

转基因 *cry1Ab* 在高粱不同器官中的表达水平

卢美贞 崔海瑞* 邵言甲 周 阳 姚艳玲 金基强

(浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要 用 Cry1Ab/Cry1Ac 板式试剂盒测定了 Cry1Ab 蛋白在转基因高粱不同器官中的表达水平。结果表明, 不同组织器官的 Cry1Ab 蛋白含量有明显差异, 其顺序为叶鞘>叶>颖壳>籽粒>根>茎髓, 在花药中则检测不到; 不同部位的叶片、叶鞘和茎髓的 Cry1Ab 蛋白含量也有较大差异, 中部叶的 Cry1Ab 蛋白含量高于上部叶和基部叶, 叶鞘中是中部>基部>上部, 茎髓中则表现为基部最高。

关键词 转基因高粱; 不同器官; *cry1Ab* 基因; 表达水平

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)在芽孢形成时可产生具有杀虫活性的晶体蛋白^[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转基因植物的序幕, 到 2006 年 3 月 29 日, 已克隆了 362 个杀虫晶体蛋白基因, 其中 356 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应用最广泛的抗虫基因。

高粱的害虫种类众多, 如玉米螟、高粱条螟、桃蛀螟、栗穗螟等螟虫对茎、叶和穗的危害严重, 影响着产量与品质, 培育抗虫品种是防治这类害虫最为经济有效的方法, 但目前高粱中抗螟虫资源贫乏^[5], 难以通过常规育种培育出抗螟虫的品种。转基因技术的发展为解决这一问题提供了一条新途径。我们实验室首次成功地将来自 Bt 密码子优化的以玉米泛素(ubiquitin, Ubi)为启动子的 *cry1Ab* 抗虫基因转入高粱中^[6], 并经农业部批准进入中间试验阶段(农基安办字 2003-T005、农基安办字 2004-T106)。转 *cry1Ab* 基因高粱的获得为这一作物的品种改良提供了抗虫资源。为有效和合理地利用这一资源, 有必要了解 *cry1Ab* 基因在高粱中的表达情况。本实验以转 *cry1Ab* 基因高粱 SR16-2 和 SR24-2 为材料, 研究了 *cry1Ab* 基因在高粱不同器官中的表达特性。

1.1 材料

本实验所用的材料为高粱恢复系 115R 及其转入 *cry1Ab* 基因的 2 个已到 R₅ 代的稳定转基因株系, 这 2 个株系编号分别为 SR16-2 和 SR24-2, 来源于 2 个独立遗传的转化植株, 采用农杆菌介导法培育而成^[6]。

1.2 采样与 Cry1Ab 蛋白的测定

在开花前剥取尚未散粉的花药, 在灌浆后期分别取颖壳、籽粒、根和不同部位的叶片、叶鞘、茎髓。对以上所取样品洗净后称重, 在液氮中磨成粉状, 放入离心管中, 按 4 μ l/mg 的比例加入适量蛋白质提取缓冲液(试剂盒随带), 充分混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 浸提 3 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 上清液或其稀释液即可用于测定。

将 100 μ l 样品提取液加入到已包埋好抗体的 96 孔板中, 同时加入不同浓度(0、0.5、2.5、5.0 ng/ml)的 Cry1Ab 蛋白标准溶液, 按 Cry1Ab/Cry1Ac 板式试剂盒(美国 ENVIROLOGIX 公司)提供的方法进行测定, 最后根据酶标仪(SpectronMax190, 德国)在波长为 450 nm 下 A 的读数, 参照标准曲线和提取液稀释倍数计算出各器官组织的 Cry1Ab 蛋白含量, 并以每克样品中所含的 Cry1Ab 蛋白含量表示 (ng/g), 测定时设 3 次重复。

2 结果

2.1 不同器官中的 Cry1Ab 蛋白含量

收稿日期: 2005-11-09 接受日期: 2006-04-12

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

1 材料与方法

灌浆后期, 在 SR16-2 和 SR24-2 的叶、叶鞘、颖壳、根、茎髓和籽粒中均能检测到 *Cry1Ab* 蛋白, 但在花药中却检测不到。不同器官中的 *Cry1Ab* 蛋白含量差异较大, 含量最高的器官是叶鞘, 2 个株系平均为 2.12 ng/g; 最低的是茎髓, 只有叶鞘的 1/8 左右(0.26 ng/g); 其他各器官中的 *Cry1Ab* 蛋白含量介于前二者之间。所用的 2 个株系在不同器官中的 *Cry1Ab* 蛋白含量表现出相同趋势: 叶鞘>叶>颖壳>籽粒>根>茎髓(图 1)。

2.2 不同部位叶片中的 *Cry1Ab* 蛋白含量

在灌浆后期, 不同部位叶片的 *Cry1Ab* 蛋白含量也有很大差异(图 2), 以基部第 1 叶的 *Cry1Ab* 蛋白含量最低(0.78 ng/g), 中部第 7 叶最高(2.24 ng/g)。从 2 个株系的平均结果来看, 中部叶(L5~L8)的 *Cry1Ab* 蛋白含量较高(1.91 ng/g), 基部叶(L1~L4)与上部叶(L9~L12)的含量相近, 分别为 1.27 ng/g 和 1.31 ng/g。

2.3 不同部位叶鞘和茎髓的 *Cry1Ab* 蛋白含量

不同部位的叶鞘和茎髓在灌浆后期的 *Cry1Ab* 蛋白含量也存在明显的差异(图 3)。测定结果表明, 中部叶鞘(由下而上 5~8 叶鞘)中的 *Cry1Ab* 蛋白含量最高, 与不同部位叶片中的 *Cry1Ab* 蛋白含量表现出相近的趋势, 基部叶鞘(1~4 叶鞘)中的含量则比上部叶鞘(9~12 叶鞘)稍高。而在不同部位的茎髓中, 以基部茎髓(1~4 节茎髓)的 *Cry1Ab* 蛋白含量较高, 中部次之, 而上部茎髓中的 *Cry1Ab* 蛋白含量最低, 只有基部茎髓 *Cry1Ab* 蛋白含量的 1/5, 表现趋势与叶片及叶鞘明显不同。

3 讨论

Bt 基因的表达水平高低决定着转基因植物对靶标害虫的抗性程度, 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既受环境因素的影响, 又具有组织特异性^[7]。Kozziel 等^[8]报道, 在田间条件下, 转基因 *cry1Ab* 在玉米叶片、茎髓及根中表达量较高, 在籽粒中也有一定量的表达, 而在花药中则检测不到 *Cry1Ab* 蛋白。李汝忠等^[9]报道, 在棉花花铃盛期各器官的 *Cry1Ab* 蛋白含量表现为幼叶、幼蕾>幼铃、功能叶、花>老叶。而吴刚等^[10]对转 *cry1Ab* 基因水稻各器官在成熟期的测定结果则显示, 茎>叶鞘、叶>谷壳>根>籽粒。本实验中 *cry1Ab* 基因在转基因高粱各组织器官中除花药外均得到了表达, 但表达量存在较大的差异, 表现趋

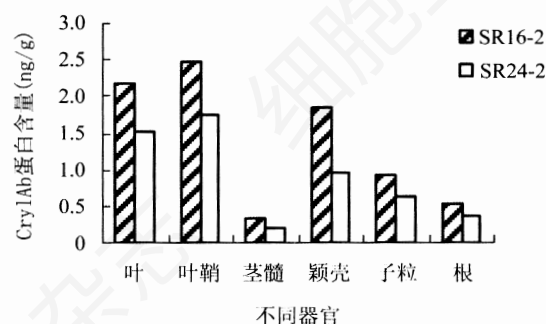


图 1 灌浆后期转基因高粱不同器官 *Cry1Ab* 蛋白含量

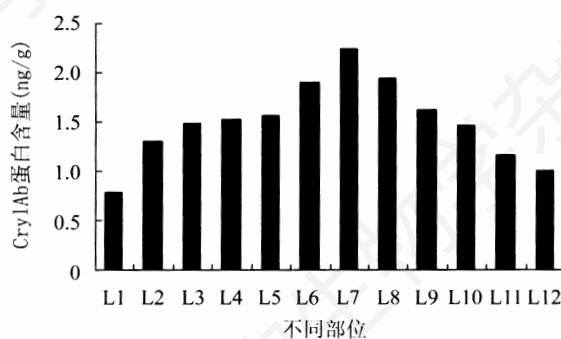


图 2 灌浆后期转基因高粱不同部位叶片 *Cry1Ab* 蛋白含量

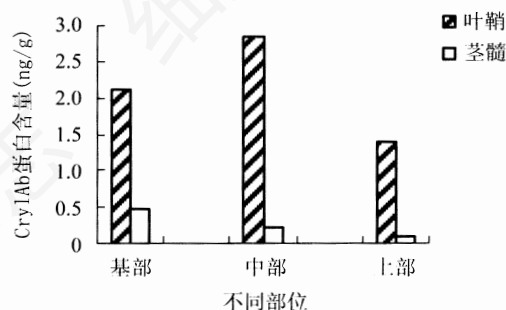


图 3 灌浆后期转基因高粱不同部位叶鞘和茎髓的 *Cry1Ab* 蛋白含量

势为叶鞘>叶>颖壳>籽粒>根>茎髓, 这与以上玉米、棉花、水稻等作物中有关 Bt 基因表达水平的组织特异性差异的报道是一致的。由此可见, 外源 Bt 基因在不同组织或器官中的表达量存在差异是一种普遍现象^[7,8,10~13]。但在不同植物中, Bt 基因最高表达量所在器官却不同, 又有各自的特性。此外, 不同器官中 *Cry1Ab* 蛋白含量也受植物生长发育进程的影响而表现出一定的时间特性, 因此, 不同转基因植物中 Bt 基因表达趋势也会有差异^[14~17], 转 Bt 基因高粱在这方面还有待进一步研究。

吴刚等^[10]研究了转 *cry1Ab* 基因水稻不同部位叶片、叶鞘和茎的 *Cry1Ab* 蛋白含量, 结果为: 最下部叶>上部叶>中部叶, 底部叶鞘含量最高, 而

茎中则以上部茎为最高。本实验的结果显示, *cry1Ab* 基因在高粱不同部位相同器官中的表达水平也存在较大的差异, 中部叶高于上部叶和基部叶, 叶鞘的分布亦表现为中部最高, 顶部的表达量最低, 茎髓中则表现为基部高于中、上部。导致这种情况的原因可能是: 中部叶片和叶鞘处于生长旺盛时期, *Cry1Ab* 蛋白的合成达到了高峰, 所以 *Cry1Ab* 蛋白含量较高, 而基部的叶片和叶鞘随着生育期的推进逐渐趋于衰老, 其 *Cry1Ab* 蛋白合成减少, 上部叶片和叶鞘中则由于 *Cry1Ab* 蛋白积累还没有达到最高峰, 所以含量较低。至于茎髓中 *Cry1Ab* 蛋白含量的变化趋势呈现为基部>中部>上部, 可能是由于茎髓中 *Cry1Ab* 蛋白积累的速度比较慢, 随着生育期的推进反而逐渐增加, 故表现出上述趋势。*Bt* 基因的表达水平是多种因素相互作用的结果, 对于不同转基因植物中出现这种趋势差异的机制目前尚不明确, 还有待于进一步研究。

本研究结果对合理利用转 *Bt* 基因抗虫高粱具有指导作用。例如, 根据本研究结果, 尽管高粱茎髓中 *Cry1Ab* 蛋白含量很低, 但叶鞘中的含量却最高, 这对于控制“钻茎”的害虫也将有效, 因为这类害虫在钻入茎髓之前必定先要侵蚀叶鞘。检测

发现, 籽粒中的 *Cry1Ab* 蛋白含量较低, 而颖壳中的含量较高, 这可以减少那些以危害籽粒为主的害虫, 因为成熟时高 *Cry1Ab* 蛋白含量的颖壳将对籽粒起到保护作用。此外, 还可根据不同地区高粱害虫的发生特异性, 选育和使用某些组织或器官中表达量特别高的品系, 也可根据这种表达产物的空间分布情况制定辅助策略来控制害虫。

参考文献 (References)

- [1] Hannay CL. *Nature*, 1953, **172**: 1004
- [2] Hannay CL. *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] 何富刚等. *国外农学—杂粮作物*, 1996, (1): 47
- [6] 张明洲. *浙江大学博士学位论文*, 2002
- [7] 卢美贞等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 509
- [8] Koziel MG *et al.* *Biotechnology (NY)*, 1993, **11**: 194
- [9] 李汝忠等. *山东农业科学*, 2002, (2): 7
- [10] 吴刚等. *农业生物技术学报*, 2000, **8**: 253
- [11] 王建武等. *中国农业科学*, 2003, **36**: 1279
- [12] 王保民等. *农业生物技术学报*, 2002, **10**: 215
- [13] Carozzi NB *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992, **20**: 539
- [14] 石春林等. *植物学报*, 2000, **42**: 269
- [15] 邢朝柱等. *棉花学报*, 2001, **13**: 11
- [16] Sachs ES *et al.* *Crop Sci*, 1998, **38**: 1
- [17] 刘志等. *高技术通讯*, 2003, (1): 37

Expression Level of Transgene *cry1Ab* in Different Organs of Sorghum

Mei-Zhen Lu, Hai-Rui Cui*, Yan-Jia Shao, Yang Zhou, Yan-Ling Yao, Ji-Qiang Jin

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

Abstract Expression level of *cry1Ab* gene in different organs of transgenic sorghum was detected by using *Cry1Ab/Cry1Ac* QuantiPlate Kits. There were obvious differences in *Cry1Ab* protein content in the different organs, with the highest in the leaf sheath, followed by the leaf, the glume, the seed, the root and the stem in order, while no *Cry1Ab* protein was detected in the anther. There were also obvious differences in *Cry1Ab* protein content in the leaf, the leaf sheath and the stem fragment at different positions. The *Cry1Ab* protein content in middle leaves was higher than that in top and base leaves, and higher *Cry1Ab* protein content was found in the middle leaf sheathes followed by the base and top leaf sheathes. However, the highest in the stem fragment was detected in the base.

Key words transgenic sorghum; different organs; *cry1Ab* gene; expression level

Received: November 9, 2005 Accepted: April 12, 2006

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