

苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因克隆 及油菜叶绿体遗传转化研究

侯丙凯 陈正华

(中国科学院遗传研究所,北京 100101)

关键词 苏云金芽孢杆菌;油菜;杀虫晶体蛋白基因;叶绿体转化

中图分类号 Q785

文献标识码 A

文章编号 0253-977X(2001)01-0039-02

Cloning of Insecticidal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis* and Chloroplast Genetic Transformation in *Brassica napus* L.

HOU Bing-kai, CHEN Zheng-hua

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

向细胞核导入外源基因的核转化技术是植物基因工程的主要方法。然而,外源基因表达效率低,表达不稳定,基因易失活和因随机插入而造成的位置效应等是该方法不足之处。而且,由于外源基因可随花粉扩散,细胞核转化体的生物安全性问题已在全球范围内引起世人的关注和担忧。将外源基因导入叶绿体基因组有望克服细胞核转化中存在的某些弊端。油菜作为世界上重要的油料作物,其叶绿体遗传转化研究还未见报道。本研究从苏云金芽孢杆菌克隆得到野生型杀虫晶体蛋白基因,构建了用于油菜叶绿体定点转化的植物表达载体,并用基因枪法将杀虫蛋白基因导入油菜,在国际上首次实现了抗虫基因对油菜叶绿体基因组的定点整合,并获得了具有抗虫性的油菜叶绿体工程植株。

1 苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的克隆以及在大肠杆菌中的表达

根据国外发表的杀虫蛋白基因序列设计特异引物,应用PCR扩增方法,从对鳞翅目有强毒性的苏云金芽孢杆菌菌株kurstaki HD-1-02的大质粒上扩增得到3.5kb的杀虫晶体蛋白基因,克隆进pGEM-T质粒,得到了克隆载体pTb19。序列分析表明,该基因由3531bp的核苷酸组成,可编码1176个氨基酸组成的蛋白质。与几个国外已报道的Bt *cry1Aa*相比较,核苷酸序列高度同源,但又有所差别。构建了该基因的

限制性内切酶图谱,图谱显示出该基因内部存在一个732bp的EcoRI核心片段(EcoRI-F片段)。

构建了该基因的原核表达载体pBBt4并转移进大肠杆菌,SDS-PAGE分析表明该基因在大肠杆菌中表达了分子量为135kDa的蛋白质。生物学实验表明,此表达产物对棉铃虫和小菜蛾等鳞翅目幼虫具有强毒杀活性。

克隆的Bt杀虫晶体蛋白基因已登录GenBank,登录号为AF154676。该基因目前已被国际苏云金芽孢杆菌内毒素命名委员会正式命名和注册为*cry1Aa10*。这是我国第一个在国际上被正式命名和注册的*cry1Aa*基因,将具有我国自主知识产权,为我国开展抗虫基因工程提供了有力的基因资源。该基因的克隆及其应用已申请专利,申请号为:99119236.2。

2 油菜叶绿体定点转化载体的构建

参照烟草叶绿体*rps7*基因两端的序列设计特异引物,从油菜叶绿体基因组扩增获得了相应的DNA片段。序列分析表明,扩增到的DNA片段全长1037bp,其中包含468bp的*rps7*基因全序列以及*ndhB*基因的5'端部分序列。在*rps7*基因的-25至-22位发现一个TGAT盒,其位置和序列与烟草*psbA* mRNA的顺式作用元件RBS2完全相同。油菜*rps7*基因的核苷酸序列与烟草和水稻的对应基因同源性很

收稿日期 2000-11-24;修回日期 2000-12-15

基金项目 国家自然科学基金(No. 39970624)资助

作者简介 侯丙凯(1964-),男,山东德州人,博士,副教授,专业方向 植物分子遗传学。现工作单位 山东大学生命科学院,济南 250100,

E-mail: bkhou@sina.com; Tel: 0531-6962077。

高,分别为 97%和 90%。根据核苷酸序列推导,油菜 *rps7* 基因可编码 155 个氨基酸组成的蛋白质,与烟草对应基因编码的氨基酸数目相同,但与水稻相比缺少一个赖氨酸。构建了 *rps7* 基因的限制性内切酶图谱,其中 5 种常见内切酶的位点已经验证。目前,克隆到的 *rps7* 基因序列已登录 GenBank,登录号为 AF124376。参照烟草 *ndhB* 基因设计引物,从油菜叶绿体基因组扩增获得了第二个 DNA 片段,该片段全长 2467bp,包含着油菜叶绿体的 *ndhB* 基因全序列及侧翼序列。序列分析表明,油菜的 *ndhB* 基因内部包含着一个内含子,该内含子具有叶绿体第 III 类内含子保守的边界序列。在 *ndhB* 基因上游发现有两个类 SD 序列,推测与该基因的翻译起始有关。油菜 *ndhB* 基因的外显子 I、外显子 II 以及内含子与烟草和水稻的相应核苷酸序列具有很高的同源性。推导的氨基酸序列在三种植物之间的同源性也很高,但总的来看,油菜与烟草之间明显高于油菜与水稻之间的同源性,反映出单、双子叶植物之间亲缘进化关系的不同。构建了油菜 *ndhB* 基因的限制性内切酶图谱,其中 8 种常见内切酶的位点已经过酶切证明。目前,克隆到的 *ndhB* 基因序列已登录 GenBank,登录号为 AF126026。

以上克隆的 *rps7* 和 *ndhB* 基因作为同源重组片段,以烟草叶绿体基因的启动子(P_{trn})和终止子($psbA3'$)控制外源基因表达,构建了包含 *aadA* 筛选标记基因(产生壮观霉素抗性)和 *cry1Aa10* 基因(产生杀虫性)的油菜叶绿体定点转化载体 pNRAB。

将叶绿体转化载体转移进大肠杆菌,诱导外源基因表达,对表达产物进行了杀虫试验。结果表明,所构建的载体能在大肠杆菌中进行表达,其表达产物对初孵、一龄、二龄棉

铃虫均具有较强的杀虫活力。这些结果说明所构建的载体具有可使用性,它为进一步开展油菜的叶绿体遗传转化和获得高抗虫油菜奠定了基础。

3 油菜的叶绿体遗传转化与叶绿体转基因植株的获得

用基因枪轰击法,将 *cry1Aa10* 杀虫蛋白基因导入了油菜子叶柄。经再生培养和壮观霉素筛选,获得了 36 株抗壮观霉素的再生植株。用特异引物进行 PCR 扩增,发现其中有 4 株能扩增得到 1.1kb 和 6.4kb 的两条带,表明这 4 株为叶绿体转化植株,但叶绿体基因组尚未达到同质化。分别用 *cry1Aa10* 基因探针和 *rps7* 基因探针进行 PCR 反应产物进行 Southern 杂交,前者只在 6.4kb 处有阳性杂交带,后者则在 1.1kb 处和 6.4kb 处均出现杂交信号,证明了外源基因已定点插入在叶绿体的 *rps7* 和 *ndhB* 基因之间。用 *cry1Aa10* 基因探针与叶绿体基因组进行 Southern 杂交,也证明了杀虫蛋白基因已整合进叶绿体基因组。

对叶绿体转化植株和对照植株进行虫试,结果表明,8 天后转基因植株上小菜蛾幼虫的死亡率为 33%~47%,对照植株上死亡率为 0,转基因植株上未死亡的幼虫生长缓慢,体重减轻,而对照植株上幼虫生长健壮。说明所获得的叶绿体转基因植株具有杀虫和抑制幼虫生长的作用。不完全的杀虫效果可能与叶绿体基因组的非同质化有关。

油菜叶绿体转化植株的获得在国内外为首次报道。该研究不仅鉴定了一个新的、可用于定点整合的位点,而且对开展油菜及其它农作物的叶绿体基因工程均具有普遍参考意义。