

# 转 *CryI*Ac-*w* 基因抗虫玉米的获得及分子鉴定

燕树锋,铁双贵,岳润清,韩小花,齐建双,卢彩霞

(河南省农业科学院 粮食作物研究所,河南 郑州 450002)

**摘要:**为将改造合成的抗虫基因(*CryI*Ac-*w*)导入玉米基因组,以玉米杂交组合 PA × PB 的胚性愈伤组织为外植体,用双丙氨磷作为抗性愈伤组织的筛选剂,通过农杆菌介导法获得了 82 个再生植株。经标记基因(*bar*)和目的基因(*CryI*Ac-*w*)的 PCR 检测,其中 19 株为阳性,即为推断的转 *CryI*Ac-*w* 基因抗虫玉米。对其中 2 株( $w_1$  和  $w_2$ )进行目的基因单酶切的 Southern 杂交分析,发现  $w_1$  和  $w_2$  分别为单位点和双位点插入,这也进一步证实目的基因已经整合入玉米基因组中。用 Bt-Cry1Ab/Ac 金标免疫试纸条进行蛋白质表达的检测,初步证实目标 *CryI*Ac-*w* 蛋白在玉米中得到表达。

**关键词:**玉米;农杆菌介导法;苏云金杆菌(Bt);*CryI*Ac-*w* 基因;Southern 杂交;免疫检测

**中图分类号:**S435.132;Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)05-0041-04

**doi:**10.7668/hbxb.2015.05.007

## Acquirement and Molecular Identification of Transgenic Insect-resistant Corn Expressing *CryI*Ac-*w* Gene

YAN Shu-feng, TIE Shuang-gui, YUE Run-qing, HAN Xiao-hua,

QI Jian-shuang, LU Cai-xia

(Cereal Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to introduce the modified *CryI*Ac-*w* gene into the corn. Eighty-two regeneration plants were obtained through *Agrobacterium*-mediated method using embryo callus of the hybrid combination PA × PB as explants and the bialaphos as screening agent, but nineteen plants were putative transgenic plants, confirmed by PCR method of labelled gene(*bar*) and target gene(*CryI*Ac-*w*). Southern hybridization test(single restriction enzymes digestion) showed successful integration of the foreign *CryI*Ac-*w* gene into the corn genome and the  $w_1$  and  $w_2$  contained one copy and two copies of target gene, respectively. The expressing of *CryI*Ac-*w* protein was confirmed by Bt-Cry1Ab/Ac immune detection strips.

**Key words:** Corn; *Agrobacterium*-mediated method; *Bacillus thuringiensis*(Bt); *CryI*Ac-*w* gene; Southern blot; Immune detection

玉米是我国第一大粮食作物,同时也是重要的饲料和工业原料,在我国国民经济中占有举足轻重的地位<sup>[1-2]</sup>。虫害是造成玉米产量损失的主要原因,传统抗虫玉米育种耗时长、效率低,因而转抗虫基因玉米成为解决虫害的有效途径之一<sup>[3]</sup>。2013 年全球转基因玉米种植面积达到 5 740 万  $\text{hm}^2$ , 占到玉米总种植面积(1.77 亿  $\text{hm}^2$ )的 32%。自 1996 年首例抗虫转基因玉米在美国商品化以来<sup>[4]</sup>,先后有 10 多个转化系分别表达 *CryI*Ab、*CryI*Ac、*Cry9C*

及 *Cry1*Fa2 蛋白的抗虫玉米在美国、加拿大、西班牙等国商业化种植<sup>[5]</sup>,在较多的国家和地区获批的抗虫玉米事件分别为 MON810、Bt11、TC1507、MON89034 等<sup>[6]</sup>。

目前,转基因抗虫玉米仍未在我国得到商业化应用,河南省农业科学院粮食作物研究所将本单位人工改造合成的 *CryI*Ac-*w* 抗虫基因,通过农杆菌介导的方法导入玉米杂交种 PA × PB 中,创造了转基因抗虫玉米新种质,并对其进行了分子鉴定,为该种

收稿日期:2015-06-15

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2015ZX08011-003);河南省农业科学院自主创新专项基金项目

作者简介:燕树锋(1982-),男,河南汤阴人,助理研究员,博士,主要从事植物基因工程和分子育种方面的研究。

通讯作者:铁双贵(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,主要从事玉米育种和基因工程方面的研究。

质的育种利用以及商业化生产提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验所用农杆菌转化受体材料即杂交组合 PA × PB 幼胚形成的胚性愈伤组织、人工改造合成的 *CryIAc-w* 抗虫基因和农杆菌菌株 EHA105, 均由河南省农业科学院粮食作物研究所提供, 植物表达载体 CPB 上的选择标记基因为 *bar* 基因。

金标免疫试纸条 (Bt-Cry1Ab/1Ac 免疫试纸条) 产自于美国 Agdia 公司; Southern 杂交有关试剂均产于罗氏生物医学工程公司; *Taq* DNA 聚合酶、DL2000 Marker 和限制性内切酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

试验所用培养基 (D 基本培养基、筛选培养基、分化培养基和再生培养基 I 等) 的组成和配制见参考文献 [7]。

### 1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌介导的转化 农杆菌转化时 OD 值为 0.5 ~ 0.6, 侵染时间为 5 ~ 10 min, 乙酰丁香酮 (AS) 终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ ; 侵染后用灭菌滤纸吸去胚性愈伤组织上多余菌液, 21℃ 黑暗条件下共培养 2 d, 用含有 250 mg/L 羧苄青霉素 (Carb) 的无菌水冲洗 3 ~ 5 次, 无菌滤纸上晾干, 然后转移到筛选培养基上进行培养。

1.2.2 抗性愈伤组织筛选和植株再生 将转化后的胚性愈伤组织转到含 1.5 mg/L 双丙氨磷 (Bialaphos) 和 250 mg/L Carb 的筛选培养基上培养 14 d, 然后转到含 3 mg/L Bialaphos 和 125 mg/L Carb 的筛选培养基上再培养 14 ~ 28 d, 最后转入分化培养基中进行植株再生。

1.2.3 PCR 检测 PCR 反应体系: 总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 ddH<sub>2</sub>O 10.95  $\mu\text{L}$ 、10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  引物 F 1.6  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  引物 R 1.6  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* 酶 0.25  $\mu\text{L}$ 、100 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环; 然后 72℃ 恒温 7 min; 4℃ 下保存。 *bar* 和 *CryIAc-w* 基因退火温度均为 58℃。

PCR 引物和目的片段大小如下。

*Bar* 基因 F: 5'-AACGACGCCCCGCGCCGACATCC-3'; R: 5'-CATGCGCACGCTCGGGTCGTTG-3', 目的片段 398 bp。

*CryIAc-w* 基因 F: 5'-CATTCAACATCGGCATC

AAC-3'; R: 5'-GCGCGCTATATTTTGTCTTCT-3', 目的片段 926 bp。

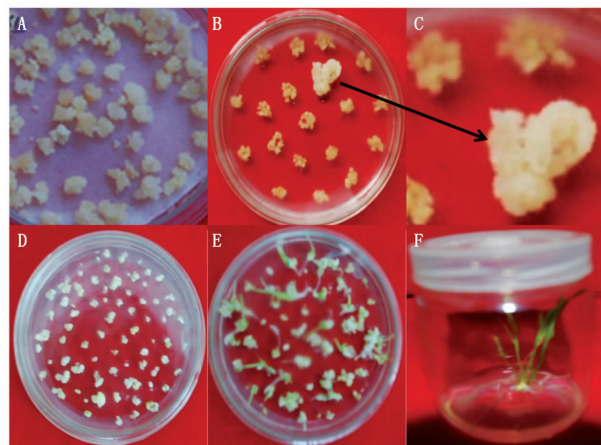
1.2.4 Southern 杂交检测 取 10  $\mu\text{g}$  玉米基因组 DNA, *Hind* III 单酶切后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 8 h, 毛细管印迹法转膜; *CryIAc-w* 基因的探针标记使用罗氏 PCR Dig Probe Synthesis Kit; 预杂交、杂交及检测使用罗氏 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit1, 操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 金标 Bt-Cry1Ab/1Ac 免疫试纸条检测 将玉米叶片放入 2 mL 离心管中, 加入液氮研磨充分后, 加入试剂盒自带缓冲液并混合均匀, 将试纸条样品端浸入样品液中 0.5 cm, 静置 3 ~ 6 min 后读取试验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 转 *CryIAc-w* 基因抗虫玉米植株的获得

取授粉后接近 14 d 的玉米穗进行剥胚, 将幼胚放到 D 基本培养基上诱导愈伤组织, 愈伤组织每 14 d 继代 1 次, 选择生长状态良好的 II 型胚性愈伤组织用于农杆菌浸染; 共培养 (图 1-A) 后, 将愈伤组织首先转到含 1.5 mg/L Bialaphos 的筛选培养基上培养 14 d, 然后转到含 3 mg/L Bialaphos 的筛选培养基上再培养 14 ~ 28 d, 得到抗性愈伤组织 (图 1-B、C); 将抗性愈伤组织转到再生培养基 I 上, 经分化再生培养得到再生植株 (图 1-D、E), 最后进行生根培养 (图 1-F); 将生根后的植株移栽到含有泥炭土和蛭石 (3:1) 的营养钵中, 在温室中进行炼苗, 炼苗



A. 浸染后共培养; B. 筛选培养; C. 抗性愈伤组织;

D. 分化培养; E. 再生培养; F. 生根培养。

A. Coculture after infection; B. Screening culture; C. Resistant callus; D. Differentiation culture; E. Regeneration of plants; F. Root formation.

图 1 农杆菌介导法获得转基因玉米再生植株

Fig. 1 The transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated method

后移至大田种植。本试验用于转化的愈伤组织数为220个,获得的抗性愈伤组织数为35个,再生植株数为82个。

2.2 转 *CryIAc-w* 基因抗虫玉米的 PCR 检测

对82个再生植株取少量叶片提取DNA,进行标记基因(*bar*)和目的基因(*CryIAc-w*)的PCR检测。依据标记基因*bar*序列信息设计特异引物进行PCR扩增,82个再生植株中有20株扩增出与质粒CPB大小一致的片段(398bp),部分标记基因的PCR检测结果见图2。而依据目的基因*CryIAc-w*序列信息设计特异引物进行PCR扩增,82个再生植株中仅有19株扩增出与质粒CPB大小一致的片段(926bp),部分目的基因的PCR检测结果见图3。此外发现,这19株所对应的标记基因PCR反应也同时呈现阳性,初步证实这19株转化植株的目的基因与标记基因均整合到了玉米基因组中。

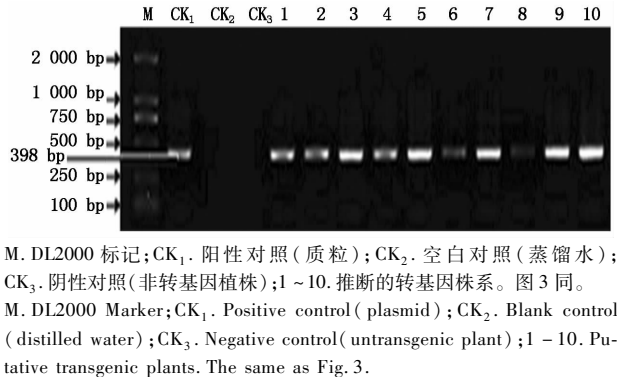


图2 标记基因(*bar*)的PCR检测结果

Fig.2 PCR amplification results of labelled gene(*bar*)

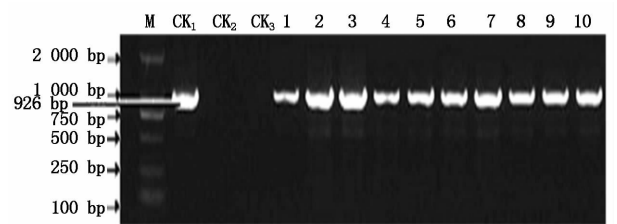
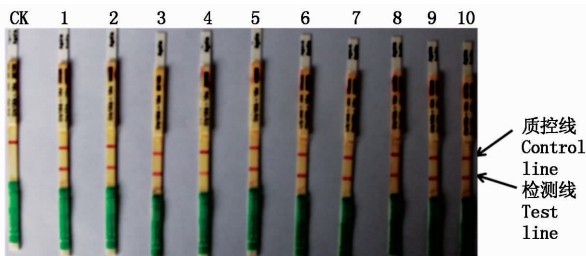


图3 目的基因(*CryIAc-w*)的PCR检测结果

Fig.3 PCR amplification results of target gene(*CryIAc-w*)

2.3 转 *CryIAc-w* 基因抗虫玉米的试纸条检测

由金标免疫试纸条Bt-Cry/Ab/Ac检测结果可知,这19个植株所对应的试纸条均出现质控线和检测线2条带(部分试纸条检测结果见图4),质控线出现证明检测环境是可靠的,检测线出现证明所测样品为阳性,2条带同时出现证明*CryIAc-w*蛋白在转基因植株中得到了表达。检测线显现的深浅度与蛋白质表达量的多少成正比,由图4试纸条显色情况可知,*CryIAc-w*蛋白在不同转基因玉米植株中表达强弱不一致,这可能与目的基因的插入位点或拷贝数等因素有关。



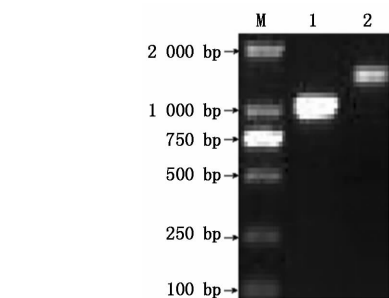
CK. 阴性对照(非转基因植株);1~10. 推断的转基因株系。  
CK. Negative control(untransgenic plant);  
1~10. Putative transgenic plants.

图4 目标蛋白(*CryIAc-w*)的免疫试纸条检测结果

Fig.4 Protein expression results of target gene(*CryIAc-w*)

2.4 转 *CryIAc-w* 基因抗虫玉米的 Southern 杂交检测

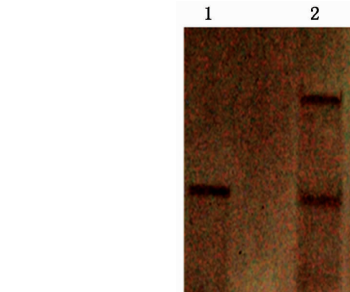
使用设计合成的*CryIAc-w*基因引物,并用罗氏PCR Dig Probe Synthesis Kit进行探针标记。用普通dNTPs进行的PCR扩增,其电泳条带明显比使用含地高辛标记的dNTPs扩增出的条带小,原因为带有地高辛标记的PCR扩增片段其分子量要大于不带有标记的片段。由图5所示,2号泳道的片段明显大于1号泳道的片段,这表明探针已标记成功。选取2株PCR和试纸条检测呈阳性的植株(*w*<sub>1</sub>和*w*<sub>2</sub>),CTAB法大量提取叶片总DNA,*Hind*Ⅲ单酶切后,电泳、转膜,用制备好的探针进行Southern杂交。结果表明,转化事件*w*<sub>1</sub>和*w*<sub>2</sub>分别为单位点和双位



M. DL2000 标记;1. 未标记的PCR扩增结果;  
2. 已标记的PCR扩增结果。  
M. DL 2000 Marker;1. Unlabeled PCR amplification results of target gene;2. Labeled PCR amplification results of target gene.

图5 Southern杂交探针的标记

Fig.5 The probe label of Southern blot



1. 转化事件 *w*<sub>1</sub>;2. 转化事件 *w*<sub>2</sub>。  
1. *w*<sub>1</sub> transformation event;2. *w*<sub>2</sub> transformation event.

图6 *CryIAc-w* 基因的 Southern 杂交分析

Fig.6 Southern Blot analysis of *CryIAc-w* gene

点插入(图6),这也进一步证实目的基因已经整合入玉米基因组中。

### 3 结论与讨论

本研究通过农杆菌介导法进行遗传转化,经双丙氨磷、PCR、Southern 杂交和免疫试纸条等筛选和鉴定,证实了改造合成的抗虫基因(*CryIAc-w*)成功导入玉米基因组且目标蛋白得以表达,这为转基因玉米育种创造了新种质。

同位素标记法是 Southern 杂交最经典的方法,但需要在特定的实验室和防护措施下进行,由于人们对其安全性的担忧以及试验条件的限制等,DIG 等非放射性标记被越来越多地使用。目前,棉花、烟草、水稻、油菜和小麦等植物用地高辛标记探针进行 Southern 杂交均获得良好的试验效果<sup>[8-10]</sup>。大多数研究都使用随机引物标记,需要对模板和探针纯度、标记时间等因素进行摸索,且耗时耗力,极易造成失败。而本研究使用 PCR 方法进行 DIG 探针标记,具有耗时短、效果直观、通过条带亮度可以推断出探针的含量、成功率高等优点,因此,推荐使用该方法进行植物 Southern 杂交的探针标记。此外,本研究中发现 1 株转化植株只扩增出标记基因未扩增出目的基因,可能是农杆菌中混有少量未插入目的基因的质粒,也可能是质粒在农杆菌中发生重组导致少量菌株目的基因丢失等,其原因还有待于进一步考证。

目前得到商业化应用的转基因抗虫玉米主要抗鳞翅目害虫(*CryIAb*、*CryIAc*、*Cry9C* 及 *CryIFa2*),具有较窄的抗虫谱。而利用抗鳞翅目、鞘翅目或双翅目的蛋白酶抑制剂基因(*CPTI*、*API*、*SKTI* 和 *PI-II* 等),抗鞘翅目和地老虎的营养期杀虫蛋白基因(*Vip1*、*Vip2* 和 *Vip3A*),以及抗玉米线虫(*Cry3*、*Cry34* 和 *Cry35*)、抗鳞翅目和鞘翅目(*Cyt1Aa*)和抗双翅目(*Cyt1Ab*、*Cyt1Ba*、*Cyt2Aa1* 和 *Cyt2Ba1*)等其他抗虫

基因<sup>[11-12]</sup>,培育复合抗虫性状的转基因玉米,将成为未来发展的主要趋势。

### 参考文献:

- [1] 铁双贵,孙 静,岳润清,等.农杆菌介导法将高赖氨酸蛋白基因 *sb401* 导入玉米的研究[J].玉米科学,2012,20(6):49-53.
- [2] 王悦冰,郎志宏,张 杰,等.利用 *ubi1* 内含子增强 *Bt cryIAh* 基因在转基因玉米中的表达[J].科学通报,2008,53(17):2041-2046.
- [3] 林 鸿.玉米外源抗虫基因转化体创制与表达分析[D].郑州:郑州大学,2014.
- [4] 葛 建,刘晓鑫,李晓辉.世界转基因玉米商业化种植概况(1996~2007)[J].农业与技术,2008,28(3):44-47.
- [5] 王月琴,何康来,江 帆,等.BT799 玉米对亚洲玉米螟抗性研究[J].应用昆虫学报,2014,51(3):636-642.
- [6] James C. 2013 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志,2014,34(1):1-8.
- [7] 孙 静.高赖氨酸蛋白基因 *sb401* 玉米转基因植株的获得及检测分析[D].郑州:郑州大学,2012.
- [8] 张 晓,张 锐,于源华,等.基于 DIG-化学发光法的 Southern blot 方法优化[J].生物技术通报,2011(9):205-210.
- [9] 刘 禄,牛焱焱,雷 昊,等.基于地高辛标记对小麦进行 Southern 杂交分析主要影响因素的优化和验证[J].植物遗传资源学报,2012,13(2):182-188.
- [10] 燕树锋.转基因抗草甘膦棉花种质系的创造及利用[D].杭州:浙江大学,2011.
- [11] 吕 霞,王 慧,曾 兴,等.转基因抗虫玉米研究及应用[J].作物杂志,2013(2):7-12.
- [12] Zhu S J, Li L, Chen J H, et al. Advance in research and utilization of cotton biotechnology in China[J]. Plant Omics Journal, 2011, 4(6):329-338.