

含 *VHb* 基因和 *GFMcryIA* 基因的双价基因植物 高效表达载体的构建

王友如^{1,2*}, 崔洪志², 郭三堆²

(1. 湖北师范学院生物系, 湖北黄石 435002; 2. 中国农业科学院生物技术研究所基因工程实验室, 北京 100081)

摘要: 将人工合成的、密码子优化后的透明颤菌血红蛋白基因与人工合成的 *GFMcryIA* 基因构建成双价基因植物高效表达载体 PGBI4ASVHBBt, *vgbM* 基因表达盒中含 2 个增强子的 35S 启动子、 Ω 前导序列、Kozak 序列、多联终止密码子及 Nos 终止子; *Bt* 基因表达盒中, 除含有以上提高转录和翻译的调控元件外, 还包含有正确切割、加工序列、Poly(A) 信号序列。利用根癌农杆菌介导转化烟草, 获得了转基因植株; PCR 及 Southern blot 检测, 证实了双价基因在烟草基因组中的整合; Western blot 检测证实了 *vgbM* 基因在转基因烟草中的表达; 杀虫实验表明 *GFMcryIA* 基因也表达出活性毒蛋白。

关键词: 双价基因; 表达载体; 抗虫性; 活性蛋白

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)02-0118-05

Construction of Plant Expression Vector Harboursing Bivalent Genes Composed of Synthetic *VHb* Gene and *GFMcryIA* Gene

WANG You-Ru^{1,2*}, CUI Hong-Zhi², GUO San-Dui²

(1. The Biology Department of Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 430052, China;

2. The Genetic Engineering Laboratory of Biotechnology Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: The highly-efficient plant expression vector harbouring bivalent genes was constructed by applying the artificially-modified-synthesized *VHb* gene (*vgbM* gene) and the modified *Bt* gene (*GFMcryIA* gene). *vgbM* gene expression cassettes contained such cis-acting elements as 35S promoter, two enhancers, Ω and Kozak sequence, poly-terminator and Nos terminator, besides these elements, *Bt* gene expression cassettes contained splicing sequence, processing sequence and Poly(A) sequence. Transgenic tobacco plants were obtained through the transformation with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the expression vector PGBI4ASVHBBt, by PCR amplification and Southern blot analysis, it was proved that the bivalent genes were inserted into the tobacco plant genome; through western blot analysis it was also verified that *vgbM* gene expressed in the transgenic plants. Toxicity assay indicated that transgenic plants expressed pesticidal toxin protein.

Key words: Bivalent gene; Expression vector; Pest-resistance; Active protein

转苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因抗鳞翅目及鞘翅目的转基因研究已经取得了重大进展^[1-5], 在我国, 转人工合成的 *GFMcryIA* 基因(以下简称 *Bt* 基因)抗虫棉已经实行商业化生产^[1]。透明颤菌能合成血红蛋白以适应在贫氧的环境生活, 由于它具有结合氧的特性, 从而暗示着在好氧的生物过程中具有潜在的应用价值^[6]。优化后人工合成的透明颤菌血红蛋白基因是根据植物偏爱的密码子, 按照透明颤菌血红蛋白(*VHb*)的氨基酸序列, 对透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)进行优化改造, 人工合成了全长 450 bp 的透明颤菌血红蛋白基因(以下称之为 *vgbM*)。把优

化的透明颤菌血红蛋白基因同已经商业化生产的 *GFMcryIA* 基因构建成双价基因植物表达载体, 导入烟草。转基因烟草植株的 PCR、Southern blot 检测表明 *vgbM* 及 *Bt* 双价基因都已整合至烟草的基因组中, Western blot 分析说明 *vgbM* 基因也表达出了活性蛋白质, 转基因烟草植株杀虫实验证实 *Bt* 基因表达出了活性杀虫毒蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天为时代

收稿日期: 2006-08-09, 修回日期: 2006-11-30。

作者简介: 王友如(1972-), 男, 在读博士生, 讲师, 从事生物化学与分子生物学研究。

公司,根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (本室保存)。质粒 PGBI4AB、PGSVHB、PG4AB 均由本实验室构建。用烟草 (*Nicotiana tabacum*) Ne89 无菌苗叶片作为转化用外植体。生化试剂为限制性核酸内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 MBI 公司, DNA Marker 和蛋白质 Marker 系鼎国公司和 MBI 生产。检测引物由赛百盛公司合成,检测 *GFMcryIA* 基因的引物:引物1为 5'-TACAATAACAATGGACTGC-3';引物2为 5'-AGATGTCCATCAAGTGGGT-3'。检测 *VHb* 基因的引物:引物3为 5'-CATGCCATGGGCCTTGATCAACAGACTATC-3';引物4为 5'-CCCAAGCTTACTCAACAGCTTGAGC-3'。转基因烟草叶片杀棉铃虫实验采用 3 日龄棉铃虫 (*Heliothis armigera* Hübner) 检测。

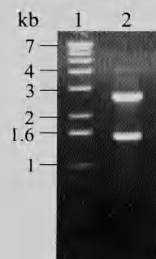
1.2 方法

(1)载体构建过程中的 DNA 操作技术,如质粒 DNA 的提取、酶切、酶切产物连接、转化及重组子的筛选参照文献[7]进行。(2)酶切片段的回收试剂盒购自鼎国公司试剂盒。(3)烟草基因组 DNA 的提取参照文献[8]进行。(4)植物表达载体转化农杆菌及对烟草的转化参照文献[8]进行。(5)转基因烟草的分子检测:PCR 及 Southern blot 检测方法参照文献[8]进行,探针标记采用 Promega 公司试剂盒。(6)转基因烟草植株叶片杀棉铃虫试验参见文献[5]进行。

2 结果与分析

2.1 含 *vgbM* 基因的中间载体 (PGBI4ASVHB) 的构建

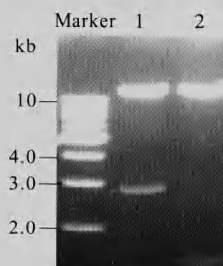
(1)*Pst* I 和 *Sac* I 酶切 PGSVHB,得到 *vgbM* 基因片段并将 *vgbM* 克隆到 PG4AB 上以替换 *Bt* 基因,这样利用 *Bt* 基因表达盒的启动子和终止子以及增强表达的调控元件,构建了质粒 PG4ASVHB。*Hind* III 酶切鉴定质粒 PG4ASVHB,出现 2.82 kb 和 1.58 kb 的片段 (见图 1),与预期结果一致。(2)PG4ASVHB 上有两个 *Hind* III 位点,故先用 *Eco*R I 完全酶切质粒 PG4ASVHB,然后再用 *Hind* III 酶切,回收 1.58 kb 大小的 *vgbM* 基因表达盒片段。(3)*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切 pBI 121.1,回收 10 kb 载体片段,然后将 *vgbM* 基因表达盒克隆至载体 pBI 121.1 上,即可获得含 *vgbM* 基因表达盒的中间植物表达载体 PGBI4ASVHB,该质粒的酶切鉴定结果与理论相符。PGBI4ASVHB 的酶切鉴定图谱见图 2,其质粒图谱见图 3。



1:DNA 标准分子量; 2:质粒 PG4ASVHB 双酶 (*Hind* III + *Eco*R I) 切
Lane 1:Marker(1 kb DNA ladder); Lane 2:PG4ASVHB/ (*Hind* III + *Eco*R I)

图 1 质粒 PG4ASVHB 酶切鉴定结果

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of plasmid PG4ASVHB



1:PGBI 121.1 双酶 (*Hind* III + *Eco*R I) 切;
2:质粒 PGBI4ASVHB 双酶 (*Hind* III + *Eco*R I) 切
Lane 1:PGBI 121.1/ (*Eco*R I + *Hind* III);
Lane 2:PGBI4ASVHB/ (*Eco*R I + *Hind* III)

图 2 质粒 PGBI4ASVHB 酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of plasmid PG4ASVHB

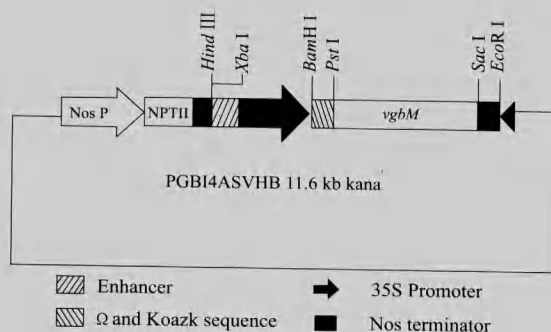


图 3 PGBI4ASVHB 质粒图谱

Fig. 3 Structure of plasmid PGBI4ASVHB

2.2 含 *VHb* 基因和 *Bt* 基因的双价基因植物高效表达载体的构建

(1) *Hind* III 酶切质粒 PGBI4AB, 电泳回收 3.2 kb 的 *Bt* 基因表达盒片段;该表达盒中包含有其表达的调控元件,如:增强子、启动子、 Ω 和 Kozak 序列 Poly(A) 序列、终止子等。

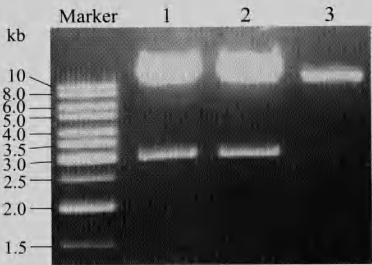
(2) *Hind* III 酶切质粒 PGBI4ASVHB, 回收 11.6 kb

的 PGBI4ASVHB 载体片段,脱磷处理载体片段。

(3) 将 *Bt* 基因表达盒克隆到 PGBI4ASVHB 上,构建成新的植物高效表达载体 PGBI4ASVHBBt,先用 *Hind* III 酶切 PGBI4ASVHBBt,出现 11.6 kb 和 3.2 kb 的 DNA 片段,与理论值相符合(图 4),然后用 *Eco*R I/*Sac* I 酶切检测插入的 *Bt* 基因表达盒顺序的正确性。质粒图谱见图 5。

新构建的植物表达载体 PGBI4ASVHBBt 中含有 *Bt* 基因和 *vgbM* 基因表达盒。*vgbM* 基因表达盒中包含有 2 个增强子的 35S 启动子、 Ω 前导序列、Kozak 序列、多联终止密码子及 Nos 终止子;*Bt* 基因表达盒中,除含有以上提高转录和翻译的调控元件外,还包含有正确切割、加工序列、Poly(A) 信号序列。*Bt* 基因和 *vgbM* 基因各带有自己的能增强转录

和翻译的调控元件,这些顺式作用元件将有利于外源基因在受体植物中的高效表达(见图 5)。



1:质粒 PGBI4ASVHBBt 单酶(*Hind* III)切; 2:质粒 PGBI4AB 单酶(*Hind* III)切; 3:质粒 PGBI4ASVHB 单酶(*Hind* III)切
Lane 1:PGBI4ASVHBBt/*Hind* III; Lane 2: PGBI4AB/*Hind* III; Lane 3:PGBI4ASVHB/*Hind* III

图 4 PGBI4ASVHBBt 鉴定图谱
Fig. 4 Restriction endonuclease analysis of plasmid PGBI4ASVHBBt

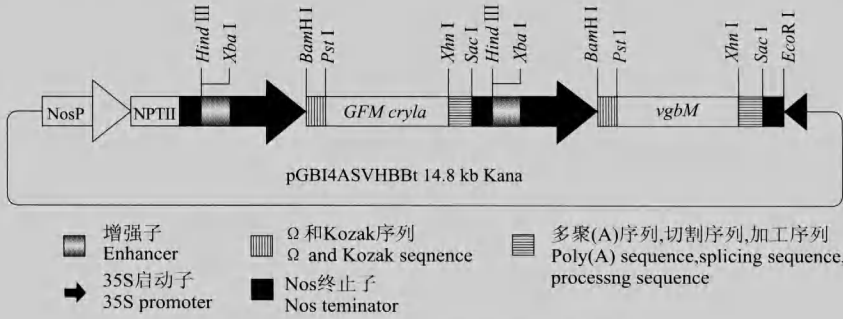
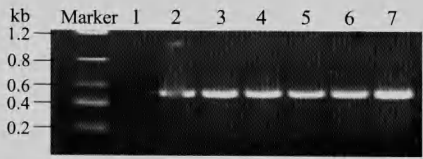


图 5 质粒 PGBI4ASVHBBt 的结构图谱
Fig. 5 Structure of plasmid PGBI4ASVHBBt

3 双价基因表达载体导入烟草的初步研究

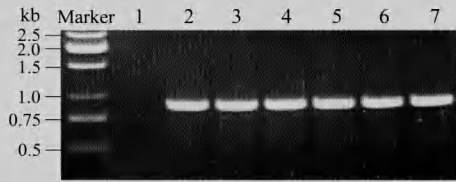
3.1 转基因烟草植株的获得及其分子鉴定

通过根癌农杆菌介导的叶盘法转化烟草,获得了卡那霉素抗性植株。提取转基因烟草叶片基因组 DNA,利用 *vgbM* 基因及 *Bt* 基因引物,进行 PCR 检测。将烟草基因组 DNA 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切,然后 Southern blot 检测,结果表明双价基因已经整合到烟草基因组中。检测结果分别见图 6 ~ 图 9。



1. 非转基因植株; 2. 阳性质粒对照; 3~7: 转基因植株
1. The nontransgenic plant; 2. The positive plasmid group; 3~7. The transgenic tobacco plants

图 6 转基因烟草 *vgbM* 基因的 PCR 检测
Fig. 6 PCR amplification detection of *vgbM* gene in transgenic tobacco



1. 非转基因植株; 2. 阳性质粒对照; 3~7. 转基因植株
1. The nontransgenic plant; 2. The positive plasmid group; 3~7. The transgenic tobacco plants

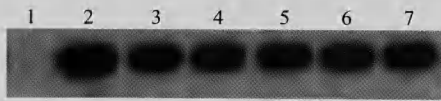
图 7 转基因烟草融合基因(*Bt* 基因)的 PCR 检测
Fig. 7 PCR amplification detection of *Bt* gene in transgenic tobacco

3.2 *vgbM* 基因的 Western blot 检测

转基因烟草的 Western blot 检测表明在这些转基因烟草中,*vgbM* 基因全部表达出了目的蛋白,图 10 是 PCR 及 Southern blot 检测中相对应的 5 株转基因烟草植株蛋白提取物的 Western blot 结果。

3.3 转基因烟草干重的检测

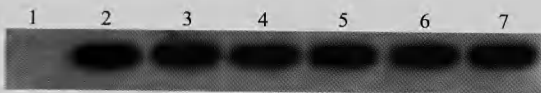
为了检测转基因烟草 *vgbM* 基因的表达效果,我们将 35 株转基因烟草的平均干重和非转基因植株的平均干重对比,结果表明:转基因的烟草每株的



1. 非转基因植株; 2. 阳性质粒对照; 3~7. 转基因植株
1. The nontransgenic plant; 2. The positive plasmid group;
3~7. The transgenic tobacco plants

图8 转基因烟草 *vgbM* 基因的 Southern blot 检测

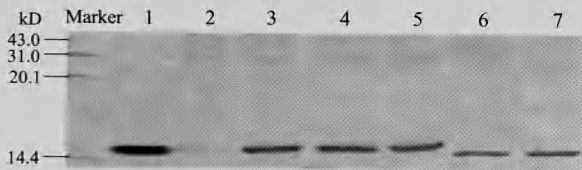
Fig. 8 Southern blot analysis of *vgbM* gene in transgenic tobacco



1. 非转基因植株; 2. 阳性质粒对照; 3~7. 转基因植株
1. The nontransgenic plant; 2. The positive plasmid group;
3~7. The transgenic tobacco plants

图9 转基因烟草融合基因的 Southern blot 检测

Fig. 9 Southern blot analysis of confused gene in transgenic tobacco plant



1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~7. 转基因烟草植株
Lane 1. The negative group; Lane 2. The positive group;
Lane 3~7. Transgenic tobacco plant

图10 转 PGBI4ASVHBBt 烟草的 *VHb* 基因 Western blot 分析图

Fig. 10 Western blot analysis of *VHb* gene of tobacco plant transformed through PGBI4ASVHBBt

平均干重高于非转基因的烟草 7%。实验结果表明, *vgbM* 基因不仅在转基因烟草中表达出了目的蛋白, 而且增产效果明显。

3.4 *Bt* 杀虫基因表达产物的生物学检测

转基因烟草植株的叶片杀棉铃虫实验结果表明 35 株转基因烟草中, 15 株具有极高或高抗性, 16 株具有中等抗性, 4 株低抗性。

4 讨论

不同物种基因中编码某种氨基酸的密码子具有偏爱性, 主要表现在体内各种 tRNA 的丰度存在差异。透明颤菌是原核生物, 如果将其基因直接转入真核生物, 未经修饰的透明颤菌血红蛋白基因中含有许多植物稀有密码子, 由于相应的 tRNA 在植物中含量过低而导致翻译过程中的停顿, 从而影响了蛋白在植物中高效表达^[3,5,9,10]。因此, 在不改变透明颤菌血红蛋白的氨基酸序列的情况下, 选用植物偏性密码子, 通过人工合成进行基因改造, 从而增加

其在转基因植株中的表达量, 并更大限度地增加转基因植株的生长和产量。国外有人将 *vgb* 基因导入烟草, 发现转基因烟草的叶片的鲜重增加了 34%, 本实验无法在同等条件下对比优化后的 *vgbM* 基因和没改造过的 *vgb* 基因的增产数据。

研究表明: 对 *cry* 基因部分或全序列人工合成的转基因植株大大地增强了害虫的抗虫性^[5-7,11-13], 转 *Bt* 杀虫基因的抗虫棉等已经实现了商业化生产^[1]。基因工程的一个特点是可以打破物种间的界限实现基因的转移, 以实现通过分子育种的方法创造出新的品种^[1]。转基因中外源基因的表达, 受到体内外各种理化因素的调节控制, 其中最直接的调控作用是通过与外源基因同时导入的特定基因表达调控的顺式作用元件(如启动子、增强子等)和细胞内的反式作用因子的相互作用来实现, 本实验的基因的表达盒中含有如下的表达调控元件: 5'端 CaMV35S 启动子及增强子加倍元件、5'端 Ω 序列和 Kozak 序列、3'端的多腺苷酸序列 poly(A)、切割序列和加工序列、3'端多联终止密码子序列及 Nos 终止子, 这些元件有利于外源基因在受体植物中的高效表达。将特定的外源基因构建在植物表达载体中并转入受体植物, 并不是植物遗传转化的最终目的。理想的转基因植物往往需要外源基因高水平表达, 产生人们期望的表型性状。本实验中的双价基因在烟草中的表达表明: 将 *Bt* 基因表达盒和 *vgbM* 基因表达盒构建双价植物高效表达载体 PGBI4ASVHbBt, 通过分子育种的方法将其转入一些农作物如棉花等可望培育出既高产、稳产又具杀虫效果的新品种。

参考文献:

- [1] 闫新甫. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] 倪万潮, 张震林, 郭三堆. 转基因抗虫棉的培育[J]. 中国农业科学, 1998, 31(2): 8-13.
- [3] 郭三堆. 植物 *Bt* 抗虫基因工程研究进展[J]. 中国农业科学, 1995, 8(5): 8-13.
- [4] Wang Z B, Guo S D. Expression of two insect-resistant genes *cryIA* (bc)/*gna* in transgenic tobacco plants results in added protection against both cotton boll worm and aphids[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(19): 2068-2074.
- [5] Wang G Y, Du T B, Zhang H. Transfer of *Bt*-toxin protein gene into maize by particle bombardments and regenerations of transgenic plants[J]. Science in China, Ser B, 1999, 38(9): 817-824.
- [6] Dikshit K L, Dikshit R P, Webster D A. Study of *Vitreoscilla* globin(*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(14):

- 4149 - 4155.
- [7] 萨姆布鲁克 J. 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Derk E E. Estimated crop losses due to pathogen, animal pests and weeds[A]. In: Oerbe E C, Dehne H W, Schonbeck F, *et al.* Crop Production and Crop Protection: Estimated losses in Major and Cash Crop[M]. Amsterdam: Elsevier, 1994. 72 - 88.
- [10] Edward K, Johnson C, Thompson C. A simple and rapid method for transferring genes into plants[J]. *Nuclei Research*, 1994, 6(19): 1349.
- [11] Brewin N J, Flavell R B. A cure for anemia in plants? [J]. *Nature Biotechnol*, 1997, 15: 222 - 223.
- [12] Jelenkovic G, Billings S, Chen Q. Transformation of eggplant with synthetic *cry* IIIA gene produces a high level of resistance to the colosado potato beetle[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1998, 123(1): 19 - 25.
- [13] Stewart C N, Adang M J, All J N. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry*IaC gene [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112: 121 - 129.