采取 4 种方法处理模板 (1: 不用限制性内切酶处理基因组 DNA; 2: 用在供体质粒中没有酶切位点的限制性内切酶 *Pst* 处理基因组 DNA; 3: 用在供体质粒中有一个酶切位点的限制性内切酶 *Sma* 处理基因组 DNA; 4: 用在目的基因两端都有酶切位点的限制性内切酶 *Kpn* 处理基因组 DNA), 然后进行电泳、转膜、用酶切供体质粒回收的 *skc* 片段为探针作 Southern blotting 分析。结果表明, 在两个转基因 D62B 植株都得到一条杂交带, 而非转基因对照没有出现杂交任何信号 (见图 4), 说明外源基因在受体植株核染色体上呈单拷贝单位点整合。

3 讨论

由于复种指数较高, 杂交稻易受害虫、特别是螟虫的危害, 严重制约着它的高产稳产。改良保持系的抗虫性是改善杂交稻抗虫性极其重要的一环。利用转基因技术, 可将来源于其他植物或物种, 如微生物、动物等的抗虫基因转入杂交稻亲本, 打破生殖隔离, 从而提高杂交稻的抗虫性, 稳定水稻的生产。目前已有多种抗虫基因转入杂交稻亲本, 并获得抗虫性改良的株系, 有的还进入了田间试验^[9]。我们将修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因 (*skc*) 采用基因枪转化法转入杂交稻优良保持系 D62B 中, 通过回交传递到不育系, 从而提高所配杂交稻的抗虫性。分子证据表明外源基因在受体植株中的遗传是稳定的; 蛋白活性检测结果证明外源基因在保持系和

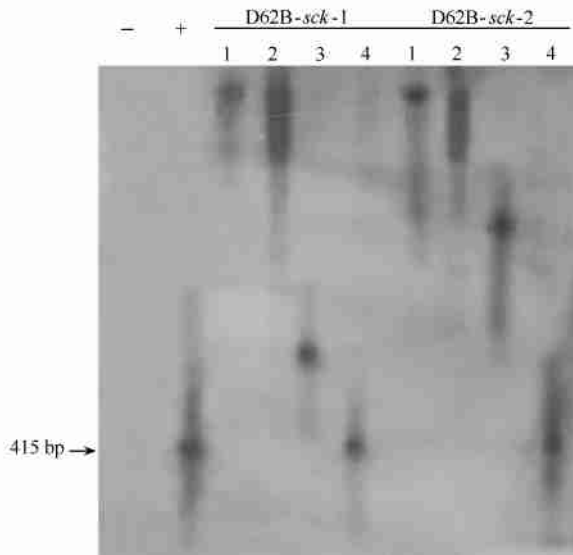


图4 转基因植株 Southern blotting 分析

Fig.4 Southern blotting analysis of transgenic plants

+ : *sck* 片段, 415 bp; - : 阴性对照; 1: 基因组 DNA;
2: DNA/ *Pst* ; 3: DNA/ *Sma* ; 4: DNA/ *Kpn* 。
+ : *sck* fragment, 415 bp; - : negative control; 1: genomic DNA;
2: DNA/ *Pst* ; 3: DNA/ *Sma* ; 4: DNA/ *Kpn* 。

不育系中都能正确表达;田间农艺性状测定表明外源基因的转入没有改变受体的优良性状;室内田间试验发现抗虫性得到提高。这与前人报道的结果相似^[10]。

豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)是目前植物抗虫基因工程中使用较为广泛的外源基因。*CpTI*属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,在水稻等粮食作物抗虫基因工程中占有突出的地位。这是因为蛋白酶抑制剂作用于昆虫消化酶的活性中心,昆虫不易产生耐受性,抗虫性稳定;抗虫谱广,对几个目的害虫都有抗性;*CpTI*来源于植物,转基因产品更易被公众接受,而且业已证明对人畜无害^[11]。但是,*CpTI*也存在抗虫能力不足的缺点。为此,中国科学院遗传与发育生物学研究所遗传操作实验室采用3引物PCR方法,对*CpTI*基因进行了修饰。修饰的*CpTI(sck)*表达产物富集在细胞的内质网及其衍生的蛋白体上,处于一种代谢相对不活跃的环境中,提高了抗虫蛋白的稳定性和含量,使转*sck*植物表现出抗虫能力的加强。我们获得的转*sck*杂交稻抗虫能力虽得到了提高,但要达到生产要求还有一定的差距,这可能是因为我们获得的转基因群体过小,未能筛选到外

源基因高效表达的株系。外源基因在受体细胞中的表达水平由许多因素决定,如外源基因整合的拷贝数(本试验为单拷贝)、插入位点、甲基化、基因重排等。为此,我们加大了转基因群体,进一步的高抗虫株系筛选正在进行中。

References

- [1] Zeng Q-C(曾千春), Zhou K-D(周开达), Zhu Z(朱祯), Luo Q(罗琼). Current status in the use of hybrid rice heterosis in China. *China J Rice Sci* (中国水稻科学), 2000, **14**(4): 243—246
- [2] Uchimiya H, Fushimi T, Hashimoto H, Harada H, Syono K, Sugawara Y. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1986, **204**:204—207
- [3] Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature*, 1989, **338**: 274—276
- [4] Datta S K, Peterhans A, Datta K, Potrykus I. Genetically engineered fertile *indica* rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology*, 1990, **8**:736—740
- [5] Wang Z-H(王忠华), Shu Q-Y(舒庆尧), Xia Y-W(夏英武). Advances in the study on the improvement of rice through gene engineering. *Biotechnol Information* (生物技术通报), 1999, (2): 5—8
- [6] An H-B(安韩冰), Zhu Z(朱祯), Li H-F(李慧芬), Wu Q(吴茜), Zhou Z-L(周兆澜), Xu H-L(徐鸿林), Xu J-W(徐军望), An L-J(安利佳), Li X-H(李向辉). Obtaining fertile transgenic plants of resistant-insect rice (*Oryza sativa* L.) via particle bombardment. *High Technol Letters* (高技术通讯), 2001, **11**(2): 12—16
- [7] Kikkert J R. The Biolistic PDS-1000/He device. *Tissue and Organ Culture*, 1993, **33**:221—226
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Tyagi A K, Mohanty A, Bajaj S, Chaudhury A, Maheshwari S C. Transgenic rice: a valuable monocot system for crop improvement and gene research. *Critical Rev in Biotechnol*, 1999, **19**(1): 41—79
- [10] Tu J, Zhang G A, Datta K, Xu C, He Y, Zhang Q, Khush G S, Datta K S. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expression *Bacillus thuringiensis* -endotoxin. *Nature Biotechnol*, 2000, **18**:1101—1104
- [11] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, **330**: 160—163