

Bt 基因甜菜叶绿体转化载体构建及毒蛋白表达

崔杰^{1,2} 杨谦^{2*} 徐德昌¹

(¹ 哈尔滨工业大学糖业研究院, 哈尔滨 150086; ² 哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 哈尔滨 150001)

摘要 利用植物叶绿体基因组在进化中高度保守的特点, 根据烟草、菠菜、水稻叶绿体基因组全序列资料设计合成引物, PCR 扩增并克隆了甜菜叶绿体两个重要功能基因 *rbcL* 和 *atpB* (GenBank 登录号分别为 DQ067450 和 DQ067451), 并以其作为定点整合外源基因的同源重组片段, 构建了 Bt 基因 *CryIAC* 甜菜叶绿体定点转化载体 pSKARBt, 酶切鉴定表明: 所构建载体符合预期设计。对克隆菌菌体总蛋白进行了生物杀虫试验, 结果表明: Bt 基因 *CryIAC* 能够在叶绿体特异性启动子及终止子的调控下表达, 并对二龄末甘蓝夜蛾有很强的毒杀作用。该载体构建对培育甜菜高抗虫品种具有重要应用价值。叶绿体转化及后续工作正在进行中。

关键词 Bt 基因; 甜菜; 叶绿体转化; 载体构建; 杀虫试验

甜菜是我国重要的糖料作物, 近年来, 甜菜虫害非常严重, 尤以鳞翅目、夜蛾科的甘蓝夜蛾 (*Barathra brassicae* Linnaeus) 危害最为突出, 且暴发性虫害的频率不断增加。长期以来, 主要通过化学农药防治害虫, 但效果并不理想。如何培育高抗虫甜菜品种已成为一项重要研究课题。将抗虫基因导入甜菜核基因组中已有报道^[1], 但细胞核转化由于外源基因是随机插入, 存在着表达量低、表达不稳定的问题, 达不到预期目的; 且细胞核转化还存在外源基因可随花粉漂移的潜在生态风险和会引起严重的环境污染问题^[2-6]。

将外源基因导入叶绿体基因组中可避免上述问题, 已成为植物基因工程研究热点。与核转化相比, 叶绿体遗传转化具有: 外源基因可高效表达、原核基因无需修饰改造、可实现定点整合、母系遗传使外源基因不会随花粉扩散等优点^[7]。目前, 关于 Bt 基因叶绿体遗传转化在模式植物烟草上已有成功报道^[8,9], 所获得的转 Bt 基因烟草具有很强的杀虫效果, 其可溶性蛋白的表达量比核转化株高 20~30 倍。但开展甜菜叶绿体遗传转化研究国际上还没有先例。本研究从未知叶绿体基因组序列的甜菜中克隆了两个重要的功能基因 *rbcL* 和 *atpB*, 并以此作为同源片段, 成功地构建了包含同源片段、Bt 基因 *CryIAC*、筛选标记基因 *aadA* 及调控元件叶绿体特异性启动子 *Prrn* 和终止子 *TpsbA* 在内的甜菜叶绿体表达载体, 原核表达实验证明, Bt 基因 *CryIAC* 能够在叶绿体特异性启动子和终止子的调控下表达, 并

具较高杀虫活性, 为进一步开展甜菜叶绿体遗传转化和获得高抗虫甜菜品种打下了基础, 同时也为开展其他未知叶绿体基因组序列植物的叶绿体遗传转化研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 DH10B、质粒 pBluescript SK(M13) 为本实验室保存, 质粒 pB110 (含 3.5 kb 的 Bt 基因 *CryIAC*) 和 p16APT (含叶绿体特异性启动子 *Prrn* 和终止子 *TpsbA* 及筛选标记基因 *aadA*) 由中国农科院生物技术研究所沈桂芳教授馈赠。

1.1.2 植物材料 糖用甜菜二倍体品系 72-204 由哈尔滨工业大学糖业研究院提供。

1.1.3 工具酶及分子生物学试剂 各种限制性内切酶、修饰酶及 pGEM-T Vector System 等购自 Promega 公司; Vent DNA 聚合酶购自 BioLabs 公司; DNA 回收试剂盒购自原平皓生物技术有限公司; 其他各种试剂均为进口或国产生物级试剂。

1.2 方法

1.2.1 甜菜叶绿体 DNA 的分离纯化 按照崔杰等^[10] 方法操作。

1.2.2 甜菜叶绿体同源片段的克隆与测序 为了

收稿日期: 2005-09-05 接受日期: 2006-01-18

黑龙江省“十五”重大科技攻关计划项目资助 (No. GA01B101-13)

* 通讯作者。Tel: 0451-86412952, E-mail: yangq@hit.edu.cn

实现外源基因定点整合到叶绿体基因组中,用于叶绿体转化的载体质粒在外源基因表达盒两侧需带有受体植物叶绿体基因组中相邻基因做同源重组片段。由于甜菜叶绿体基因组序列未知,因此,利用植物叶绿体基因组在进化中具有高度保守的特点,分析烟草^[11]、水稻^[12]和菠菜^[13]等高等植物叶绿体基因组全序列资料得知:在高等植物叶绿体基因组中 *atpB* 基因和 *rbcL* 基因是紧密连锁的。为确保在外源基因插入后既不引起插入位点基因原有序列丢失,又不破坏原有基因的功能,首先要明确 *atpB-rbcL* 基因间的序列,以间隔区为外源基因插入位点。因此,参照烟草、水稻和菠菜叶绿体基因组全序列资料(GenBank 登录号分别为 NC-001879, NC-001320, NC-002202)中相应区段核苷酸序列,设计合成引物 P1、P2、P3、P4。再根据所获得的甜菜 *atpB-rbcL* 基因间隔区序列设计合成引物 P5 和 P6 (引物位置见图 1):

P1: 5'-tcactcgcagaagttagtaggattg-3' (23 nt)

P2: 5'-gcgatccaacacttgccttag-3' (23 nt)

P3: 5'-taatgtcgcagcatcaatgtcactacc-3' (28 nt)

P5: 5'-gcgggatccgaatcaaaagaactaactaattag-3' (33 nt)

*Bam*HI

P4: 5'-ttagcggccgcacaatatacaggatgggtag-3' (31 nt)

P6: 5'-gccggatccgggggtaagaattagaaacttg-3' (32 nt)

*Bam*HI

以甜菜叶绿体 DNA 为模板,利用上述引物和 Vent DNA 聚合酶分别扩增 *atpB-rbcL* 基因间隔区、*atpB* 基因和 *rbcL* 基因,PCR 扩增条件分别为: *atpB-rbcL* 基因间隔区 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 47 °C 2 min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 3 min。 *atpB* 基因和 *rbcL* 基因 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 53 °C 2 min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经电泳、回收,分别连接到 pGEM-T 载体上,转化大肠杆菌后筛选获得重组子,依次命名为 pTAR、pTA、pTR,酶切鉴定正确后测定插入片段的核苷酸序列。

1.2.3 叶绿体转化载体的构建 用 *Bam*HI、*Xba*I 双酶切质粒 pTA,回收 1.5 kb DNA 片段,与经同

样酶切、回收的载体 pBluescript SK(+)连接,筛选获得重组质粒 pSKA。*Bam*HI、*Eco*RI 双酶切质粒 pTR,回收 1.66 kb DNA 片段,与经同样酶切、回收的 pSKA 连接,筛选获得重组质粒 pSKAR。在质粒 pSKAR 中包含有用做同源片段的甜菜 *rbcL* 基因和 *atpB* 基因片段。

用 *Bam*HI 酶切质粒 pB110, Klenow 酶补平,再用 *Sal*I 酶切后,回收 3.5 kb 的 Bt 基因 CryIAC,插入到载体质粒 p16APT 中 Prrm 启动子的下游 *Hind*III 与 *Sal*I 位点之间,得到包含外源基因表达盒及筛选标记基因表达盒的中间载体 p16APTbt。质粒 p16APTbt 经 *Bam*HI 酶切,回收 5.5 kb 片段,与经同样酶切、回收的载体 pSKAR 连接,最终得到甜菜叶绿体定点转化载体 pSKARbt。

1.2.4 生物杀虫试验 将质粒 pSKARbt 转化大肠杆菌,在含壮观霉素的 LB 液体培养基中培养 24 h 以上,收集菌体,参考田颖川等^[14]和郭三堆等^[15]方法提取菌体总蛋白,每个甜菜叶片涂抹约 1 ml 提取溶液。同时设对照组:取相同量的大肠杆菌菌体蛋白溶液(CK1)及 Tris-HCl 溶液(CK2)分别涂抹甜菜叶片。每个处理饲喂 20 头(分 5 个培养皿,每皿 4 头)二龄末甘蓝夜蛾,重复 3 次,一周内观察昆虫的生长发育及死亡情况。

2 结果

2.1 甜菜叶绿体同源片段 *atpB* 基因和 *rbcL* 基因的克隆、测序与序列分析

2.1.1 *atpB-rbcL* 基因间序列的克隆、测序与序列分析 以 P1 和 P2 为引物,在 Vent DNA 聚合酶作用下,PCR 扩增获得甜菜叶绿体 *atpB-rbcL* 基因间的片段。电泳结果表明:PCR 产物大小约 0.8 kb (图 2A),与预计相符。将该片段克隆到 pGEM-T 载体上,得到重组质粒 pTAR。序列测定结果表明:插入片段长 843 bp (GenBank 登录号 DQ074969),其中 *rbcL* 和 *atpB* 两基因间序列长度为 783 bp,包含 *rbcL* 和 *atpB* 两基因的重要调控序列,如 *rbcL* 基因启动子序列, -35 区(TCGCGC)、-10 区(TACAAT)和 SD 序列(GGAGG); *atpB* 基因启动子序列, -35 区

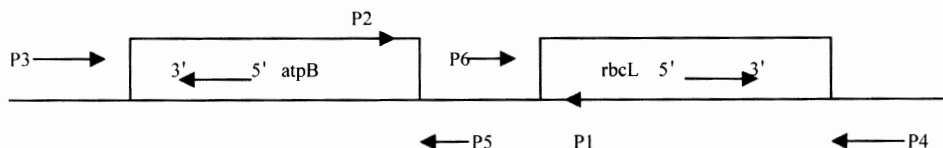


图1 *atpB* 基因和 *rbcL* 基因及 PCR 引物在叶绿体基因组中的相对位置

(TTGACA)、-10区(GTATAT)等, 它们都不同程度地表现出类似原核生物启动子元件的结构特征。在两基因启动子序列-35区之间有一段83 bp的区段适宜外源基因插入。

经 Blast 序列比较揭示, 甜菜 *atpB-rbcL* 基因间片段与菠菜叶绿体基因组相应片段的同源性为 91.32%。分析甜菜与烟草、水稻和菠菜等植物叶绿体基因组中 *atpB-rbcL* 基因间片段的核苷酸序列, 结果显示: 4种植物均含有两基因的启动子元件-35区和-10区, 而且它们的 *atpB* 基因-35区序列及 *rbcL* 基因-10区序列的同源性达到 100%; 而 *atpB* 基因-10区序列烟草为 GTAAAT, 其他 3种植物为 GTATAT, *rbcL* 基因-35区序列甜菜为 TCGCGC, 其他 3种植物为 TTGCGC, 第二位的 C 被 T 取代。

2.1.2 *rbcL* 基因和 *atpB* 基因的克隆、测序与序列分析 以 P3 和 P5 为引物, 在 Vent DNA 聚合酶作用下, PCR 扩增获得甜菜 *atpB* 基因, 电泳结果表明: PCR 产物大小约 2.3 kb (图 2B), 与预计相符。将该片段克隆到 pGEM-T 载体上, 得到重组质粒 pTA。序列测定结果表明: 插入片段的长度为 2 293 bp (GenBank 登录号 DQ067451), 它包含着一个 1 497 bp 的 *atpB* 完整基因编码区, 推测编码 498 个氨基酸。Blast 序列同源性比较, 甜菜 *atpB* 基因与烟草、菠菜、水稻、玉米等的 *atpB* 基因核苷酸同源性分别为 90.92%、95.79%、86.37%、85.69%, 氨基酸同源性分别为 94.58%、97.19%、91.97%、91.37%。

以 P4 和 P6 为引物, 在 Vent DNA 聚合酶作用下, PCR 扩增获得甜菜 *rbcL* 基因, 电泳结果表明: PCR 产物大小约 2.0 kb (图 2C), 与预计相符。将该片段克隆到 pGEM-T 载体上, 得到重组质粒 pTR。

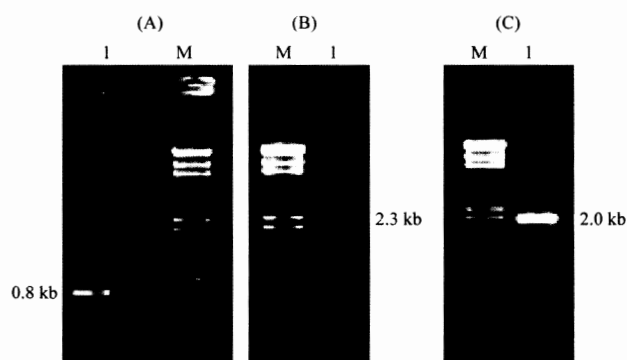


图 2 甜菜叶绿体同源片段 PCR 扩增产物电泳图

A: *atpB-rbcL* 基因间隔区; B: *atpB* 基因; C: *rbcL* 基因; M: λ DNA/*Hind*III, 1: PCR 产物。

序列测定结果表明: 插入片段的长度为 2 023 bp (GenBank 登录号 DQ067450), 它包含着一个 1 425 bp 的 *rbcL* 完整基因编码区, 推测编码 475 个氨基酸。同源性比较发现, 甜菜 *rbcL* 基因与烟草、菠菜、水稻、玉米等的 *rbcL* 基因核苷酸同源性分别为 90.38%、96.45%、86.21%、86.51%, 氨基酸同源性分别为 93.29%、98.11%、91.61%、92.26%。

2.2 叶绿体转化载体的构建

分别从质粒 pTA 和 pTR 上切下甜菜 *atpB* 基因和 *rbcL* 基因片段, 回收后, 依次克隆到载体 pBluescript SK(+)上, 获得重组质粒 pSKAR。由于 PCR 产物的 5' 端引入了 *Bam*HI 酶切位点, 因此, 在质粒 pSKAR 中两基因片段之间包含有一个 *Bam*HI 单酶切位点。

*Bam*HI 酶切质粒 pB110 后, 补平, 再用 *Sal*I 酶切, 回收 3.5 kb 的片段, 与经 *Hind*III、*Sal*I 双酶切的质粒 p16APT 连接, 得到重组质粒 p16APTbt。p16APTbt 经 *Bam*HI 酶切, 回收 5.5 kb 片段(包含 Bt 基因表达盒及筛选标记 *aadA* 基因表达盒)克隆到质粒 pSKAR 的 *Bam*HI 酶切位点上, 最终得到正反两个方向连接的叶绿体转化载体, 分别命名为 pSKARbt-Z 和 pSKARbt-F, 其结构如图 3 所示。酶

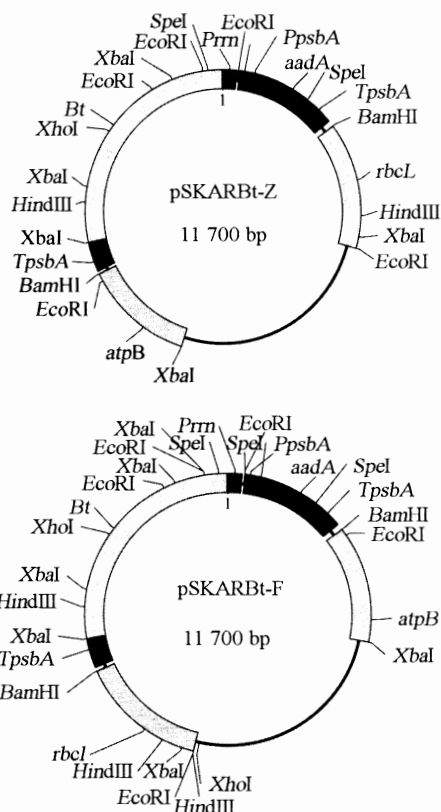


图 3 Bt 基因叶绿体转化载体 pSKARbt-Z 和 pSKARbt-F 的结构图

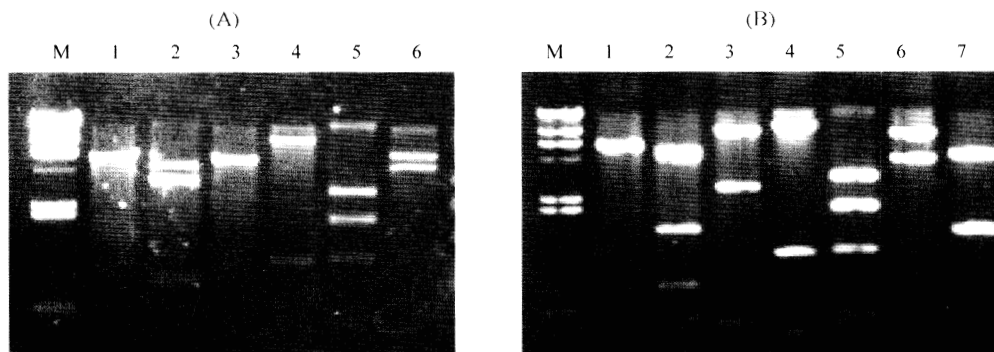


图4 叶绿体转化载体 pSKARBt-Z (A)和 pSKARBt-F (B)的酶切鉴定

M: λ DNA/*Hind*III; 1: *Bam*HI; 2: *Eco*RI; 3: *Hind*III; 4: *Spe*I; 5: *Xba*I; 6: *Xho*I; 7: *Bam*HI/*Not*I。

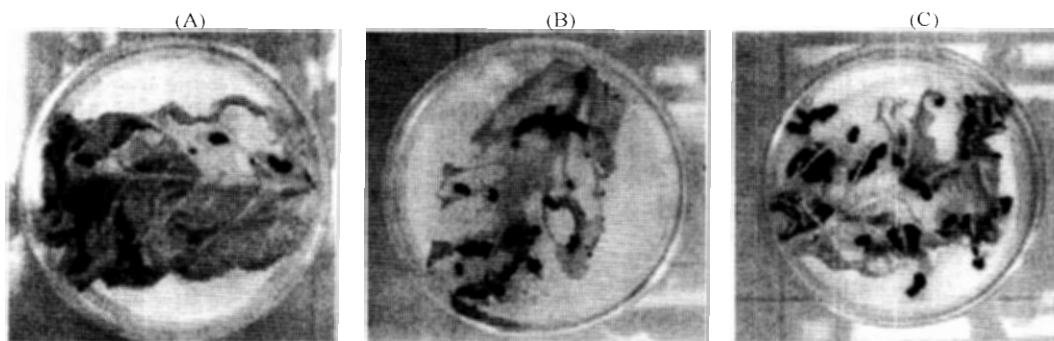


图5 生物杀虫实验鉴定结果(4天后)

A: Bt 菌株; B: 对照组 CK1; C: 对照组 CK2。

表1 甜菜叶绿体转化载体克隆菌体蛋白对甘蓝夜蛾的毒力测验

不同处理	试虫总数	死亡数	平均死亡率(%)	每天每头平均增重(g)
Bt 菌株蛋白	60	54	90	0.044
CK1 (DH10B 菌株蛋白)	60	0	0	0.081
CK2 (Tris-HCl)	60	3	5	0.075

CK1、CK2 为对照。

切鉴定表明: 该载体构建正确, 与预期设计相符, 酶切鉴定图谱如图4所示。

2.3 生物杀虫试验

每个甜菜叶片涂抹约1 ml含pSKARBt的大肠杆菌菌体蛋白溶液, 以不含pSKARBt的大肠杆菌菌体蛋白溶液及Tris-HCl溶液涂抹的甜菜叶片做对照(CK1和CK2), 分别饲喂二龄末期的甘蓝夜蛾, 观察一周。结果表明: 对照组的试虫生长健壮, 个体大, 粪便多, 试虫很少死亡或不死亡(CK1组没有死亡, CK2组有3头试虫死亡), 且叶片大部分被咬食; 而试验组的试虫生长缓慢, 第4天试虫已绝大部分死亡(达80%以上)(表1, 图5)。试验结果表明: 含重组质粒pSKARBt的大肠杆菌菌体蛋白对二龄末的甘蓝夜蛾具有很高的杀虫活性, Bt基因CryIAc能够在叶绿体特异性启动子和终止子的调控

下在大肠杆菌中得到表达, 其产物具备杀虫活性。

3 讨论

高等植物叶绿体转化工作大多由美国新泽西州立大学的Maliga实验室完成^[8,16-20], 中国农业科学院生物技术研究所沈桂芳教授实验室也做了大量工作^[10,21-23]。但到目前为止, 高等植物的叶绿体转化研究还多集中于模式植物烟草上。在这些研究中, 用于外源基因定点插入的同源片段主要为*rbcL-ORF512(accD)*^[9,17,24], 也有人选择*trnV-rps12*^[8,25]或*psbA-trnK*^[23]作为外源基因整合位点, 以及选择16S[25,26]或[27]等的基因间隔区作为外源基因整合位点。而本研究与以往不同, 是从未知叶绿体基因组序列的甜菜中克隆了两个重要功能基因atpB和*rbcL*, 并以此作为同源片段, 构建了Bt基

因甜菜叶绿体转化载体, 转化甜菜。研究结果表明: *atpB* 基因和 *rbcL* 基因在甜菜叶绿体基因组中同样是相邻基因, 以此作同源片段可行。目前, 本实验室已利用该载体获得了一批抗壮观霉素的甜菜转基因再生植株, 植株水平上进一步的检测工作正在进行。由于多种植物的叶绿体基因组全序列是未知的, 不易获得来自宿主的同源片段, 而使得叶绿体转化技术的广泛应用受到制约。本研究可为未知叶绿体基因组序列植物进行叶绿体转化提供参考。

诸多研究表明: 原核基因与真核表达体系之间不能很好的兼容, 需修饰改造。将未经修饰的原核基因直接定位到叶绿体基因组中, 利用叶绿体基因组转录与翻译系统的原核特性可以很好的解决兼容性问题。我们的研究证明也了这一点。

在完成本研究过程中得到中国农业科学院生物技术研究所沈桂芳教授、张志芳博士、李轶女老师的帮助, 在此表示感谢!

参考文献 (References)

- [1] 岛本義也等。てん菜研究会報, 1999, **41**: 90
- [2] Losey JE *et al.* *Nature*, 1999, **399**: 214
- [3] Wofenbarger LL *et al.* *Science*, 2000, **290**: 2088
- [4] 贾士荣。生物技术通报, 1999, **15**(6): 1
- [5] 钱迎倩等。植物生态学报, 1998, **22**: 289
- [6] 叶庆富。核农学报, 2003, **17**: 313
- [7] 侯丙凯等。生物工程进展, 2000, **20**: 70
- [8] McBride KE *et al.* *Biotechnology(NY)*, 1995, **13**: 362
- [9] Kota M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1840
- [10] 崔杰等。中国糖料, 2005, (3): 29
- [11] Shinozaki K *et al.* *EMBO J*, 1986, **5**: 2043
- [12] Hiratsuka J *et al.* *Mol Gen Genet*, 1989, **217**: 185
- [13] Schmitz-Linneweber C *et al.* *Plant Mol Biol*, 2001, **45**: 307
- [14] 田颖川等。生物工程学报, 1989, **5**: 11
- [15] 郭三堆等。生物工程学报, 1991, **7**: 54
- [16] Carrer H *et al.* *Mol Gen Genet*, 1993, **241**: 49
- [17] Svab Z *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 913
- [18] Zoubenko OV *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 3819
- [19] Lutz KA *et al.* *Plant J*, 2004, **37**: 906
- [20] Tregoning JS *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 1174
- [21] 邹竹荣等。作物学报, 1998, **24**: 410
- [22] 张中林等。植物学报, 1999, **41**: 947
- [23] 张中林等。遗传学报, 2000, **27**: 270
- [24] Daniell H *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 345
- [25] Sikdar SR. *Plant Cell Reports*, 1998, **18**: 20
- [26] Staub JM *et al.* *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 333
- [27] De Cosa B *et al.* *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 71

Vector Construction with Bt Gene for Sugar Beet Chloroplast Transformation and Expression Toxin-protein

Jie Cui^{1,2}, Qian Yang^{2*}, De-Chang Xu¹

(¹Faculty of Sugar Beet and Sugar Industry, Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, China; ²Department of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract Based on the high conservation of plant chloroplast genomes in evolution, the PCR primers were designed and synthesized according to the corresponding sequences in the chloroplast genomes of *Nicotiana tabacum*, *Spinacia* and *Oryza sativa* for amplifying and cloning two important chloroplast genes from sugar beet, *rbcL* gene and *atpB* gene (with accessory No. as DQ067450 and DQ067451 in GenBank respectively) as homologous recombination fragments to direct targeted foreign genes into the chloroplast genome. Constructed vector of Bt gene CryIac for sugar beet chloroplast transformation. The constructed vector contain homologous recombination fragments, Bt gene CryIac, *aadA* gene, strong chloroplast promoter Prn and TpsbA. The results of restriction enzyme analysis were in accord with the desired. Bioassays using crude expressed products from host strain of the vector showed that Bt CryIac gene was expressed and its products were strongly toxic to larvae of *Barathra brassicae*. The chloroplast transformation vector will be useful value for sugar beet chloroplast genetic transformation and the insect resistant crop improvement. Transformation and consequent works are in progress.

Key words Bt gene; sugar beet; chloroplast transformation; vector construction; insecticidal activity

Received: September 5, 2005 Accepted: January 18, 2006

This work was supported by the Key Science and Technology Foundation of Heilongjiang Province during the 10th Five-Year Plan Period (No.GA01B101-13)

*Corresponding author. Tel: 86-451-86412952, E-mail: yangq@hit.edu.cn