



转基因双价抗虫棉中 Cry1Ac 基因与 CpTI 基因的共表达

康保珊^{1,2}, 张锐¹, 潘登奎³, 王远¹, 郭三堆^{1*}

(1. 中国农业科学院生物技术研究所 100081; 2. 中国农业科学院郑州果树研究所 450009; 3. 山西农业大学文理学院, 太谷 030801)

摘要:以转基因双价抗虫棉自交后代为材料,利用 PCR、Southern 杂交、ELISA 检测方法,分析了 Cry1Ac 基因与 CpTI 基因在基因组中的整合情况,结果显示,除 sGK321 和 3517 外,其余品种 Cry1Ac 基因和 CpTI 基因的整合位点不同,并且 sGK321 中两基因也只有一个位点相同;ELISA 结果表明,同一个品种同一部位 Cry1A 蛋白和 CpTI 蛋白不能完全同步表达,它们的表达量存在差别,且这种差别在整个生长阶段并不稳定。

关键词:花粉管通道法;双价抗虫棉;Cry1Ac 基因;CpTI 基因;协同表达

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2005)03-0131-06

Synchronous Expression of the Cry1Ac and CpTI Genes in Transgenic Cotton

KANG Bao-shan^{1,2}, ZHANG Rui¹, PAN Deng-kui³, WANG Yuan¹, GUO San-dui^{1*}

(1. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, China; 3. Institute Arts and Science, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

Abstract: PCR, Southern blotting were used to analyze the characteristics of Cry1Ac gene and CpTI gene in transgenic cotton genome and the cotton derived in eight different transgenic cotton harboring double-gene varieties or lines through pollen-tube transformation. The results demonstrated that the copy number and insertion site of the same gene in eight varieties or lines are not consistent completely. The insert sites of Cry1Ac and CpTI of the same variety or line are different except sGK321 and 3517, moreover; only one insertion site is uniform in sGK321. In the meantime, it was found that one blotting signal was around the position of 4.7 kb in all southern blotting maps of Cry1Ac gene. ELISA measured the two proteins of Cry1Ac and CpTI concentrations in different varieties or lines. As a result, the two genes of Cry1Ac and CpTI cannot express synchronously in the same line and position. Their expression exist much difference. And the variations were unstable at the whole development stage. These results indicated that two series of foreign genes, Cry1Ac gene and CpTI gene, on plasmid pGBI121S4ABC were not absolutely linkage integration and synchronous expression in most of transgenic plant through pollen-tube transformation.

Key words: pollen-tube pathway transformation; transgenic cotton harbouring double-gene; Cry1Ac gene, CpTI gene; synchronous expression

一般认为同一个载体上的两个基因在转基因后代中是协同表达、分离的,现有的植物遗传转化

技术因为转基因的位点效应,拷贝数差异及多基因整合常使同一基因在不同的转基因植株个体之

收稿日期:2004-10-29

作者简介:康保珊(1979-),女,硕士, kangbaoshan @ sina. com. cn;

*:通讯作者, gsdui@mail. caas. net. cn

基金项目:国家“863 计划”项目(2003AA211050)和“国家转基因植物研究与产业化开发专项”

间的表达出现很大差异^[1-3]。本文通过 Southern 杂交、PCR、ELISA 检测,分析了 8 个不同转基因双价抗虫棉品系中 *Cry1Ac* 基因和 *CpTI* 基因在转基因材料中的整合情况以及二者表达的同步性,为转双价基因的转基因材料筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以本室保存的 8 个由花粉管通道法育成的 R₇ 代的转基因双价抗虫棉品系:sGK321、sGK 中 23、541、916、C18-6、sGNA、3517、1109 为研究材料,所有材料均严格自交。

将各品系棉子脱绒后,28℃浸种,发芽,同一天播种于装有营养土的塑料小钵中,3月6、7日将棉苗统一移栽到温室,在各品系盛蕾期、盛花期、铃期采样。

1.2 载体材料

植物表达载体 pGBI121S4ABC 由本室构建,图谱见文献[4,5]。

1.3 PCR 分析

反应体系为 20 μl, ExTaq(购自 Takara 公司) 2.5 U、10×ExTaq Buffer(Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture(各 2.5 mmol·⁻¹)1.6 μl、上下游引物浓度各 10 μmol·⁻¹ 0.5 μl、模板 10~20 ng。

Cry1Ac 引物序列:5'ggttacactcccatcgacatctcc 3'
5'ccatagggcgaactctgttccgctc 3'

CpTI 引物序列: 5' ggatttgaagcacctcggaagt 3'
5' actcatcatcttcatccctgga 3'

反应程序采用 TD-PCR,94℃变性 45 s,退火 45 s,72℃延伸 45 s。退火温度从 65℃开始每 2 个循环降 2℃到 53℃,然后 50℃退火 18 个循环,最后 72℃延伸 7 min。

1.4 Southern 杂交分析

从 PCR 阳性株中随机选取 3 株进行 Southern 杂交分析。PCR 分别扩增质粒 pG4AB 和 pGC1,回收 1070bp 的 *Cry1Ac* 基因片段和 264bp 的 *CpTI* 基因,利用地高辛随机引物进行探针标记。将样品 DNA 及对照用 *EcoRI* 限制性内切酶完全消化,然后在 0.7%的琼脂糖上电泳,电压 3 v·cm⁻¹。在真空转膜仪上转膜后,按照 Roche 公司试剂盒 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 提供的方法进行预杂交、杂交、洗膜、CSPD 荧光检测,最后在暗室中进行显影、定影。

1.5 蛋白表达量的检测

采用 ELISA 方法^[6]检测 *Cry1Ac*、*CpTI* 蛋白的表达量,一抗为兔多克隆抗体,二抗为羊抗兔抗体,购自中国农业大学作物化控中心。选取 Southern 杂交分析后的单株为样品,每样两孔,重复 3 次。

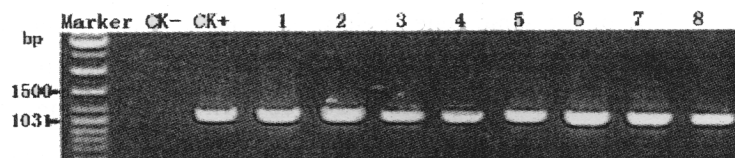


图 1a *Cry1Ac* 基因扩增产物电泳图

Fig. 1a Electrophoresis results of PCR of *Cry1Ac* gene

CK⁻: 非转基因石远 321;CK⁺: 质粒 pG4AB;

1-8:转基因样品依次为: sGK 中 23、541,sGK321、916、C18-6、sGNA、3517、1109

CK⁻:DNA sample of untransformed plant "Shiyuan 321"; CK⁺: plasmid pG4AB

1-8 DNA samples of transformed plants are: sGK CCRI23,541,sGK321,916,C18-6,sGNA,3517,1109

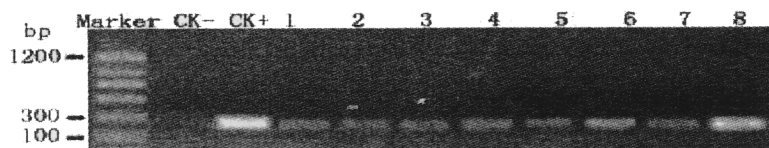


图 1b *CpTI* 基因扩增产物电泳图

Fig. 1b Electrophoresis results of PCR of *CpTI* gene

CK⁻: 非转基因石远 321;CK⁺: 质粒 pGC1;

1-8:转基因样品依次为: sGK 中棉所 23、541,sGK321、916、C18-6、sGNA、3517、1109

CK⁻:DNA sample of untransformed plant "Shiyuan 321"; CK⁺: plasmid pGC1

1-8: DNA samples of transformed plants are: sGK CCRI23,541,sGK321,916,C18-6,sGNA,3517,1109

2 结果与分析

2.1 8 个双价抗虫棉中 *Cry1Ac*、*CpTI* 基因在基因组中的整合

2.1.1 PCR 检测结果。对 8 个不同品系的转基因双价抗虫棉 R7 代材料进行 PCR 检测,预期扩增片段大小 *Cry1Ac* 基因为 1070bp、*CpTI* 基因为 264bp,结果如图 1a、1b 所示,8 个双价转基因

材料均扩增出与预期大小一致的阳性条带,表明两个杀虫基因均已分别整合到 8 个转基因双价抗虫棉的基因组中。

2.1.2 基因整合拷贝数分析。使用双价抗虫基因载体上的单一酶切位点 *EcoRI* 对 8 个转基因双价抗虫棉基因组 DNA 进行完全酶切后, Southern 杂交结果如图 2、3 所示:

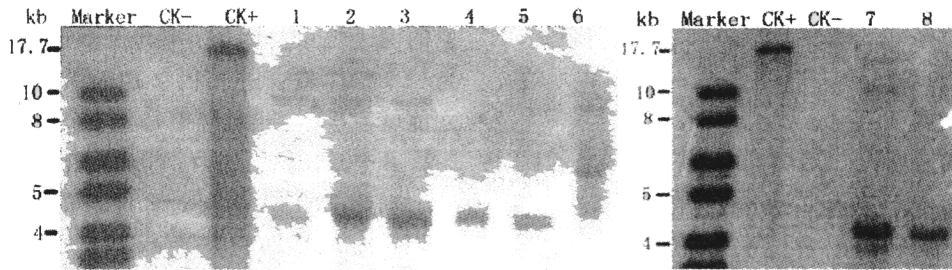


图 2a,b *Cry1Ac* 基因 Southern 杂交图

Fig. 2a,b Southern blotting of *Cry1Ac* gene

CK⁻:非转基因石远 321; CK⁺:质粒 pBI121S4ABC;

1: sGK 中 23; 2: 541; 3: 1109; 4: 916; 5: 3517; 6: sGK321; 7: C18-6; 8:sGNA;

CK⁻:DNA sample of untransformed plant “shiyuan 321”; CK⁺: plasmid pBI121S4ABC;

1: sGK CCRI23; 2: 541; 3: 1109; 4: 916; 5: 3517; 6: sGK321; 7: C18-6; 8:sGNA;

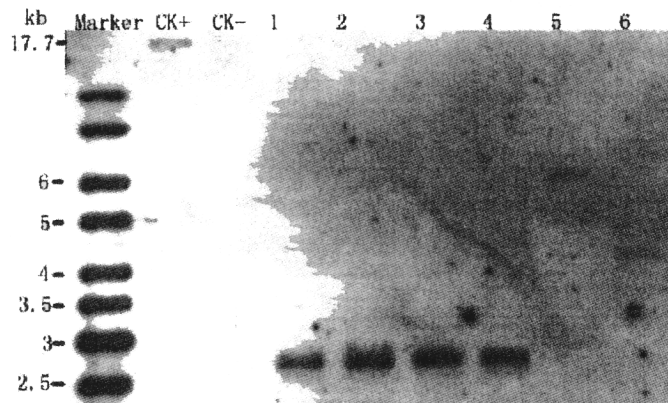


图 3a *CpTI* 基因 Southern 杂交图

Fig. 3a Southern blotting of *CpTI* gene

CK⁻:非转基因石远 321; CK⁺:质粒 pBI121S4ABC;1: sGNA; 2: 541; 3: 1109; 4: 916; 5: sGK321; 6: 3517;

CK⁻:DNA Sample of untransformed plant “shiyuan 321”; CK⁺: plasmid pBI121S4ABC;

1: sGNA; 2: 541; 3: 1109; 4: 916; 5: sGK321; 6: 3517;

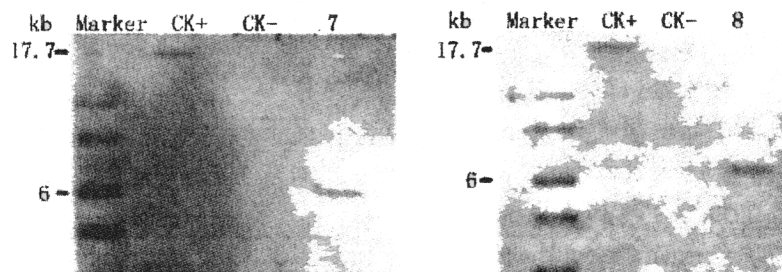


图 3b,c *CpTI* 基因 Southern 杂交图

Fig. 3b,c Southern blotting of *CpTI* gene

CK⁻:非转基因石远 321; C. K⁺:质粒 pBI121S4ABC;7: C18-6; 8:sGK 中 23

CK⁻:DNA sample of untransformed plant “shiyuan 321”; CK⁺: plasmid pBI121S4ABC; 7: C18-6; 8: sGK CCRI 23;

Cry1Ac 基因在 916、3517、sGNA 中为单拷贝,杂交带大小约为 4.7 kb;在 sGK 中 23、541、1109 中为两个拷贝,杂交带大小约为 9kb、4.7kb;在 C18-6、sGK321 中为三个拷贝,但杂交带位置不完全一致,杂交带大小分别为 15kb、9kb、4.7kb;9kb、6kb、4.7kb。CpTI 基因在 8 个品种中都是单拷贝,但杂交带大小不完全相同,sGNA、541、1109、916 杂交带大小大约 2.7kb; sGK 中 23、C18-6、sGK321 大约 6kb; 3517 大约 4.7kb。

上述结果表明:(1)不同品种间同一基因的拷贝数及整合位点不完全一致,说明在由花粉管通道法介导的不同转基因事件中,外源基因的整合状况不完全相同,体现了外源基因在植物基因组中整合机制的复杂性;(2)在 8 个品种的 *Cry1Ac*

基因 Southern Blot 图谱中,均含有一条 4.7 kb 左右的杂交带,说明可能存在外源基因的整合热点;(3)同一品种 *Cry1Ac* 基因和 CpTI 基因的拷贝数及整合位点也不完全一致。除 sGK321 和 3517 外,其余品种 *Cry1Ac* 基因和 CpTI 基因的整合位点均不相同,并且 sGK321 中,两基因也只有一个位点相同,说明串联在双价抗虫基因载体上的两个抗虫基因表达盒,很多情况下并不是作为一个整体整合进入植物基因组的,而是在整合之前就发生了断裂,继而分别进行整合。

2.2 8 个双价抗虫棉中 *Cry1Ac*、CpTI 基因的表达

利用 ELISA 方法对各棉花品种的叶、蕾、花、铃中 *Cry1Ac*、CpTI 蛋白的表达量进行测定,结果见表 1。

表 1 不同品种抗虫棉在不同时期的蛋白表达量

Table 1 Content of *Cry1Ac* and CpTI protein in different positions at different stages

$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$

时 期	部 位	蛋 白	品 种							
			3517	sGK 中 23	541	sGNA	C18-6	sGK321	916	1109
蕾 期	叶	<i>Cry1Ac</i>	0.199	0.112	0.180	1.010	0.196	0.177	0.098	0.189
		CpTI	0.164	0.101	0.122	0.815	0.215	0.137	0.117	0.073
	蕾	<i>Cry1Ac</i>	0.264	0.301	0.297	0.331	0.194	0.265	0.351	0.248
		CpTI	0.253	0.1611	0.231	0.211	0.134	0.193	0.229	0.207
花 期	叶	<i>Cry1Ac</i>	0.027	0.163	0.122	0.001	0.036	0.218	0.138	0.146
		CpTI	0.001	0.189	0.038	0.001	0.001	0.160	0.105	0.123
	花	<i>Cry1Ac</i>	0.034	0.043	0.112	0.046	0.043	0.095	0.047	0.041
		CpTI	0.031	0.014	0.102	0.082	0.065	0.072	0.174	0.043
铃 期	叶	<i>Cry1Ac</i>	0.157	0.002	0.034	0.001	0.138	0.005	0.005	0.144
		CpTI	0.145	0.011	0.105	0.001	0.142	0.0001	0.0012	0.123
	铃	<i>Cry1Ac</i>	0.244	0.001	0.350	0.222	0.352	0.079	0.305	0.340
		CpTI	0.422	0.018	0.450	0.344	0.556	0.109	0.456	0.467

表 1 可知,所检测的 8 个不同转基因双价抗虫棉中,除 3517 在蕾期、花期、铃期的叶、蕾、花中 *Cry1Ac*、CpTI 两种蛋白的表达量基本一致外,其余 7 个品种在同一发育时期的同一组织器官中两种蛋白的表达量均存在明显差异,说明这两个基因在大部分转基因植株中不能完全同步表达。结合前面的 Southern Blot 结果,在 3517 中,*Cry1Ac*、CpTI 基因均为一个拷贝,而且整合位点一致,而其余 7 个品种在两个基因的拷贝数及整合位点上均存在差异。因而可以认为:串联在双价抗虫基因载体上的

两个抗虫基因,在转基因植株中能否实现同步表达,取决于这两个抗虫基因的表达盒是否完全是作为一个整体整合进入植物基因组。很多情况下两个基因表达不同步,可能主要是因为它们并不是作为一个整体整合,而是分别整合,导致整合的位点以及拷贝数均出现差异,而后者又可能导致基因在转录水平以及转录后水平上发生基因表达的差异。

另外,从表 1 的结果也可以看出,在不同的品种中,同一蛋白的表达量以及两种蛋白表达量之间的差异在同一组织部位并不完全相同;

而同一品种中,两种蛋白表达量之间的差异在整个生育期也并不稳定。

3 结论与讨论

一般认为表达盒串联在同一个载体上的两个不同外源基因在同一株转基因材料中是连锁整合并协同表达的^[7]。本研究的结果表明,串联在 pGB1121S4ABC 质粒载体上的两个外源抗虫基因 *Cry1Ac*、*CpTI* 在通过花粉管通道法获得的绝大多数转基因植株中,并非完全连锁整合并协同表达。在整个生育期,两个外源抗虫基因表达量之间的差异并不稳定。

3.1 同一载体上的两个不同外源基因在基因组中的整合

在研究外源基因整合的大量相关文献中,关于花粉管通道介导的转基因植物中外源基因整合分析研究很少。利用 Tail-PCR 方法对不同来源的转基因抗虫棉中外源基因插入区的侧翼序列分析发现,外源基因插入的上游侧翼片段含有残留质粒片段^[8]。在分析单价抗虫棉中杀虫基因的侧翼序列时发现,在杀虫基因的两个拷贝中,至少有一个拷贝的杀虫基因 5'端残留了载体序列,在 3'端有一个拷贝整合了残留载体序列,而另外一个拷贝串联整合了几个外源 DNA 的不完整片段^[9]。这些结果表明,载体 DNA 分子进入植物细胞后,发生随机断裂、拼接后才整合进入基因组,因而串联在同一载体上的两个抗虫基因表达盒,并不一定会连锁整合在同一个位点。这与在基因枪导入获得的转基因水稻研究中提出的直接导入法中外源基因的两步整合机制相符。该机制提出在整合前期,转化的 DNA 分子(或 DNA 片段)先进行正向或反向拼接,形成串联重排的转基因序列,此过程也可能发生截断重排,而此过程无染色体片段的参与;随后在被称作'整合热点'的部位整合到植物基因组上^[10]。本研究的 8 个转基因双价抗虫棉品种中 *Cry1Ac* 基因在 Southern 杂交分析中均出现一条大小约 4.7kb 的杂交带,也说明可能存在于一个外源基因的整合热点。

3.2 同一载体上的两个不同外源基因在植株中的表达

Cry1Ac、*CpTI* 基因杂交图谱在本研究的 8 个转基因双价抗虫棉中不完全一致,有的甚至完全不同,说明二者在很多情况下是分别整合在基因组的位点上,这种整合位点的不一致造成

Cry1Ac、*CpTI* 基因在棉花基因组中以两对独立的基因发生作用,从而导致两个基因在转录水平上可能出现表达差异。其次,转录后水平的基因表达调控也可能造成两个外源基因出现表达差异。当某种 mRNA 超量表达以后,细胞质中可能存在的 mRNA 监控系统就会起作用,将这种超量表达的 mRNA 降解^[11,12]。

两种基因拷贝数的差异可能使蛋白表达量的差异在不同时期发生变化^[13]。重复序列可以诱导外源基因甲基化^[14],而外界环境条件的改变可以使外源 DNA 甲基化程度发生变化,并引起外源基因表达的强烈变化^[15],从而影响蛋白表达差异的稳定性。

参考文献:

- [1] PENG J, Wen F, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27:91-104.
- [2] COOLEY J, Ford T, Christou P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration [J]. *Thero Appl Genet*, 1995, 90:97-104.
- [3] SPENCER T M, O'Brien J V, Start W G, et al. Segregation of transgenes in maize[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18:201-210.
- [4] 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 等. 双价抗虫转基因棉花研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(3): 1-7.
- [5] 郭三堆. *Cry1A* 杀虫基因的人工合成[J]. *中国农业科学*, 1997, 26(2): 85-86.
- [6] 王保民, 何仲佩, 赵继勋. 抗虫棉 Bt 杀虫晶体蛋白免疫检测方法的研究[J]. *棉花学报*, 1998, 10(4): 220-221.
- [7] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为[J]. *植物学报*, 1999, 41(1): 1-5.
- [8] 左开井, 张献龙, 聂以春, 等. 转基因抗虫棉 Bt 基因插入区碱基组成分析[J]. *遗传学报*, 2002, 29(8): 735-740.
- [9] 崔洪志. *vgbM* 基因在植物中的表达及抗虫棉 GK12 中外源基因整合的初步分析[D]. 中国农业科学院, 2004.
- [10] KOHLI A, Leech M, Vain P, et al. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of intergration hot spots[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7203-7208.

- [11] LINDBO J A, Silva-Rosales L, Proebsting W M, et al. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants; implications for regulation of gene expression and virus resistance[J]. *Plant Cell*, 1993, 5:1749-1759.
- [12] 夏兰芹. Bt 杀虫基因在转基因抗虫棉中的表达与遗传稳定性的研究[D], 中国农业科学院, 2000.
- [13] SACHS E S, J H Benedict, D M Stelly, et al. Expression and segregation of genes encoding Cry1A insecticidal proteins in cotton [J]. *Crop Science*, 1998, 38(1): 1-11.
- [14] PERLAK F J, Fuchs R L, Dean D A, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 3324-3328.
- [15] BROER I. Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants [J]. *Field Crops Research*, 1996, 45: 19-25. ●