

转基因抗虫棉 *Bt* 基因与 *npt II* 基因的遗传与表达

闫喜中^{1,2}, 张 锐¹, 孟志刚¹, 孙国清¹, 周 涛¹, 郭三堆¹

(1. 中国农业科学院 生物技术研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;

2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要:采用花粉管通道法将含有 *Bt* 杀虫基因的 pG4AB 质粒导入受体棉花中 23 中, 通过卡那霉素筛选, *Bt* 免疫检测条检测, PCR 扩增对转基因抗虫棉的各个自交世代进行跟踪研究。结果表明, 具有卡那霉素抗性的单株能扩增出 *Bt* 基因, 而且均有 *Bt* 杀虫蛋白表达。 *Bt* 基因与 *npt II* 基因均整合进了棉花基因组中, 相互之间紧密连锁遗传, 均稳定表达, 因此报告基因 *npt II* 可用于研究 *Bt* 基因的遗传情况。

关键词: *Bt* 基因; *npt II* 基因; 遗传; 表达

中图分类号: S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2008)06 - 0161 - 03

Inheritance and Expression of the *Bt* and *npt II* Genes in Transgenic Cotton

YAN Xi-zhong^{1,2}, ZHANG Rui¹, MENG Zhi-gang¹, SUN Guo-qing¹, ZHOU Tao¹, GUO San-dui¹

(1. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, National Key Facility for

Crop Gene Resource and Genetic Improvement, Beijing 100081, China; 2. College of Agronomy,

Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Plasmid pG4AB containing *Bt* gene was transferred into cotton Zhong 23 via pollen tube pathway. The Kanamycin detection and the expression of *Bt* ICP, PCR were used to analyze the self-pollination generations from transgenic cotton Zhong 23. The results were as follows. Exogenous *Bt* gene was amplified and expressed in the Kanamycin - resistance transgenic cotton. The *Bt* gene and *npt II* gene were inserted into the transgenic cotton genome, they were linked and inherited stably in different generations. *npt II* gene can be used in inheritance analysis of *Bt* gene.

Key words: *Bt* gene; *npt II* gene; Inheritance; Expression

利用转基因进行作物改良开辟了作物育种的新途径, 其重要意义在于最大限度地绕过了物种间生殖隔离的障碍, 这样能使农作物获取整个生物界的遗传资源, 有可能取得突破性的育种进展, 同时大大缩短了育种的周期, 但其能否成功关键在于外源基因在转化体内的遗传稳定性和表达情况^[1]。转基因应用的实践表明, 外源基因在受体中的命运受到一系列生理生化过程的作用, 并以复杂的遗传方式表现出来, 外源基因片段大小、甲基化、丢失、共抑制、基因沉默等都会影响其稳定遗传和表达^[2-4]。

在研究外源基因的世代遗传情况时, 首先面临的是如何在大量自交后代中选择携带目的基因的个体, 采用 PCR、DNA 分子杂交和蛋白质免疫分析等

技术来筛选固然可靠, 但需要专门设备, 技术要求和成本都较高, 而且操作费时, 筛选速度慢。如果所用的报告或标记基因与目的基因在转化体中是连锁遗传和协同表达的话, 那么利用报告或标记基因来筛选携带目的基因的个体则比较方便。前人研究报告基因和目的基因是连锁遗传^[5], 但是这些研究一般都集中在早期世代。本试验对转基因抗虫棉中目的基因和报告基因的遗传和表达情况进行高世代研究, 为转基因作物品种的培育和应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

在以花粉管注射法获得转基因中 23 抗虫棉的

收稿日期: 2008 - 09 - 06

基金项目: 国家“863”计划项目资助(2003AA211050)

作者简介: 闫喜中(1980 -), 男, 山西繁峙人, 助教, 硕士, 主要从事植物基因工程研究。

通讯作者: 郭三堆(1950 -), 男, 山西晋城人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

T₃ 中,随机抽取 5 个抗卡那霉素阳性单株为研究材料,分别命名为 K₁, K₂, K₃, K₄, K₅;以非转基因棉花石远 321 为阴性对照,以质粒 pG4AB 为阳性对照。

1.2 转基因植株的 Kana 筛选

在棉花苗期,傍晚时用蘸有 $1\ 000\times 10^{-6}$ 卡那霉素的脱脂棉球贴在叶片表面。4~5 d 后,同样方法进行 2~3 次,观察试验结果,卡那霉素敏感植株的叶片贴棉球处呈黄色,反之基本无变化。

1.3 PCR 法检测抗虫基因

在每个世代不同的株系中随机选取 10 株抗卡那霉素阳性单株,取其嫩叶部分,提取棉花基因组 DNA^[6],由 *Bt* 基因序列设计引物 1:5'-GGTACAC TCCATCGACATCTCC-3',引物 2:5'-CCATAGGCG AACTCTGTCCGTC-3'。反应液组成:DNA 模板 1.0 μ L, dNTP (4 种 dNTP 混合物 2.5 mmol/L each) 1.0 μ L,缓冲液 2.0 μ L, *Taq* 聚合酶 2 U,加超纯水至 20 μ L。94 预变性 7 min;94 45 s,55 45 s,72 1 min,进行 30 个循环,72 保温 7 min。

1.4 Bt 杀虫蛋白叶片表达检测

这些随机选取有卡那霉素抗性且 PCR 扩增出 *Bt* 基因的阳性单株,各取其 0.5 g 叶片加入 600 μ L 样品抽提液,捣碎样品,12 000 r/min 离心 1 min,将 *Bt-CryIAb/IaC* 免疫检测试纸条插入样品上清液中,在 20~30 min 内观测反应结果。阳性结果:在检测条上出现两条紫红色条带,一条检测线和一条质控线。阴性结果:在检测条上仅出现一条紫红色质控线。

2 结果与分析

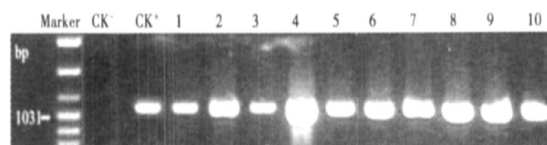
2.1 卡那霉素抗性筛选与阳性单株 PCR 检测

在每个世代苗期,用卡那霉素处理转基因棉花,选择抗卡那霉素的阳性单株,说明这些阳性单株基因组中整合的 *npt II* 基因能稳定表达,在转基因棉花体内产生了抗卡那霉素的蛋白质。从阳性单株中随机选取 10 株,进行 *Bt* 基因的 PCR 扩增(图 1)。结果显示,抗卡那霉素阳性植株都能扩增出 *Bt* 基因,带的大小为 1 070 bp,与预期的长度完全一致,阴性对照材料的 PCR 扩增电泳结果中均未出现相应的电泳带谱。由 PCR 检测结果我们可以判断:凡是抗卡那霉素的棉株都能扩增出 *Bt* 基因,说明 *Bt* 基因整合在了被检测的棉花基因组中,与 *npt II* 基因呈紧密连锁遗传。

2.2 Bt 试纸条检测

对随机选取有卡那霉素抗性且 PCR 扩增出 *Bt* 基因的阳性单株进行 *Bt* 杀虫晶体蛋白检测(图 2),

检测结果表明:在抗卡那霉素且 PCR 扩增出 *Bt* 基因的转基因棉株体内均能检测到 *Bt* 杀虫蛋白。说明在转基因棉花中 *Bt* 基因可以稳定表达。表 1 为抗卡那霉素的转基因抗虫棉在不同世代中 *Bt* 基因的遗传与表达情况,由此说明,整合在棉花基因组中的 *Bt* 基因和 *npt II* 基因没有发生基因丢失和基因沉默现象,这 2 个基因在不同世代的棉株中稳定表达。



CK⁻: 非转基因植株;CK⁺: 质粒 pG4AB;
1~10. 卡那霉素检测阳性株 PCR 检测结果。
CK⁻: Non-transgenic plants;CK⁺: Plasmid pG4AB;
1-10. PCR detection of positive plants.

图 1 阳性植株 *Bt* 基因 PCR 检测

Fig. 1 *Bt* gene PCR detection of positive cotton

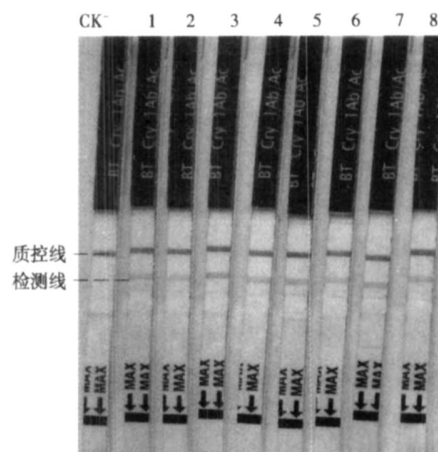


图 2 部分卡那霉素抗性棉株 *Bt* 杀虫蛋白的试纸条检测

Fig. 2 Detection of the expression of ICP of the partial kanamycin resistant cotton plants

3 讨论

外源基因能否在转基因的后代中稳定地遗传和表达是基因工程技术实用化研究中人们普遍关注的问题。基因沉默现象的发现使很多人对转基因技术的实用化研究产生了迷惑,总怀疑转基因在后代中得不到稳定的遗传和表达。理论上,如果外源基因的整合一旦发生,插入的外源基因在减数分裂中保留下来,就可以稳定地通过有性过程传递给后代,并保持减数分裂的稳定性。

华志华等^[7]通过对低拷贝数的转基因水稻株京引 119 的世代连续跟踪分析以及高世代材料的群体遗传分析表明,共转化基因 *bar* 和 *cecropin B* 在基因组中紧密连锁并能稳定的遗传和表达。崔海瑞等^[5]

表 1 抗卡那霉素的转基因棉花在不同世代中
Bt 基因的遗传与表达

Tab. 1 Inheritance and expression analysis of the Bt gene in
kanamycin-resistant transgenic cotton in different generations

代数 Generation	株系 Line	卡那阳性株中 Bt 蛋白检测 (阳性 阴性) Bt protein detection in kanamycin-resistance cotton (positive negative)	卡那阳性株中 <i>Bt</i> 基因 PCR 检测 (阳性 阴性) PCR analysis of <i>Bt</i> gene in kanamycin-resistance cotton (positive negative)
T ₃	K ₁	10 0	10 0
	K ₂	10 0	10 0
	K ₅	10 0	10 0
	K ₈	10 0	10 0
	K ₉	10 0	10 0
T ₄	K ₂₋₃	10 0	10 0
	K ₂₋₉	10 0	10 0
	K ₆₋₂	10 0	10 0
	K ₆₋₈	10 0	10 0
	K ₈₋₄	10 0	10 0
	K ₈₋₇	10 0	10 0
	K ₉₋₁	10 0	10 0
	K ₉₋₅	10 0	10 0
T ₅	K ₂₋₃₋₃	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₇	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₁₃	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₃	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₁₇	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₂₀	10 0	10 0
	K ₈₋₄₋₂₁	10 0	10 0
	K ₈₋₄₋₂₉	10 0	10 0
	K ₈₋₇₋₁	10 0	10 0
	K ₈₋₇₋₅	10 0	10 0
T ₆	K ₂₋₃₋₃₋₁	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₇	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₁₁	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₁₃₋₄	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₁₇₋₄	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₁₇₋₁₀	10 0	10 0
	K ₈₋₄₋₂₉₋₇	10 0	10 0
	K ₈₋₄₋₂₉₋₉	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₁₇₋₄	10 0	10 0
	K ₂₋₉₋₁₇₋₁₀	10 0	10 0
T ₇	K ₂₋₉₋₂₀₋₁	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₁₋₃	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₁₋₈	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₇₋₃	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₇₋₁₁	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₁₁₋₂	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₃₋₁₁₋₉	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₁₃₋₉₋₂	10 0	10 0
	K ₂₋₃₋₁₃₋₉₋₄	10 0	10 0
	K ₈₋₄₋₂₉₋₇₋₁	10 0	10 0

对转 *Bt* 基因水稻与常规品种进行杂交,后代通过 *GUS* 活性的组织化学分析和农艺性状考察表明,*GUS* 报告基因与 *Bt* 抗虫基因是连锁遗传和协同表达。李艳萍等^[8]对转 *hyg* 和 *GNA* 基因的保持系^[9]和有 *SCK* 和 *bar* 基因的恢复系^[10]高代材料的遗传稳定性进行调查分析,结果表明,*bar-SCK* 基因、*hyg-GNA* 基因在受体中紧密连锁且协同表达。笔者对外源基因在转基因棉花植株后代的遗传和表达作了研究,证明了同一质粒上的 *Bt* 杀虫基因与 *npt II* 基因在自交后代中呈现紧密连锁遗传特征而且稳定表达,这与前人研究的结论相符合,因此报告基因 *npt II* 可用于研究 *Bt* 基因的遗传情况,为筛选转基因阳性单株提供了一种低成本、快速、简便的手段。

参考文献:

[1] 何龙飞,莫长明,李创珍,等. 转基因水稻中外源 *scd* 基因的遗传表达特性[J]. 分子植物育种,2007,5(5):601 - 607.

[2] Simon-Mateo C,Lopez-Moya J J,Guo H S. Suppressoractivity of potyviral and cucumovirus infections in potyvirus-induced transgene silencing[J]. Gen Virol,2003,84:2877 - 2883.

[3] Stempak J M,Sohn K J,Chiang E P. Cell and stage of trans-formation-specific effects of folate deficiency on methionine cycle intermediates and DNA methylation in an in vitro model [J]. Carcinogenesis,2005,6(5):981 - 990.

[4] Meyer P. Transcriptional transgene silencing and chromatin components[J]. Plant Mol Biol,2000,43(2/3):221 - 234.

[5] 崔海瑞,王忠华,舒庆尧,等. 转 *Bt* 基因水稻克螟稻杂交转育后代农艺性状的研究[J]. 中国水稻科学,2001,15(2):101 - 106.

[6] 孙鑫,崔洪志,胡宝忠,等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总 DNA[J]. 生物技术通报,2004(5):45 - 47.

[7] 华志华,朱雪峰,吴明国,等. 水稻转基因整合模式中外源基因的遗传规律[J]. 作物学报,2003,29(1):44 - 48.

[8] 李艳萍,邹美智,孙海波,等. 转基因水稻高世代农艺性状的表现[J]. 华北农学报,2008,23(1):15 - 21.

[9] 牛芝霞,朱祯,李艳萍,等. 雪花莲外源凝集素基因在水稻保持系上的转化[J]. 天津农业科学,2003,9(2):1 - 4.

[10] 牛芝霞,朱祯,牛景,等. 抗除草剂基因在粳稻恢复系中的基因枪转化及其在后代中的表达[J]. 天津农业科学,2002,8(1):1 - 6.