

影响苏云金芽孢杆菌基因在转基因植物中表达的因素

卢美贞 崔海瑞* 姚艳玲 忻雅

(浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白基因是植物抗虫基因工程中最广泛应用的基因资源。影响 Bt 基因在转基因植物中表达的因素繁多, 阐明这些因素的效应对于获得 Bt 基因在受体植物中的稳定高效表达具有重要意义。现对 Bt 基因表达的主要影响因素, 如 Bt 基因表达单元、植物发育、外部环境条件、受体植物遗传背景、整合位点及 Bt 基因沉默现象等进行了综述。

关键词 转基因植物; Bt 基因表达; 影响因素

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌, 它在芽孢形成时可产生具有杀虫活性的晶体蛋白质^[1], 被称为杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP) 或 δ -内毒素 (δ -endotoxin)^[2]。Schnepf 等^[3]首次成功地克隆了第一个编码 Bt 杀虫晶体蛋白基因, 揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕, 到 2005 年 4 月, 已克隆了 333 个杀虫晶体蛋白基因, 其中 327 个已定名^[4]。大量 Bt 基因的克隆, 为利用转基因技术进行植物品种改良提供了丰富和有效的基因资源, 目前它已成为植物抗虫基因工程中最广泛的抗虫基因。通过各种不同的转化途径, 已把经过密码子优化的 Bt 基因成功地导入玉米、棉花、马铃薯、水稻、烟草、油菜等多种植物^[5], 其中抗虫玉米、棉花、马铃薯、番茄等已实现商品化应用, 2003 年全球种植抗虫转基因作物的面积已达到 1220 万公顷, 占转基因作物总种植面积的 18%^[6]。

了解外源基因在受体植物中的表达特性, 对于提高转基因研究的工作效率和指导转基因植物的合理利用都具有重要的意义。Bt 基因的表达水平高低决定着转基因植物能否应用, 从目前的研究报道来看, Bt 基因在转基因植物中的表达水平受内外多种因素的影响, 它与 Bt 基因本身的结构、受体物种及环境条件等都有很大关系。

1 表达单元及辅助因子

Bt 基因在转基因植物中的表达受多种因子的影响和调节, 其中 Bt 基因本身的 G+C 碱基含量、所用启动子以及其他辅助因子等都会影响其在转基因植物中的表达。

Bt 晶体蛋白基因富含 A+T, 但是典型的植物基因含有较高的 G+C, 这就意味着其密码子的使用跟植物基因有很大的不同, 而富含 A+T 的区域可能发生错误的配对或形成未成熟的 3' 端, 并且 AU 模体可能会使杀虫晶体蛋白基因转录物 (mRNA) 不稳定, 从而导致低效率的翻译^[7]。因此, 对 Bt 基因编码区进行改造则可能提高其在植物中的表达水平。Perlak 等^[8]比较了不同 G+C 含量的 *cry1Ab* 基因的表达水平, 他们将 G+C 含量为 37% 的野生型基因 WT *cry1Ab* 进行密码子优化, 合成了 G+C 含量升高到 49% 的 FM *cry1Ab* 基因, 用 FM *cry1Ab* 转化烟草和番茄后的蛋白质表达量比 WT *cry1Ab* 基因提高了 30~100 倍; 另外 Perlak 等^[9]用 G+C 含量修饰后的 FM *cry1Ab* 基因转化棉花, 发现杀虫晶体蛋白在棉花中的表达量由原来的 0.001% 提高到 0.05%~0.1%; 1993 年, Perlak 等^[10]又将合成的 FM *Cry IV A* 基因导入马铃薯, 表达水平由原来的 0.001% 提高到 0.05%~0.3%, 增加 50~300 倍。Cheng 等^[11]报道, 当把修饰后的 *cry1Ab* 基因 (G+C 含量提高到 47%) 导入水稻后, *cry1Ab* 基因的表达水平有很大提高, 表达量是同类报道的 10~100 倍。Gleave 等^[12]也报道, 野生型 Bt 基因 *cry9Aa2T* 在马铃薯中的表达水平很低, 而对编码区改造后的表达水平显著提高。由上所述可见, 在开展植物遗传转化之前, 对外源 Bt 基因进行密码子优化, 即在遵循密码子简并性的前提下, 增加 Bt 基因中 G+C 碱基含量, 可以提高其表

收稿日期: 2004-11-03 接受日期: 2005-05-17

国家自然科学基金资助项目 (No.30270273)

* 通讯作者。Tel: 0571-86971405, Fax: 0571-86971202, E-mail:

hrcui@zju.edu.cn

表1 目前在植物抗虫基因工程中常用的启动子

启动子	来源	表达特性	基因举例	植物举例
CaMV35S	花椰菜花叶病毒 35SrRNA	组成型	大部分 Bt 基因	大多数
MPS	玉米花粉	花粉	<i>cry1Ab</i>	玉米、水稻
MT-L	玉米类金属硫蛋白	根部优先	<i>cry1Ab</i>	玉米、水稻
PEPC	玉米烯醇丙酮磷酸羧酶	绿色组织	<i>cry1Ab</i>	玉米、水稻
PR-1a	烟草发病相关蛋白 1a	化学诱导	<i>cry1Ab</i>	烟草
Prn	核糖体 RNA 操纵子	叶绿体	<i>cry1Ac</i>	烟草
RSs1	水稻蔗糖合成酶	韧皮部	<i>cry1Ab</i>	烟草
OM	农杆菌章鱼碱合成酶基因	组成型	<i>cry1Ac</i>	烟草
rbcL	叶绿体 <i>psbA</i> 基因	叶组织	<i>cry1Ac</i>	烟草
TR(mas)	细菌甘露碱合成酶	组成型	<i>cry1Ab</i>	烟草、马铃薯
Ubi-1	玉米泛素	组成型	<i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i>	水稻

达效率。

在组成外源基因的表达单元中,启动子起着巨大的作用(表1列出了目前在植物抗虫基因工程中常用的一些启动子)。不同的启动子其特性不同,则引导 Bt 基因在不同的组织或器官中表达水平有很大差异。例如, Koziel 等^[13]报道,利用 CaMV35S 驱动的 *cry1Ab* 基因在叶片、根中表达量较高,籽粒略低,而在花药中则检测不到 Cry1Ab 蛋白;用 PEPC/Pollen 为启动子时,现除在叶片中有较高含量的 Cry1Ab 蛋白外,在花药中也检测到 Cry1Ab 蛋白,而在根、茎髓、籽粒中则表达量较低。Cheng 等^[14]报道,以玉米 Ubi 为启动子的 *cry1Ab* 基因,在水稻 R₀ 植株中表达杀虫蛋白量高达可溶性蛋白含量的 1%~3%,比同类报道中用其他启动子引导 *cry1Ab* 基因的表达量高出 10~100 倍,他们认为玉米 Ubi 启动子更适宜水稻等单子叶植物,而 CaMV35S 启动子适合于烟草等双子叶植物。因此,根据不同的植物和 Bt 基因选用不同的启动子,也是提高 Bt 基因在转基因植物中表达水平的一个有效手段。

一些 Bt 杀虫蛋白晶体的形成需要某些辅助蛋白的参与,在构建转化载体时加入这些辅助因子则可以提高 Bt 基因的表达水平。汤慕瑾等^[14]报道辅助蛋白 P20 对 *cry1Ab* 基因的表达和晶体形成均有帮助,提高了 Cry1Ab 蛋白的表达量,并使其晶体增大。除了 P20 在杀虫晶体蛋白表达中起着分子伴侣的作用外,苏云金杆菌中许多辅助蛋白对杀虫晶体蛋白的表达都有促进作用^[15,16]。

另外,其他非启动子元件对于外源基因在转基因植物中的表达调控也起着重要的作用,包括调节转录终止效率、转录产物稳定性、转录后修饰以及翻译效率等多种元件,即终止子对转录的调控、5'、3' 端序列对外源基因转录后的调控、5' 末端帽

子序列的调控、5' 端先导序列的调控、Poly(A) 及其信号序列的调控、mRNA 不稳定序列的调控、内含子对外源基因的表达调控以及信号肽转化外源基因翻译产物的调控作用^[17]。

2 植物发育

通过对 Bt 基因在转基因植物中的表达特性研究,人们发现其表达水平随生长发育时期及组织或器官的不同而表现出一定的差异^[18]。Bt 基因表达水平具有时空特异性,表明其表达受发育调控。

在不同转基因植物中, Bt 基因表达随生育进程的变化趋势不同。在棉花中, Bt 基因的表达水平的变化基本是随着生育期进程的推进而呈现下降趋势,即在生长期前期,植株生理活动旺盛,蛋白质表达量高,杀虫蛋白的含量也随之增加,到了中、后期,杀虫蛋白的含量急剧下降。例如,李汝忠等^[19]报道,杀虫蛋白的含量表现为:蕾期 > 4 叶期 > 苗期 > 花期 > 铃期 > 絮期,蕾期 Bt 蛋白含量占可溶性蛋白的 0.147%,而絮期 Bt 蛋白含量只有 0.073%; Wu 等^[20]对转 *cry1Ab* 基因水稻的测定结果则显示,叶片中杀虫蛋白含量在孕穗期最高,抽穗期最低,随生育进程的表现趋势为:孕穗期 > 分蘖期 > 成熟期 > 苗期 > 抽穗期。

不同组织或器官中, Bt 蛋白表达量也存在着差异。在棉花花铃盛期,以幼叶和幼蕾的 Bt 蛋白含量最高,而组织老化后的器官中含量较低,表现为幼叶、幼蕾 > 幼铃、功能叶、花 > 老叶^[19]。而在水稻中,各部位 Cry1Ab 蛋白含量也不同,抽穗期茎中 Cry1Ab 蛋白含量最高,根中最低;其他器官中 Cry1Ab 蛋白含量表现为谷壳 > 叶鞘、叶,成熟期各器官中的表达水平依次为茎 > 叶鞘、叶 > 谷壳 > 根 > 子粒^[20]。

3 外部环境条件

Bt 基因在受体细胞中的表达水平还受外界因素的影响，如土壤肥力、水分、光照、温度等。尤其是当外源基因处于诱导型启动子的控制时，这种影响更为突出。

Sachs 等^[21]发现环境因子对 *cry1A* 基因的表达有很大的影响，不同年份、不同地点种植的转 *cry1A* 基因棉花叶片中 *Cry1A* 蛋白含量差异显著。我们实验室也观察到，自然环境条件下种植的转 *cry1Ab* 基因水稻株系，在不同年份间的各自叶片中 *Cry1Ab* 蛋白表达量相差近 10 倍(吴刚，浙江大学博士学位论文，2000)。以上两例研究中所用的启动子分别为 *CaMV35S* 和玉米泛素，尽管都是组成型，但在不同自然环境条件下它们各自引导的 Bt 基因表达量都显示出较大的差异，显然这种差异是环境因素，如光照、温度等环境因子的不同所致。因此，在不同年份、地点种植转 Bt 基因植物时，应根据各自独特的自然环境条件，采取相应的监控措施和制订不同防治或综合治理措施，以使转 Bt 基因作物能够合理利用。

水肥条件对 Bt 基因的表达也有明显的影响。王家宝等^[22]报道，追肥对启动子 *CaMV35S* 引导的 Bt 基因表达影响较大，增施氮肥可以促进棉花的营养生长，因而可提高蛋白质的合成速率；积水后各器官 Bt 蛋白的含量降低，干旱对转基因棉 Bt 蛋白表达的抑制比积水更严重。

Takimoto 等^[23]证实玉米泛素启动子的表达不受系统调节，而是受独立的对热击或物理胁迫产生反应的细胞调节，在受胁迫情况下，该启动子会改变它的特异性表达。我们实验室也曾分析过温度和辐照对玉米泛素启动子引导的 *cry1Ab* 基因表达的影响，转基因水稻中 *cry1Ab* 基因的表达受温度影响较大，且各部位受温度影响的程度都不一样，所表现出的变化趋势也不大一致。在根中，35 °C 时表达量为最高，在 40 °C 时表达量为最低；在茎中，随着温度的升高，*Cry1Ab* 蛋白含量呈现出下降的趋势；在叶片中，25 °C 时 *cry1Ab* 基因的表达量为最高，在 30 °C 与 35 °C 时表达量为最低。^[60Co]- γ 射线辐照对 *cry1Ab* 基因表达也有一定的影响， M_1 代辐照样表现表现出 *cry1Ab* 基因表达量下降趋势，辐照样与对照之间差异显著，同样在 M_2 代转基因水稻中，随着辐照剂量的增加，转基因水稻叶片中 *Cry1Ab* 蛋白含量有下降趋势(吴刚，浙江大学博士学位论文，

2000)。

4 受体植物的遗传背景

受体遗传背景也是影响 Bt 基因在转基因植物中表达水平的一个重要因素。这主要表现在以下两个方面。首先，相同的 Bt 基因导入不同的植物后其表达水平不同。例如，*cry1Ab* 基因分别导入茄子、烟草、马铃薯、西红柿后，其在叶片中的表达量分别占可溶性总蛋白含量的 0.02%、0.01%、0.002%~0.005% 和 0.3%^[24~27]，最高相差近 100 倍。耿军义等^[28]研究了不同陆地棉基因型品系(种)之间抗虫性，观察到部分品系间的抗虫性差异达到极显著水平，说明 Bt 基因在陆地棉不同遗传背景下的表达存在显著差异。其次，在转 Bt 基因植物与常规品种的不同杂交或回交后代中，Bt 基因的表达水平不同。刘宗华等^[29]在研究不同回交世代转基因玉米抗虫性鉴定中报道，同一材料采用不同的回交方式进行选育，其后代抗虫性有很大的差异，以抗虫株做母本进行正向回交明显优于以抗虫株做父本进行的反向回交。刘海涛等^[30]对抗虫杂交棉 F_1 代与亲本 Bt 蛋白表达量进行了比较，结果表明抗虫亲本的 Bt 蛋白表达量明显高于杂种 F_1 代。以上各报道的结果说明，受体的遗传背景影响着 Bt 基因的表达，Scott 等^[31]认为这种表达水平的差异是由上位性及无性系变异引起的。

5 Bt 基因在受体细胞染色体上的插入位点

在不同的插入位点，Bt 基因的表达受到插入位点及其周围序列的影响。当 Bt 基因插入到转录活跃区域，Bt 基因就会顺应该区域的染色质结构，因而可能进行高水平转录；相反，如果 Bt 基因插入到转录不活跃区，如异染色质区，Bt 基因也会融入到这种染色质结构，只能进行低水平转录或发生基因沉默。Bt 基因整合到染色体 DNA 或整合到叶绿体 DNA，其表达水平也不相同。McBride 等^[32]报道将未经修饰的 Bt 基因整合到烟草叶绿体中，并获得了高水平的表达，其 Bt 毒素蛋白表达量占可溶性蛋白总量的 3%~5%。张中林等^[33]也报道了将 Bt 基因成功转入高等植物叶绿体中并获得表达，并认为由于叶绿体基因组的分子量较小，结构相对简单，决定了 Bt 基因可通过同源重组的方式，定点整合入质体基因组中，有利于控制 Bt 基因的表达，而且 Bt 蛋白表达量也较高。林良斌等^[34]认为当 Bt 基因整合到

与生长发育有关的基因附近, Bt 基因的表达就会受生长发育基因调控序列的调控, 随着生长时期的不同而发生变化。

6 转基因植物中 Bt 基因的沉默

自 Peerbolte 等^[35]首次报道转基因烟草中转基因发生沉默以来, 转基因沉默的例子屡见不鲜。导致转基因沉默有多种机制, 并且各种机制都涉及到核酸(DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA)间的相互作用, 形成了相互影响、相互制约的复杂的调控机制。从所报道的转基因沉默例子来看, 几乎所有的转基因沉默现象都与启动子的甲基化有关。

在转 Bt 基因植物的研究中, 也观察到了 Bt 基因的沉默现象。在转 *cry1Ab* 基因水稻 8215 株系后代中, 吴刚等^[36,37]通过 PCR 和分子杂交证实了 *cry1Ab* 基因的存在, 但未检测到 Cry1Ab 毒素蛋白, 进一步分析发现 *cry1Ab* 基因在转录水平上发生沉默, 是由于玉米泛素启动子区域发生了甲基化所造成的, 而这种沉默又可以通过 5- 氮胞苷处理使其有所恢复, 在灌浆期复活率约为 8%~30%。郭旺珍等^[38]利用整合位点不同的转 Bt 抗虫棉品系间互交, 选出 2 对 Bt 基因纯合的抗虫棉品系(含 4 个 Bt 基因), 结果表明并未因为 Bt 基因拷贝数的增加而起到抗性增强的效果, 相反还因转基因间的同源抑制而有所降低, 主要原因可能是相同的目的基因或启动子而造成的同源抑制。基因沉默成为生物遗传工程走向商品化和实用化的严重障碍, 为有效地减少甚至克服转 Bt 基因沉默, 应对这方面开展深入的研究。随着人们对转 Bt 基因沉默机制研究的不断深入, 以及分子生物学和分子育种学科的不断发展, 转 Bt 基因沉默的问题一定能得到很好的控制和解决。

综上所述, Bt 基因在转基因植物中的表达受内、外多种因子的影响和调节, 并且各种因子之间相互作用, 相互影响, 是一个非常复杂的过程。有许多研究表明 Bt 基因在转基因植物中是能稳定表达的, 但是也有报道表明 Bt 基因在转基因植物中低水平表达或发生沉默现象。随着这方面研究工作的广

泛和深入, Bt 抗虫基因工程的工作效率将会进一步提高, 转 Bt 基因植物在农业生产上也将发挥其更大的作用。

参考文献 (References)

- [1] Hannay CL *et al.* *Nature*, 1953, **172**: 1004
- [2] Hannay CL *et al.* *Can J Microbiol*, 1955, **1**: 674
- [3] Schnepf HE *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 2893
- [4] http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/
- [5] 吴刚等. *生物工程进展*, 2000, **20**: 45
- [6] James C. *ISAAA Briefs*, No.30-2003
- [7] van Aarssen R *et al.* *Plant Mol Biol*, 1995, **28**: 513
- [8] Perlak FJ *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 3324
- [9] Perlak FJ *et al.* *Biotechnology(NY)*, 1990, **8**: 939
- [10] Perlak FJ *et al.* *Plant Mol Biol*, 1993, **22**: 313
- [11] Cheng X *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2767
- [12] Gleave AP *et al.* *Mol Breeding*, 1998, **4**: 459
- [13] Koziel MG *et al.* *Bio/technology*, 1993, **11**: 194
- [14] 汤慕瑾等. *生物工程学报*, 2003, **19**: 566
- [15] Crickmore N *et al.* *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 1533
- [16] Ge B *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**: 35
- [17] 王关林等. *植物基因工程原理与技术*, 北京: 科学出版社, 1998, 353
- [18] 王军辉等. *生物技术通报*, 2004, (2): 1
- [19] 李汝忠等. *山东农业科学*, 2002, (2): 7
- [20] Wu G *et al.* *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 727
- [21] Sachs ES *et al.* *Crop Sci*, 1998, **38**: 1
- [22] 王家宝等. *山东农业科学*, 2000, (6): 4
- [23] Takimoto I *et al.* *Plant Mol Biol*, 1994, **26**: 1007
- [24] Kumar PA *et al.* *Mol Breeding*, 1998, **4**: 33
- [25] Carozzi NB *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992, **20**: 539
- [26] Gulina IV *et al.* *Mol Biol(Mosk)*, 1994, **28**: 1166
- [27] Carozzi N *et al.* *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, London: Taylor & Francis, 1997, 21
- [28] 耿军义等. *棉花学报*, 2003, **15**: 8
- [29] 刘宗华等. *中国农业科学*, 2000, **33**(增刊): 152
- [30] 刘海涛等. *棉花学报*, 2000, **12**: 261
- [31] Scott A *et al.* *Mol Breeding*, 1998, **4**: 479
- [32] McBride KE *et al.* *Biotechnology (NY)*, 1995, **13**: 362
- [33] 张中林等. *遗传学报*, 2000, **27**: 270
- [34] 林良斌等. *作物学报*, 2002, **28**: 175
- [35] Peerbolte R *et al.* *Plant Mol Biol (Historical Archive)*, 1986, **7**: 285
- [36] 吴刚等. *生物技术*, 2000, **10**: 27
- [37] 吴刚等. *中国科学*, 2001, **31**: 487
- [38] 郭旺珍等. *遗传学报*, 2001, **28**: 668

Factors Affecting Expression of *Bacillus thuringiensis* Genes in Transgenic Plants

Mei-Zhen Lu, Hai-Rui Cui*, Yan-Ling Yao, Ya Xin

(Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt) is the most widely used resource in plant engineering for insect resistance to date. There are many factors affecting Bt gene expression, elucidating their effects is important to acquire stable and high expression of Bt gene in transgenic plants. Effects of main factors on Bt gene expression, such as the expression cassette of Bt gene, plant development, external environmental conditions, genetic background of receptors and integration site in plant genome, and Bt gene silence were reviewed in the paper.

Key words transgenic plants; Bt gene expression; affecting factors

Received: November 3, 2004 Accepted: May 17, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270273)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971405, Fax: 86-571-86971202, E-mail: hrcui@zju.edu.cn