

转 *Bt* 和抗菌肽融合基因油菜植株的获得与鉴定研究

杨 凯, 韩 伟, 温 莹, 刘丹丹, 薛春蕾, 逯晓萍

(内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 油菜极易遭受各种病虫害的侵害, 其中白斑病和黑斑病都属于真菌引起的病害。以优良品种花油 6 号为材料, 以抗菌肽和 *Bt* 融合基因为目标基因, 以草甘膦为筛选标记基因, 采用农杆菌介导的方法转入油菜获得转基因植株。经 PCR 和 Southern 检测表明外源基因已整合到油菜的基因组 DNA 中; 经 RT-PCR 检测表明目的基因已在油菜转基因植株的转录水平表达; 目的基因 (*BtAMP*) 的遗传转化率为 2.33%。研究结果可为油菜的抗性遗传改良提供新种质。

关键词: 油菜; 抗菌肽; *Bt* 融合基因; 转化

中图分类号: S565.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0049-06

Attainment and Identification of Transgene Rape(*Brassica napus*) with *Bt* and Antibiotic Peptide Syncretic Gene

YANG Kai, HAN Wei, WEN Ying, LIU Dan-dan, XUE Chun-lei, LU Xiao-ping

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract Rape is one of important oil crop that were widely grown in China. The diseases occurs to rape easily, especially for white spot and black spot that caused by fungi. The variety of Huayou No. 6 was used for transferring *Bt* and Antibiotic peptide syncretic gene (*BtAMP*), glyphosate as selective marker by the method of agrobacterium-mediated transformation. The test of PCR and southern blot proved the exogenous DNA was integrated on the genome of rape. RT-PCR test showed the expression of transcriptional level of the introduced gene in rape plant. The transformation rate of *BtAMP* was 2.33%. The research provided new germ for rape breeding of disease resistance.

Key words Rape; Antibiotic peptide; *Bt* Syncretic gene; Transformation

油菜是重要的油料作物, 对油菜抗逆性和品质的改良是育种家们长期奋斗的目标。自 1985 年 Ooms 等利用农杆菌介导法获得第一株转基因油菜以来, 油菜转基因的研究便取得了快速而稳定的发展与进步^[1-5]。据报道, 1998 年全球转基因油菜种植面积为 $240 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 占全球油菜种植面积的 9%, 1999 年增至 $280 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 占全球油菜总面积的 11%, 2003 年, 转基因油菜在全球种植面积为 $352 \times 10^4 \text{ hm}^2$ ^[6]。现阶段, 加拿大是世界上种植面积大、转基因油菜的国家, 美国商品化种植少量转基因油菜, 我国则还没有转基因油菜的商业化种植, 但油菜的转基因研究相当活跃, 已有几十例成功报道, 有的已进入环境释放和生产性试验阶段^[7-9]。在作物减产、降质的主要原因中, 真菌病害占据着重要的

地位, 其造成的减产占总病害的 80% 以上。由于抗菌肽对多种植物病原菌都含有杀菌活性, 而且抗菌肽仅作用于原核细胞和发生病变的真核细菌, 与抗生素通过阻断大分子的生物合成的作用机制完全不同, 病原菌不易对其产生耐药性。这一特点使得抗菌肽能够得以广泛应用于各种植物的基因工程研究中。所以将抗菌肽基因转入到植物体内并使其表达, 可在一定程度上提高农作物的抗病特性, 因此, 抗菌肽在农业上的应用, 主要是在基因工程中将其转化到各种农作物中, 培育出抗病的新品种。在转基因研究中, 首先采用模式植物马铃薯和烟草进行抗菌肽的转化, 并取得了成功。因此, 通过转基因技术得到带有抗菌肽基因的植物, 培育抗病菌的新品系和新品种, 已经成为当前国内外研究的热

收稿日期: 2010-12-10

基金项目: 教育部“春晖计划”项目 (Z2009-1-01065)

作者简介: 杨 凯 (1987-), 男, 内蒙古巴彦淖尔人, 硕士, 主要从事植物遗传育种研究。

通讯作者: 逯晓萍 (1960-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物遗传育种及生物技术研究。

点^[10-12]。另外,目前国内外纷纷加快了 Bt 杀虫蛋白基因的研究步伐,并利用转基因技术培育了大量的转 Bt 基因植物,现已有马铃薯、玉米、棉花等 3 种转 Bt 杀虫蛋白基因的作物在局部地区得到商业化的推广。

因此,本研究利用植物转基因技术,首次将抗菌肽基因、苏云金芽孢杆菌 Bt 基因和抗除草剂的 EPSPS 三种外源抗性基因转化至油菜中,从而获得三种有效抗性(既可以抗虫、抗病,同时也抗除草剂)的新材料,而且以抗除草剂基因作为筛选标记,所以不含抗生素标记基因,以期获得一种相对比较安全的、产量比普通油菜产量有显著提高的新种质资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料 本研究课题试验田种植的优良高代材料花油 6 号。

1.1.2 外植体 油菜子叶下胚轴。

1.1.3 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、真核表达载体 PCAMBA1300 中间载体 SPnE (含 EPSPS 基因)和植物表达载体质粒 pBI121 (含融合基因)均由亚盛集团北京博士后科研工作站实验室提供,草甘膦产自美国 Monsanto 公司。

1.1.4 试剂来源 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Klenow 补平酶等购于 TaKaRa 公司; RNase 购于 Sigma 公司; X-gal 和 IPTG 购于北京赛百盛基因技术有限公司; Taq 酶、核酸分子量标准和 DNA 回收试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;引物合成全部由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.1.5 培养基 大肠杆菌培养基简称 LB (10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl 定容至 1 L, pH 7.0, 固体 LB 培养基加 1.5% 琼脂粉)。

农杆菌培养基简称 YEP (10 g 胰蛋白胨, 10 g 酵母提取物, 5 g NaCl 定容至 1 L, pH 7.0 固体 YEP 培养基加 1.5% 琼脂粉)。

1.2 方法

1.2.1 构建植物表达载体 首先对 PCAMBA1300 进行改造,去除其潮霉素抗性标记基因。将提取的 PCAMBA1300 用 XhoI 酶切 (20 μ L 体系),电泳回收大片段 DNA,用 T4 连接酶进行连接 (10 μ L 体系),将连好的 PCAMBA1300 定名为 13P。然后进行含草甘膦抗性表达载体的构建。将 13P 质粒用 SacI 和 BamHI 双酶切,回收大片段;将中间载体 SPnE 也用 SacI 和 BamHI 双酶切,回收小片段;用 T4 连接酶进行连接 (10 μ L 体系)。最后,构建含草甘膦同时含有目的抗虫抗病基因的表达载体。将含草甘膦抗性的表达载体 13P 用 BamHI 和 HindIII 进行双酶切,电泳回收大片段,并对 BamHI 端进行补平;将植物表达载体质粒 pBI121 用 HindIII 和 DraI 双酶切,电泳回收小片段,并对 DraI 端进行补平;用 T4 连接酶对两种片段进行连接,获得含草甘膦抗性同时含目的抗虫抗病基因的表达载体 13P-EPSPS-BtAMP,对 13P-EPSPS-BtAMP 进行酶切和 PCR 检测。构建示意图见图 1~图 3。

1.2.2 转化方法 以油菜子叶下胚轴为受体材料,即以 5 日龄无菌油菜苗子叶柄作为外源基因的受体。挑取鉴定结果为阳性的农杆菌单菌落,接种于含抗生素的 YEP 培养液中,28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养 16 h,使农杆菌培养至对数期,用液体 MB 培养基将其稀释 10 倍。然后进行共培养:即将新切下的油菜子叶柄在菌液中侵染 5 min,用滤纸迅速吸干多余菌液,将子叶柄接种于 MB 分化培养基上,黑暗中共培养 2~3 h,用 200 mg/L 羧苄青霉素的 MB 液体培养基浸泡子叶柄,再用滤纸吸干余液,将子叶柄插入附加有 0.5 mg/L 草甘膦和 200 mg/L 羧苄青霉素



图 1 潮霉素抗性标记基因的切除

Fig 1 Excision of marker gene for hygromycin resistance

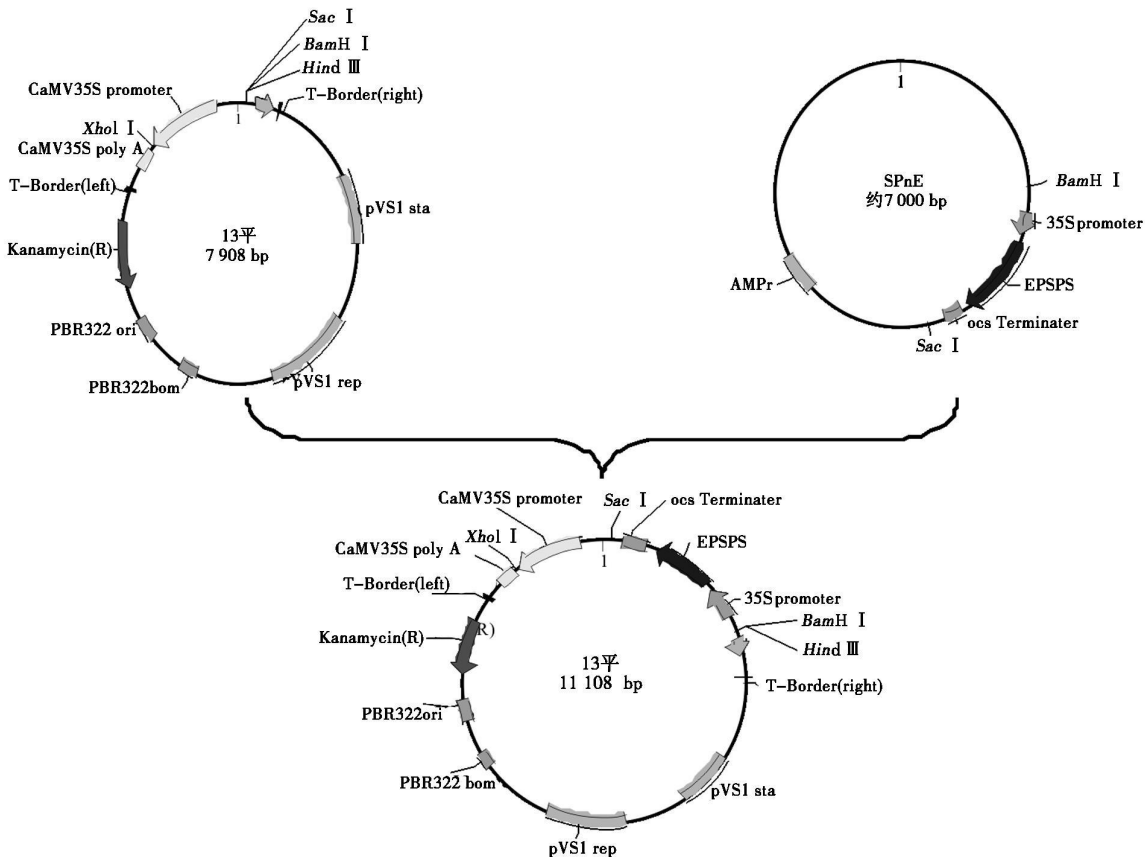


图 2 EPSPS转入 13P示意图
Fig 2 EPSPS transferring in to 13P

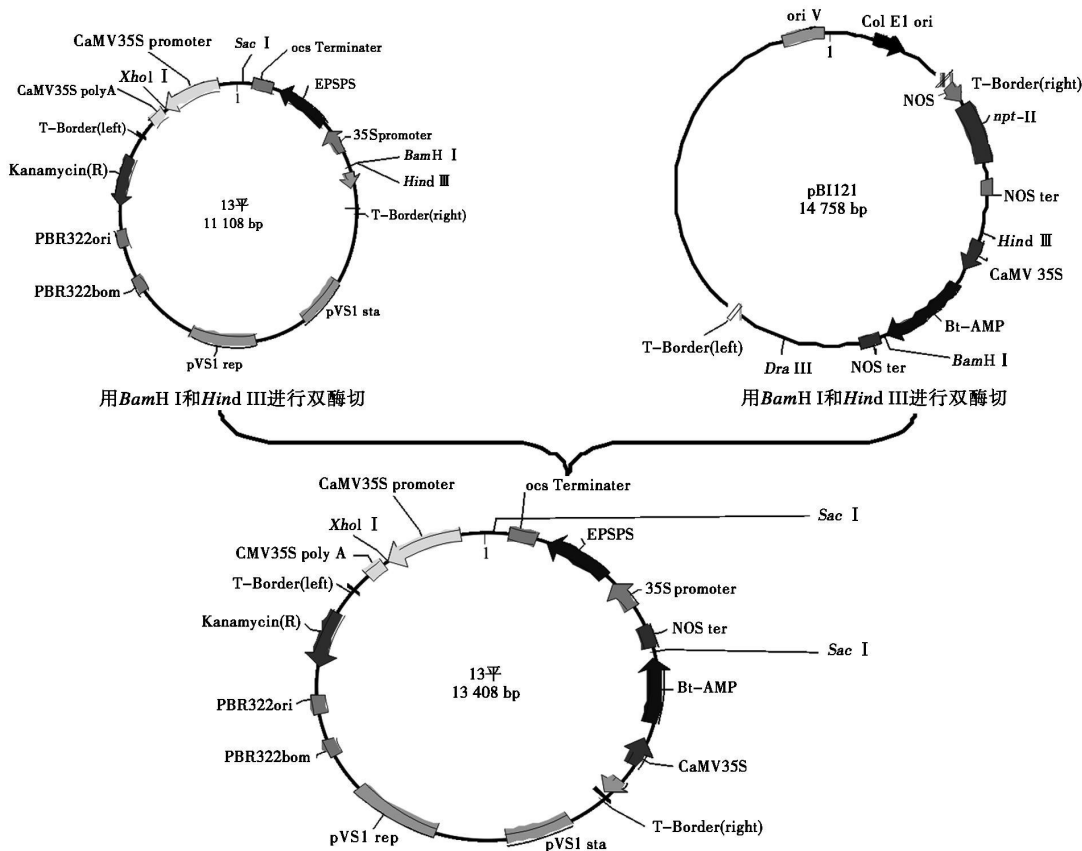


图 3 融合基因转入 13P示意图
Fig 3 Syncretic gene transferring in to 13P

的 MB 分化筛选培养基中培养 28~56 d, 将获得的绿色小芽(丛)切下, 接种到附加有 0.5 mg/L 草甘膦和 200 mg/L 羧苄青霉素的继代筛选培养基上继续筛选, 14 d 继代一次, 共继代 3 次。将筛选的绿芽接种到附加有 0.2 mg/L 草甘膦和 100 mg/L 羧苄青霉素的 RN 生根培养基上。当根长为 2 cm 时炼苗 2 d 即可移至土壤中(图 4~8)。



图 4 5 日龄无菌油菜苗

Fig 4 5 days sterile rape seedling

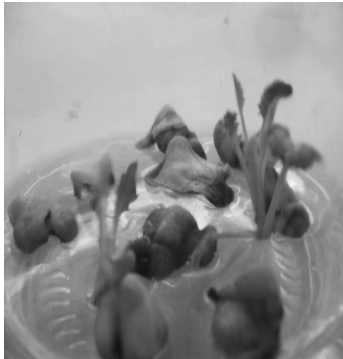


图 5 6 周后的分化芽

Fig 5 Differentiated shoots after 6 weeks

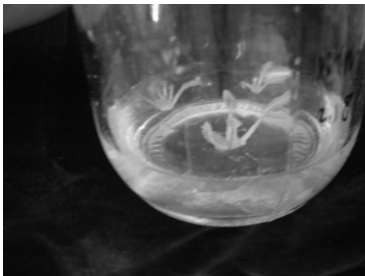


图 6 分化芽的筛选

Fig 6 Differentiated shoots selection



图 7 筛选获得的油菜苗

Fig 7 Transgenic rape seedlings selection



图 8 移植到土壤中的转基因苗

Fig 8 Transgenic rape seedlings transplanting into soil

1.2.3 PCR 检测转基因植株 以油菜总基因组 DNA 为模板, 进行转化植株的 PCR 检测。SDS 法小量提取基因组 DNA^[12-14]; 草甘膦引物: 5'-ATG-GAATCCCTGACGTTACAAC-3' 和 5'-TAATCCGCGC-CAGCTGCTCG-3'; 抗菌肽和 *Bt* 融合基因引物: 5'-ATGGCTAAGTTTGCTTCTATCGTC-3' 和 5'-TTACTG-GAGCGTTGCACTAAC-3', 目标扩增产物为 2100 bp。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s; 52℃ 退火 40 s; 72℃ 延伸 1 min; 40 个循环; 72℃ 保温 10 min。

1.2.4 Southern 检测转基因植株 用 CTAB 法大量提取和纯化转化植株基因组 DNA^[14-15], 经 *Sac*Ⅰ 完全消化, 与 DIG 标记的 *EPSPS* 基因探针杂交, 未转化植株基因组 DNA 和质粒分别为阴性和阳性对照。

1.2.5 RT-PCR 检测转基因植株 采用 TRIZOL Reagent (Invitrogen) 提取总 RNA, 反转录采用 Thermo Script RT-PCR System (Invitrogen), PCR 反应体系与扩增程序同常规 PCR, 参见 1.2.3 对 PCR 产物进行凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 检测

转化的油菜基因组 DNA 经 PCR 扩增后得到约 2100 bp 的特异带(图 9), 与质粒融合基因扩增结果一致, 阴性对照没有特异性扩增产物(图 10), 初步表明基因已整合到受体基因组中。

2.2 转基因植株的 Southern 检测

质粒 13 平中 *EPSPS* 基因上游和下游 *Nos* 终止子外各有 1 个 *Sac*Ⅰ 酶切位点(图 3)。用 *Sac*Ⅰ 可以切出包含完整 *EPSPS* 基因的 DNA 片段, 长度约 3200 bp。图 10 中 Southern 结果显示, 基因组 DNA 经 *Sac*Ⅰ 完全消化后产物与 DIG 标记的 *EPSPS* 探针产生的杂交信号约为 3200 bp。与质粒 (*EPSPS*) 经 *Sac*Ⅰ 和 *Bam*HⅠ 完全消化后产物的杂交信号片段大小相同, 而阴性对照没有杂交信号, 表明外源基因确已整合到油菜基因组中。

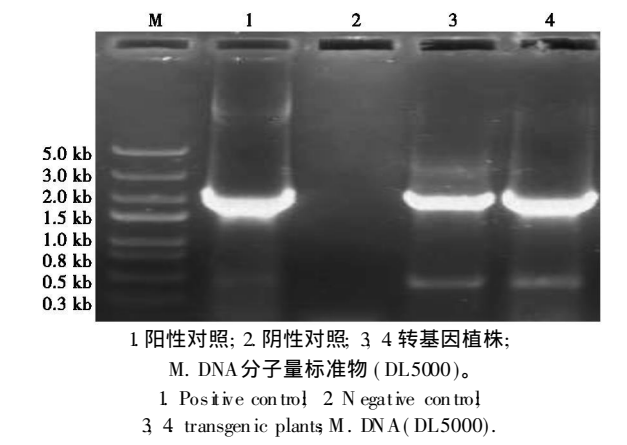


图 9 转基因油菜 PCR 检测

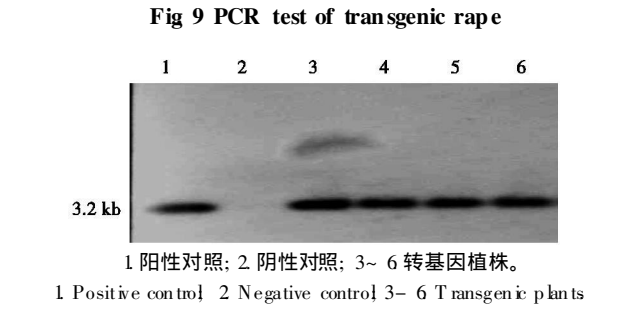


图 10 转基因油菜 Southern 检测

Fig 10 Southern test of transgenic rape

2 3 转基因植株的 RT-PCR 检测

分别以油菜转基因植株和野生型植株纯化的 mRNA 为模板, 用 OligodT 为引物进行反转录。以反转录获得的 cDNA 为模板, 用抗菌肽和 Bt 融合基因的引物进行 PCR 扩增, 获得了特异性扩增产物 (图 11)。转化植株总 RNA 反转录后经 PCR 扩增得到 2.1 kb 左右的 DNA 片段, 与阳性质粒 13 平 (13 408) 扩增结果一致, 阴性对照没有特异性扩增产物。RT-PCR 特异性扩增产物的获得表明外源基因在受体基因组的转录水平表达。

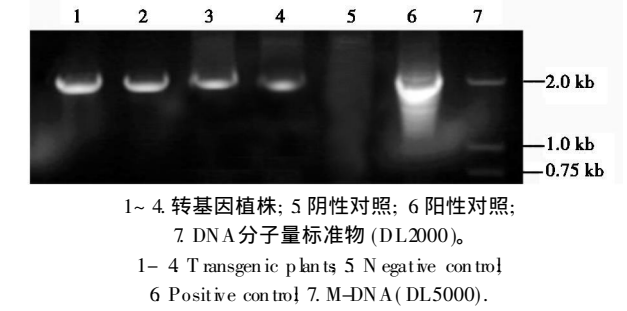


图 11 转基因油菜 RT-PCR 扩增产物

Fig 11 RT-PCR amplification of transgenic rape

3 讨论

3 1 *Bt* 杀虫蛋白基因的改造

近二十几年以来, 国内外纷纷开展了克隆 *Bt* 杀虫蛋白基因的研究, 并通过转基因技术培育抗虫植

物。已有 3 种转 *Bt* 杀虫蛋白基因的作物 (棉花、玉米、马铃薯) 得到商业化推广, 并且是目前唯一被商业化的抗虫转基因作物。从目前的研究来看, *Bt* 基因是所有抗虫基因中较为理想的一类。*Bt* 基因应用于抗虫转基因作物已经历了 4 个发展阶段^[16], 纵观 *Bt* 转基因的研究历史可以看出, 来源于苏云金芽孢杆菌的杀虫蛋白基因无论是其野生型或其改造型在培育抗虫作物方面均具有重要的应用价值。

本研究所用 *Bt CryIA (C)* 杀虫蛋白基因的核苷酸序列是经过设计后, 合成的 *Bt* 杀虫蛋白基因, 在不改变氨基酸序列的前提下, 选用植物偏爱的密码子, 去除原序列中在植物体内的不稳定原件, 经改造合成的序列共 1 842 个核苷酸, 翻译后形成含有 614 个氨基酸的一种杀虫蛋白质, 其毒蛋白基因的表达水平和杀虫效果有了很大提高。改造的目的是为延缓昆虫对杀虫蛋白产生的抗性而提供一种新的杀虫蛋白基因, 使其更好发挥杀虫的效果。

3 2 影响基因转化频率的因素

3 2 1 除草剂草甘膦浓度的选择 通过修饰除草剂对作物作用的酶, 使其对除草剂不敏感或诱导靶标酶蛋白过量产生, 使作物吸收除草剂后仍能进行正常代谢, 或导入酶或酶系统, 在除草剂发生作用前将其迅速代谢而解毒。因此, 提高作物对除草剂的抗性, 以扩大现有除草剂的应用范围是当今杂草科学和作物育种领域研究的重要内容。有人报道, 用花椰菜花叶病毒 CaMV 35 启动子和一个卡那霉素抗性选择标记构建了一个嵌合 *EPSP* 合酶基因, 然后通过农杆菌介导法将其转化到矮牵牛属的植物, 转化了的叶圆片形成抗卡那霉素的愈伤组织。这种愈伤组织能生长在含 0.5 mol/L 草甘膦的培养基上, 其愈伤组织的 *EPSP* 合酶的活性提高了 40 倍, 转化植株在温室中能抗 0.396 kg/hm² 的草甘膦^[19]。选择基因扩增、以提高抗草甘膦水平的烟草、胡萝卜、菊苣等已获得成功^[20]。本研究采用油菜子叶下胚轴的愈伤组织再生芽, 在继代培养基 (MM) 中, 经过加入 5 个浓度梯度的草甘膦 (0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mg/L) 筛选, 确定只有浓度为 0.5 mg/L 时再生芽生长最好, 而生根培养基的草甘膦浓度为 0.2 mg/L 可以有效的筛选出转基因油菜苗。这与前人的研究结果较为一致。

3 2 2 羧苄青霉素浓度的选择 羧苄青霉素通常做为农杆菌浸染后的抑制剂使用, 其不仅会抑制农杆菌的生长, 还会影响植物的生长和发育。在侵染后的组织培养中的羧苄青霉素虽然可以减少 AgNO₃ 的消极作用^[21, 22], 促进芽分化, 但抑制生根^[23], 所

以在生根培养基中要适量减少羧苄青霉素。

因此,在转化过程的不同阶段最好使用不同浓度的抗菌素作抑菌剂。本试验中诱导茎芽分化时羧苄青霉素的浓度为 200 mg/L,诱导生根时的浓度为 100 mg/L,效果比较理想,其遗传转化率(23.3%)较高。

3.3 融合基因的功能鉴定

随着对植物与病原菌互作机制的深入研究,越来越多的抗真菌蛋白基因陆续被鉴定和克隆,利用抗真菌蛋白基因来改良植物真菌病害的基因工程体系亦在建立^[16-18],融合基因的转基因工程在植物真菌病害的综合防治中将发挥越来越大的作用。

融合基因拥有一个特殊的优点,即在转基因的植株中检测出一个基因有效,就可以确定其同时也拥有另一个基因的能力,因为它们共用一个启动子与终止子,属于同一个表达系统。所以 *AMP-Bt* 融合基因对真菌和鳞翅目昆虫都具有良好的毒杀效果,因为其可以编码一种新的杀菌杀虫蛋白,所以也可以同时缓解昆虫对该类杀虫蛋白抗性的增加速度。

新疆农业大学的张楠曾经对 *AMP-Bt* 融合基因的功能在原核系统中做过鉴定。据报道,在细菌的对数生长期加入诱导剂 IPTG 之后,菌液浓度呈现明显的上升趋势,由 pET-AMP-Bt /*E. coli* BL21 的生长克隆菌的生长动态测定结果可知,诱导 3 h, pET-AMP-Bt /*E. coli* BL21 表达出特异蛋白的分子量为 78.0 kDa 与理论计算的分子量大小基本相符合。表明 *AMP-Bt* 基因在微生物中阅读框架完整,未发生提前终止现象,即能够成功表达^[24]。本研究的鉴定工作还有待于下一步进行。

参考文献:

- [1] Ooms G, Bains A, Burrell M, *et al*. Genetic manipulation in cultivars of oil seed rape using *Agrobacterium* [J]. *Theor Appl Genet* 1985, 71: 325-329.
- [2] 官春云,李文彬.芸薹属植物生物工程[M].长沙:湖南科学技术出版社,1999.
- [3] 傅廷栋.杂交油菜的育种与利用[M].武汉:湖北科学技术出版社,2000.
- [4] 刘后利.油菜遗传育种学[M].北京:中国农业大学出版社,2000.
- [5] 官春云.油菜转基因育种研究进展[J].中国工程科学,2002,4(8):34-39.
- [6] 马建华,孙毅.转基因油菜研究进展[J].分子植物育种,2006,4(2):275-279.
- [7] 卢民明.加拿大转基因油菜产业化与安全管理现状[J].中国油料作物学报,2005,27(4):106-110.
- [8] 卢民明,肖玲.中国转基因油菜的环境安全性分析[J].农业生物技术学报,2005,13(3):267-275.
- [9] 蒲惠明.转基因抗除草剂油菜及其生态安全性[J].中国油料作物学报,2003,25(2):89-93.
- [10] 王琼,何清君.植物抗菌肽研究进展[J].四川师范学院学报,2000,21(2):141-145.
- [11] 石强,刘飞鹏.抗菌肽克隆基因的表达和转基因研究现状[J].生物工程进展,2000,20(1):37-40.
- [12] 张颖婷,范燕萍.抗菌肽的研究及其在植物基因工程中的应用[J].山西大同大学学报,2008,24(6):79-81.
- [13] Meyer W, Zhang G, Lu S, *et al*. Transformation of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) with betaine aldehyde dehydrogenase gene for salt and drought tolerance [C]. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Minneapolis Minnesota 2000 167.
- [14] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].第2版.北京:科学出版社,2002.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M].第3版.北京:科学出版社,2002.
- [16] Hancock R E W, Lethier R. Cationic peptides: a new source of antibiotics [J]. *Trends Biotechnol* 1998, 16: 82-88.
- [17] Lu X F, Yang X Y, Cheng J, *et al*. Progresses in insect antimicrobial peptides [J]. *Acta Pharmaceutica Sin* 1999, 34: 156-160.
- [18] 庞明英,段金殿,屈贤铭.昆虫抗菌肽的结构与功能关系及其在分子设计中的应用[J].生命科学,2001,13(5):209-213.
- [19] Kishore G M, Shah D. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides [J]. *Annu Rev Biochem*, 1988, (57): 627-663.
- [20] Widholm J M, Chinnala A R. Glyphosate selected gene amplification [J]. *Plant Physiology* 1996, 3(2): 41-45.
- [21] De Block M, Dik De Brouwer P, AulTennig. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants [J]. *Plant Physiology* 1989(91): 694-701.
- [22] 高武军,段红英,卢龙斗.油菜转化体系中抗生素浓度的优化试验[J].河南科学,2002,20(3):257-259.
- [23] 卢龙斗,张胜,段红英,高武军.影响油菜下胚轴外植体芽高频再生的因素[J].广西植物,2003,23(3):240-242.
- [24] 张楠,陈正华,曲延英,等.抗虫杀菌融合基因表达载体的构建及微束激光转化植物研究[J].激光生物学报,2007,16(2):200-207.