

分子改造 Cry 蛋白基因的转基因玉米 创制及其抗虫功能评价

王 阳¹, 杨 朔², 尹悦佳³, 刘 洋³, 李 楠³, 柳 青³,
于志晶³, 刘相国³, 冯树丹¹, 郝东云³

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; 2. 吉林大学/分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130012;
3. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要: 利用结构域交换和密码子优化方法对苏云金芽孢杆菌(Bt)杀虫晶体蛋白 Cry1Ab 进行合理化设计改造, 获得新型 Bt 蛋白编码基因 *cryFLIa*。利用农杆菌介导法将该基因转入玉米 HiII 中, 对转基因后代开展分子鉴定和抗性评价等相关工作。结果表明, *cryFLIa* 基因已整合进玉米基因组中, 连续 3 代自交材料检测显示, 转基因玉米目标基因正常表达并稳定遗传; 蛋白在植株叶片中发育各时期的表达各异, 在灌浆期蛋白表达量较高(471.883 ng/g)。室内生测和田间人工接虫试验表明, 转 *cryFLIa* 基因玉米具有抗亚洲玉米螟的能力。

关键词: 玉米; 苏云金芽孢杆菌(Bt); 分子改造; 亚洲玉米螟

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Rational Mutation of Cry Protein and the Insect Resistance Assessment in the Transgenic Maize

WANG Yang¹, YANG Shuo², YIN Yue-jia³, LIU Yang³, LI Nan³, LIU Qing³,
YU Zhi-jing³, LIU Xiang-guo³, FENG Shu-dan¹, HAO Dong-yun³

(1. College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025;
2. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, Ministry of Education,
Jilin University, Changchun 130012;
3. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Cry1 proteins were mutated from *Bacillus thuringiensis* by protein rational design, a mutant CryFLIa was gained that contains the selected domains from different Cry1s. The maize gene codon-optimized *cryFLIa* was induced into maize with the agrobacterium-mediated transformation. PCR and RT-PCR assessment were performed to 3 self-generations, exhibiting that the *cryFLIa* was integrated into the maize genome with stable expression. The *cryFLIa* expressed in various parts of the transgenic maize throughout life cycle leaves with the highest occurring during grain filling stage. Insect resistance assessment in both laboratory and the field showed that the *cryFLIa* transgenic maize resisted to the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. The results suggested that rational protein engineering produced Cry protein of expected functionality, and the mutant *cryFLIa* possesses potential in insect-resistant maize biotech breeding.

Key words: Maize; *Bacillus thuringiensis*; Rational protein engineering; Asian corn borer

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 黑龙江省自然基金项目“转 *MAD1* 基因球孢白僵菌工程菌株防治玉米螟配套技术研究”(C201307)

作者简介: 王 阳(1989-), 女, 山东人, 硕士, 研究方向为 Bt 抗虫基因的功能评价。Tel: 13945661068

E-mail: hsdwangyang@163.com

冯树丹和郝东云为本文通讯作者。

E-mail: sdf6616@163.com E-mail: dyhao@cjaas.com

亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*) 是玉米主要的害虫之一, 发生虫害一般可使玉米减产 10% ~ 30%, 甚至绝收^[1]。传统防治玉米螟的方法是大量使用化学杀虫剂, 杀死害虫的同时也杀死了其天敌及其他有益昆虫, 且杀虫剂的残留对人畜及环境也有严重危害。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是革兰氏阳性细菌, 在生长过程中产生一类杀虫

晶体蛋白—Cry蛋白,其具有对环境和人畜无危害、无残留,且对多种昆虫有很强的毒性作用的特点^[2]。1981年第1个*Bt*基因被克隆^[3]。1987年,*Bt*基因首次转入烟草和番茄中提高作物对害虫的抗性,*Bt*基因在转基因植物中得到了广泛的应用。但随着*Bt*基因的应用,害虫已产生不同程度的抗性^[4~6],而且原始未经改造和修饰的*Bt*基因导入植物后,存在毒素表达量低、植株抗虫能力弱等缺陷^[7]。

Cry蛋白具有3个结构域,其分别具有不同的功能。结构域I可调控昆虫肠道表皮细胞孔洞的形成,结构域II可作用于毒蛋白与昆虫肠受体的特异性结合过程,结构域III与昆虫肠受体识别和维持毒蛋白的结构稳定有关。de Maagd等分析Cry蛋白结构域I、II、III的进化树,推测结构域转换是*Bt*在自然界进化的一种机制,而这种转换主要集中在结构域III上^[8]。由此可见,结构域I决定了Cry蛋白的毒性,结构域II、III决定了Cry蛋白对昆虫的选择性。de Maagd等将Cry1Ca的结构域III分别与Cry1Ab、Cry1Ac的结构域III交换,构建的新Cry蛋白对甜菜夜蛾幼虫的杀虫活性比野生型Cry1Ab、Cry1Ac杀虫活性高出10倍以上^[9]。李新海对Cry1Ab和Cry1F的结构域进行交换,得到毒蛋白可稳定表达的转基因植株。此外,还有研究表明,不同的毒蛋白结构域III交换可扩大抗虫谱,将Cry1Ab与Cry3Aa的结构域III进行交换,对鞘翅目叶甲科害虫具有明显毒性^[10,11],而Cry3Aa和Cry1Ab对其没有活性。

国内外所应用的*Bt*制剂大多数为*Bt*亚种(*B. thuringiensis subsp. Kustaki*),其主要杀虫成分为Cry1A类蛋白^[12]。其中,*Cry1Ab*基因编码的Cry1Ab蛋白毒力相对较高,在鳞翅目害虫防治上应用的非常广泛。*CryII*基因是一类十分特殊的*cryI*类基因,其具有较强的杀虫活性和相对较广的杀虫谱,其中,*cryIIa*类基因表达产物对多种农业害虫均有高毒力^[13]。1992年,Taylor等从*Bt*菌株4835中克隆了第一个*cryII*基因*cryIIa1*,发现其对鳞翅目的欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)和鞘翅目的马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)具有双重的毒杀活性^[14]。

本研究利用Cry1Ab的毒性和对鳞翅目昆虫靶标选择性、CryIIa1的昆虫靶标选择性创制新型杀虫蛋白。通过结构域重组交换技术和密码子优化,将Cry1Ab结构域I、II和其他Cry1类结构域III编码基因进行合理化改造,共创制64个新型重组蛋白基因,部分重组基因大肠杆菌过表达产物表现良好的亚洲玉米螟抗性。*cryFLIa*是抗性较好的重组蛋白基因之一,利用农杆菌侵染幼胚法获得转*cryFLIa*基

因玉米植株,对其抗虫性进行深入评测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米受体材料HiII,由吉林省农业科学院生物技术研究所保存;实验所需亚洲玉米螟虫由吉林省农业科学院生物技术研究所提供;pTF101-ubi载体为实验室前期自主构建并保存;*E.coil* DH5 α 菌体和农杆菌EHA105菌株由实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 分子改造

利用生物信息学分析野生型*cry1Ab*、*cryIIa1*基因序列,找出编码Cry1Ab结构域I、II、CryIIa1结构域III的基因序列。根据刘汉梅等对玉米密码子偏好性的研究进行密码子优化^[15],优化后送至生工公司(上海)进行基因合成。

1.2.2 植物表达载体构建

Sma I和*Sac* I双酶切pTF101-ubi载体和含有*cryFLIa*基因质粒,用DNA快速纯化回收试剂盒分别回收pTF101-ubi载体片段和*cryFLIa*基因片段。具体操作按生工(上海)说明书进行。T4 DNA连接酶连接两片段,体系和反应条件参照T4 DNA连接酶(美国Thermo公司)说明书进行。转化至*E.coil* DH5 α ,筛选阳性转化子,具体方法参照桓明辉等的方法^[16],得到重组质粒命名为pTF101.1-ubi-FLIa。

1.2.3 遗传转化

含有pTF101.1-ubi-FLIa的农杆菌EHA105在YEP固体培养基上涂布,28℃下暗培养1~3 d;将培养好的农杆菌从平板上刮下重悬,OD₅₅₀调至0.3,制成侵染液备用;取授粉12 d左右的HiII玉米幼胚,在无菌条件下剥离幼胚,剥离100个完整幼胚至含有无菌侵染培养基的2 mL离心管中,洗2次;再将幼胚移动到OD₅₅₀为0.3~0.4的农杆菌悬浮液中,静息5 min;侵染完成后,幼胚共培养培养基上培养3 d,在恢复培养基上培养7 d,再在含1.5 mg/L双丙氨磷的选择培养基上培养2周;两周后,幼胚被转到3 mg/L双丙氨磷的选择培养基上培养5周,在分化培养基上培养得到试管苗;当植株生长健壮时,转入温室培养至成熟期,得到T₀代转基因植株,T₀代转基因植株连续自交3代得到T₃代转基因植株。

1.2.4 转基因植株检测

采用CTAB法提取转基因植物叶片总DNA^[17]。根据*cryFLIa*基因序列设计PCR扩增引物,FLIa-S1: AATACAGGTCTTGAGCGGGTCT和FLIa-A1: GTTGCCCATTTGCCATA。PCR总反应体系和条件

为2×EasyTaq SuperMix(+dye)最适体系和条件。扩增产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳(电压135V),在紫外凝胶成像仪下观察PCR电泳结果。

1.2.5 Southern blot分析

10 μg 玉米基因组DNA用Hind III限制性内切酶酶切,用1%琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,采用碱转移法转膜,将抗除草剂草铵膦的bar基因片段由地高辛标记作为目的探针进行杂交。探针标记及分子杂交参照Roche公司(瑞士)地高辛标记和检测试剂盒说明书。

1.2.6 RT-PCR分析

TRIzol法提取转基因玉米叶片总RNA,方法参照TaKaRa公司(大连)的RNAiso Plus试剂盒说明书。将RNA反转录为cDNA,方法参照TaKaRa公司(大连)的PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒说明书。以相同浓度cDNA为模板,分别用内参基因GAPDH引物和cryFLIa基因特异性引物进行PCR扩增,GAPDH-S: CCCTTCATCACCACGGACTAC, GAPDH-A: AACCTTCTTGGCACCACCCT; FLIa-S2: GCGACCATCAACTCAGC, FLIa-A2: AATCCAATCCCAGACTATCT。PCR总反应体系和条件为2×EasyTaq SuperMix(+dye)最适体系和条件。扩增产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳(电压135 V),在紫外凝胶成像仪下观察PCR电泳结果。

1.2.7 蛋白表达量分析

分别采集转基因玉米植株的6叶期、8叶期、抽穗开花期、灌浆期的叶片,提取总蛋白,用ELISA方法测定蛋白的表达量。具体方法参照agdia公司(美国)试剂盒说明书。

1.2.8 室内生测

在玉米6叶期,采集叶片,放入培养皿中,每个培养皿接10头供试亚洲玉米螟二龄幼虫,重复5次。以非转基因玉米植株叶片作为阴性对照。培养条件为相对湿度80%左右,温度(26±1)℃,光照培养14 h,暗培养10 h。每24 h调查1次存活幼虫数及叶片啃咬情况。

1.2.9 田间抗虫测试

在玉米6叶期对玉米植株进行田间人工接虫。将放有玉米螟虫卵油纸的1.5 mL离心管放在心叶,2 h后观察,初孵幼虫爬出离心管,否则需重新接虫。每组接虫20株,重复3次。到成熟期调查虫孔数和隧道长度等,总体评价转基因植株的抗虫性。

1.2.10 数据分析

用SPSS软件对试验数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白质分子改造

为获得新型抗虫基因cryFLIa,将cryIAb的N端结构域Ⅲ替换为cryIIa1的N端结构域Ⅲ(图1)。以刘汉梅的研究为依据^[15],使用玉米基因组偏爱密码子对cryIAb的结构域Ⅰ、Ⅱ和cryIIa1结构域Ⅲ进行密码子优化,苏云金芽孢杆菌中编码苯丙氨酸的核苷酸序列为TTT,优化后变为TTC;编码丝氨酸的核苷酸序列为AGT,优化后为TCC;编码缬氨酸的氨基酸序列为GTT,优化后为GTG;编码亮氨酸的核苷酸序列为TTG,优化后为CTC;编码甘氨酸的核苷酸序列为GGA,优化后为GGC等。优化前GC含量占37.5%,优化前后GC含量占52.9%,提高15.4%。

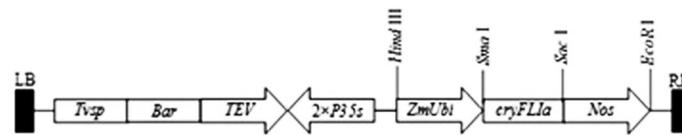
2.2 植物表达载体构建和转基因玉米的获得

以pTF101-ubi为载体骨架,将cryFLIa连入pTF101-ubi的Sma I和Sac I位点得到含有cryFLIa基因的植物表达载体pTF101.1-ubi-FLIa。载体T-DNA区结构见图2,其中,目的基因cryFLIa由ubiquitin启动子驱动,抗性筛选基因bar由P-CaMV35s启动子驱动。利用农杆菌介导转化法侵染愈伤组织,得到T₀代cryFLIa基因再生苗,T₀代连续自交3代得到T₃代转cryFLIa基因植株。

2.3 转基因玉米遗传稳定性

为鉴定转cryFLIa基因玉米植株的遗传稳定性,对T₁、T₂、T₃代转cryFLIa基因玉米植株PCR检测(图3),以pTF101.1-ubi-FLIa质粒作阳性对照,非转基因植株作阴性对照。由图3可以看出,阴性对照和空白对照均未出现条带,4~9泳道为转cryFLIa基因玉米植株,扩增出396 bp条带,与质粒大小一致,证明为阳性植株,表明目的基因cryFLIa已成功转入玉米中。对PCR检测为阳性的材料叶片进行草铵膦抗性筛选,结果显示,阳性材料均具有草铵膦抗性,这也说明所获的阳性材料是cryFLIa基因和bar基因共同转化的转基因玉米植株。

进一步确定转cryFLIa基因玉米的遗传稳定性和cryFLIa基因插入到HiII基因组中的序列拷贝数,对转cryFLIa基因玉米进行Southern blot分析。用Hind III限制性内切酶对T₁、T₂、T₃代玉米基因组DNA和阴性对照进行酶切,以片段大小为15 004 bp的pTF101.1-ubi-FLIa质粒为阳性对照,PCR检测为阴性的转基因植株作阴性对照,以552 bp的bar基因片段由地高辛标记作为探针进行杂交,阴性对照未见杂交条带,在检测的3个样品中均能见一条杂交条带,表明cryFLIa基因是以单拷贝形式插入的。

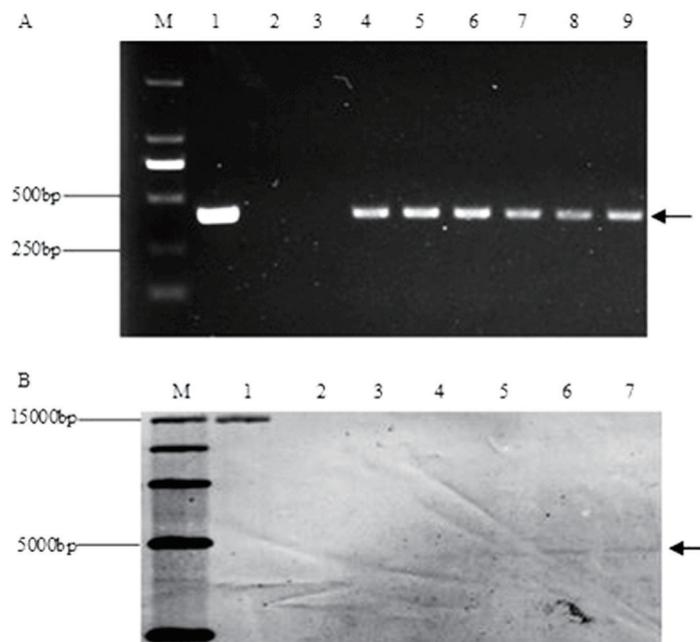


注: *Tvsp* 为终止子; *Bar* 为双丙氨酸膦抗性基因编码区; *TEV* 为增强子; *P35s* 为花椰菜花叶病毒(CaMV)35s启动子; *ubi* 为玉米泛素蛋白基因启动子; *cryFL1a* 为 *cryFL1a* 基因编码区; *Nos* 为胭脂碱合成酶终止子。

Note: *Tvsp*, terminator; *Bar*, double c ammonia phosphine resistance genes encoding area; *TEV*, enhancer; *P35s*, cauliflower Mosaic virus(CaMV) 35s promoter; *ubi*, corn ubiquitin protein gene promoter; *cryFL1a*, *cryFL1a* gene encoding area; *Nos*, rouge alkali synthetase terminator.

图2 T-DNA区载体图谱

Fig.2 T-DNA region of the vector pTF101.1 construct with *cryFL1a*



注: A图:部分转 *cryFL1a* 基因玉米植株PCR检测, M为DL 2000 Marker; 1为阳性对照(质粒); 2为阴性对照(非转基因植株); 3为空白对照(水); 4、5为T₁代转基因植株; 6、7为T₂代转基因植株; 8、9为T₃代转基因植株。

B图: Southern blot分析, M为DL 15000 Marker; 1为阳性对照(质粒); 2、3、4为阴性对照(分别为T₁、T₂、T₃代PCR检测阴性植株); 5为T₁代转 *cryFL1a* 基因阳性植株; 6为T₂代转 *cryFL1a* 基因阳性植株; 7为T₃代转 *cryFL1a* 基因阳性植株。

Note: A *cryFL1a* maize PCR detection, M: DL-2000 Marker; 1: positive control(pTF101.1-ubi-FL1a plasmid); 2: negative control(non-transgenic maize); 3: blank control(water); 4, 5: T₁ generation of the transgenic plant; 6, 7: T₂ generation of the transgenic plant; 8, 9: T₃ generation of the transgenic plant. B. Southern blot, M: DL-15000 Marker; 1: positive control(pTF101.1-ubi-FL1a plasmid); 2, 3, 4: negative control(T₁, T₂, T₃ non-transgenic plants respectively); 5: T₁ generation of *cryFL1a* maize; 6: T₂ generation of *cryFL1a* maize; 7: T₃ generation of *cryFL1a* maize.

图3 遗传稳定性分析

Fig.3 Assessment for genetic stability

2.4 *cryFL1a*基因在转基因玉米中的表达

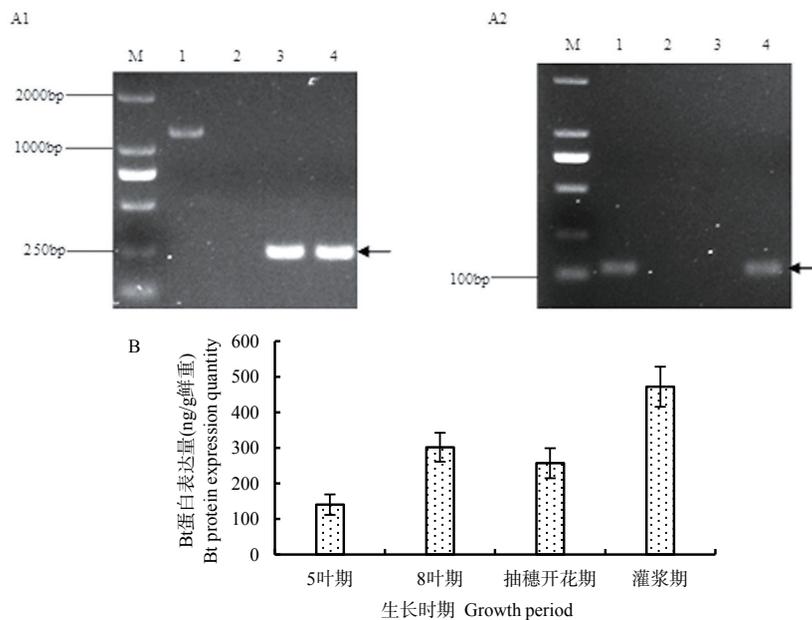
为分析 *cryFL1a* 基因在玉米植株中是否正确转录,提取T₃代转 *cryFL1a* 基因玉米植株叶片总RNA,将RNA反转录成cDNA,进行RT-PCR分析。以 *GADPH* 基因为内参基因, *cryFL1a* 为目的基因,转 *cryFL1a* 基因玉米植株DNA和pTF101.1-ubi-FL1a质粒分别为阳性对照,非转基因植株为阴性对照,水为

空白对照。从图4可见,内参基因具有较好的扩增效率,表明RNA质量完好;阴性对照和空白对照均无条带,4泳道为转 *cryFL1a* 基因玉米植株能扩增出122 bp的目标片段,表明 *cryFL1a* 基因在玉米植株中能正常转录。

为分析目的蛋白的表达量,利用ELISA的方法,对T₃代植株5叶期、8叶期、抽穗开花期、灌浆期转

*cryFL1a*基因玉米植株叶片进行CryFL1a蛋白的表达量的测定,在不同时期蛋白表达量均不同,在8叶期

和灌浆期,蛋白表达量出现高峰,两个峰值分别为301.68和471.883 ng/g。



注: A图: T_3 代转 *cryFL1a*基因植株叶片 RT-PCR 结果, A1 图: 内参基因 *GAPDH* 的 RT-PCR 扩增, M 为 DL 2000 Marker; 1 为阳性对照(T_3 转基因玉米植株); 2 为空白对照(水); 3 为阴性对照(T_3 代 PCR 检测阴性植株); 4 为 T_3 代转基因阳性植株。A2 图: *cryFL1a* 基因 RT-PCR 扩增, M 为 DL 2000 Marker; 1 为阳性对照(*cryFL1a* 质粒); 2 为阴性对照(PCR 检测阴性植株); 3 为空白对照(水); 4 为 T_3 代转 *cryFL1a* 基因阳性植株。B 图: T_3 代转 *cryFL1a* 基因阳性植株不同时期叶片的 CryFL1a 蛋白表达量(ELISA)检测结果。

Note: A. RT-PCR results of the transgenic plant (leaves). A1. RT-PCR amplification of the reference gene *GAPDH*, M: DL-2000 Marker; 1: positive control (T_3 transgenic maize genome); 2: blank control (water); 3: negative control (non-transgenic plant); 4: T_3 generation of the transgenic plant. A2 PCR amplification of *cryFL1a* gene, M: DL-2000 Marker; 1: positive control (recombinant plasmid); 2: negative control (non-transgenic plant); 3: blank control (water). 4: T_3 generation of the transgenic plant. B. The ELISA results of the T_3 generation transgenic plant at different developmental stages.

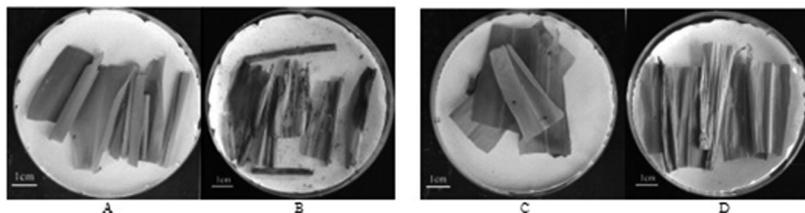
图4 *cryFL1a*基因在玉米中的表达

Fig.4 The expression of *cryFL1a* gene in maize

2.5 转 *cryFL1a* 基因玉米植株室内生测

为评价转 *cryFL1a* 基因玉米的抗虫性,选取非转基因植株和转 *cryFL1a* 基因植株为供试材料,其中,非转基因植株为阴性对照。6叶期采集叶片放入培养皿中,每个培养皿接10头供试亚洲玉米螟二龄幼虫,观察叶片被啃咬情况,统计亚洲玉米螟死亡率。

从图5可以看出,在第5天时,非转基因植株叶片啃食严重,转 *cryFL1a* 基因植株叶片有少量孔洞。转 *cryFL1a* 基因植株叶片的玉米螟幼虫的死亡率明显高于非转基因植株,在第5天玉米螟幼虫死亡率达到78%(表1),说明 *cryFL1a* 基因玉米植株对玉米螟有抗性。



注: A 为非转基因玉米植株接虫 0 d; B 为非转基因玉米植株接虫 5 d; C 为转基因植株接虫 0 d; D 为转基因植株接虫 5 d。

Note: A. Non-transgenic maize leaves at 0 day of insect feeding; B. Non-transgenic maize leaves at 5 day of insect feeding; C. Transgenic maize leaves at 0 day of insect feeding; D. Transgenic maize leaves at 5 day of insect feeding

图5 转基因植物叶片的室内生测

Fig.5 The insect mortality assay of the transgenic maize leaves

表1 取食玉米叶片的亚洲玉米螟累计死亡率

Table 1 The percentage cumulative mortality of the leaf-fed Asian maize borer %

材料 Material	时间(d) Time		
	1	3	5
转基因植株	6 ± 2.4	16 ± 2.4	78 ± 4.8
非转基因植株	0	12 ± 3.7	32 ± 3.2

注:数据为平均值±标准误。下表同。

Note: The data were mean ± SE. The same below.

2.6 转 *cryFLIa* 基因玉米植株田间抗虫性分析

为进一步分析转 *cryFLIa* 基因玉米植株的抗虫性,在田间对6叶期转 *cryFLIa* 基因植株和非转基因植株进行人工接虫,到成熟期时统计玉米受害情况。由表2可以看出,非转基因植株蛀孔数是转基因植株的1.6倍;在玉米螟啃食茎秆长度方面,非转基因植株是转基因植株的2.7倍;非转基因植株内的活虫数是转基因植株的4倍。田间接虫结果证明,转 *cryFLIa* 基因玉米植株对玉米螟有抗性。

表2 转 *cryFLIa* 基因玉米植株受害程度Table 2 The damage status of the *cryFLIa* transgenic maize

材料 Material	蛀孔数(个) Wormhole number	隧道长度(cm) Insect tunnel length	活虫数(条) Living insects
转基因植株	2.43 ± 0.37 a	3.64 ± 1.00 a	0.14 ± 0.14 a
非转基因植株	3.88 ± 0.21 a	9.90 ± 0.63 b	0.56 ± 0.07 a

注:不同小写字母表示0.05水平上差异显著。

Note: Different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

3 结论与讨论

Bt 杀虫晶体蛋白基因是最常使用的抗虫基因,野生型的 *Bt* 基因导入植物后,存在毒素表达量低、植株抗虫能力弱的问题,同时还要面对靶标昆虫对其产生的耐受性或抗性。相关研究发现,通过优化和改造野生型 *Bt* 基因可以提高抗虫基因的表达量。目前,对 *Bt* 基因的改造主要有密码子优化、结构域交换和定点突变等方法^[18]。Karlova R 等通过 *Cry1Ac* 结构域 III 分别与 *Cry1Ca*、*Cry1Fb* 的结构域 III 交换,构建的新蛋白均有较高的毒性^[19]。周宗梁等对 *cryIAh1* 基因进行改造,使用了水稻偏爱的密码子,得到新的 *cryIAh1* 基因,转入到日本晴后, *Cry1Ah* 蛋白在转基因植株中最高平均表达量占可溶性蛋白的0.104%^[20]。本研究综合上述两种改造 *Bt* 基因的方法,将 *Cry1Ab* 的结构域 III 与 *CryIIa1* 的结

构域 III 进行交换,同时进行密码子优化,获得新型抗虫基因 *cryFLIa*。通过分子检测表明, *cryFLIa* 基因在转入 HiII 后可稳定遗传和表达。接虫试验表明,转 *cryFLIa* 基因玉米植株具有抗亚洲玉米螟的能力。

转 *Bt* 基因植物生长过程中 *Bt* 蛋白的表达量呈现动态变化。戴军研究表明, *Bt* 蛋白的表达量在玉米生长过程中呈现先升高后降低的趋势,在抽穗期最高^[21]。杨丽丽研究表明, *Bt* 蛋白的表达量在玉米生长过程中呈增加趋势,在完熟期最高^[22]。本研究所获得的蛋白表达量结果与戴军和杨丽丽的研究结果有所不同,通过 ELISA 的结果分析表明,植株叶片各个时期均有表达,在不同时期蛋白表达量均不同,呈现先上升后下降再上升的趋势,分别在8叶期和灌浆期出现两个高峰。一些研究认为,蛋白的表达量呈现动态变化的原因为 *Bt* 基因表达量可能与作物本身内部的发育调控机制以及环境因素(温度、干旱及降水)有关^[23,24],本研究所获得的转基因植株并未进行目的基因插入位点的分析,推测还可能与目的基因插入到受体材料基因组的位点有关。本研究获得的转 *cryFLIa* 基因玉米材料 *Bt* 蛋白表达量在6~8叶期呈现上升的趋势,与玉米螟爆发时期相吻合,降低了植株在生长发育中后期受虫害的损伤程度。灌浆期为玉米子粒形成的关键时期,转 *cryFLIa* 基因玉米 *Bt* 蛋白的表达量最高,对降低虫害对结实产生的影响具有重大意义。

目前, *Cry1Ab* 对亚洲玉米螟有较强的毒力,且应用广泛。为降低害虫对 *Bt* 毒蛋白的耐受性,对 *Cry1Ab* 进行人工改造得到 *CryFLIa*, 其保留了 *Cry1Ab* 的结构域 I 和结构域 II, 结构域 III 使用 *CryIIa1* 的结构域 III, 通过室内生测和田间接虫表明了改造后的 *CryFLIa* 仍保留了 *Cry1Ab* 和 *CryIIa1* 对鳞翅目玉米螟的抗性,为抗鳞翅目害虫提供了一个新 *Bt* 基因。 *CryII* 类基因有较为广泛的杀虫谱,主要是对鳞翅目夜蛾科(*Noctuidae*)、卷叶蛾科(*Tortricidae*)、菜蛾科(*Plutellidae*)和鞘翅目叶甲科(*Chrysomelidae*)的害虫有效。 *cryFLIa* 基因是否存在 *CryII* 类基因杀虫谱广泛的特性正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 中国农作物病虫害编委会. 玉米螟·中国农作物病虫害(上册)[M]. 北京:中国农业出版社,1979.
- [2] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423-431.
- [3] 侯丙凯,陈正华. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. *植物学通报*, 2000, 17(5): 385-393.

Hou B K, Chen Z H. Progress of anti-insect genetic engineering of

- plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 17(5): 385–393. (in Chinese)
- [4] Tabashnik B E, VanRensburg J B, Carrère Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data[J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(6): 2011–2025.
- [5] Wright D J, Iqbal M, Granero F, et al. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella maculipennis*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 1814–1819.
- [6] Liu Y B, Tabashnik B E, Masson L, et al. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2000, 93(1): 1–6.
- [7] 吕霞. *Cry1A* 基因改造及其对玉米的遗传转化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2013.
- [8] de Maagd R A, Bravo A, Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world[J]. Trends in Genetics, 2001, 17(4): 193–199.
- [9] de Maagd R A, Weemen-Hendriks M, Siekema W, et al. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1–Cry1C hybrids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1559–1563.
- [10] Walters F S, deFontes C M, Hart H, et al. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3082–3088.
- [11] Hibbard B E, Frank D L, Kurtz R, et al. Mortality impact of Bt transgenic maize roots expressing eCry3.1Ab, mCry3A, and eCry3.1Ab plus mCry3A on western corn rootworm larvae in the field[J]. Journal of Economic Entomology, 2011, 104(5): 1584–1591.
- [12] 刘楠, 王少丽, 宋富平, 等. Cry1Ba3, Cry1Ia8 蛋白对 Cry1Ac 抗性小菜蛾的杀虫活性研究[J]. 植物保护, 2010, 3(2): 66–70. Liu N, Wang S L, Song F P, et al. Activity of Cry1Ba3 and Cry1Ia8 in *Bacillus thuringiensis* to the Cry1Ac-resistant strain of *Plutella xylostella*[J]. Plant Protection, 2010, 36(2): 66–70. (in Chinese)
- [13] 窦黎明, 韩岚岚, 张杰, 等. 苏云金芽孢杆菌 *cry1Ia* 基因的克隆、表达与活性研究[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 1053–1057. Dou L M, Han L L, Zhang J, et al. Cloning, expression and activity of *cry1Ia* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(6): 1053–1057. (in Chinese)
- [14] Tailor R, Tippett J, Gibb G, et al. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(9): 1211–1217.
- [15] 刘汉梅, 何瑞, 赵耀, 等. 玉米密码子用法分析[J]. 核农学报, 2008, 22(2): 141–147. Liu H M, He R, Zhao Y, et al. Analysis of codon usage in maize[J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2008, 22(2): 141–147. (in Chinese)
- [16] 桓明辉, 关艳丽, 陈飞. 大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞转化率变化的研究[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(1): 63–65. Huan M H, Guan Y L, Chen F. The changes of transformation efficiency of *E. coli* DH5 α receptive cells[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(1): 63–65. (in Chinese)
- [17] 黄培堂. 分子克隆实验指南(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [18] 王发祥, 刘永乐, 丁学知, 等. 蛋白改造提高苏云金杆菌杀虫活力的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(11): 8–12. Wang F X, Liu Y L, Ding X Z, et al. Advances in enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* with protein modification[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(11): 8–12. (in Chinese)
- [19] Karlova R, Weemen-Hendriks M, Naimov S, et al. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1–Cry1Ac hybrids[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2005, 88(2): 169–172.
- [20] 周宗梁, 林志敏, 耿丽丽, 等. 水稻中 *cry1Ah1* 基因密码子优化方案的比较[J]. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1184–1194. Zhou Z L, Lin Z M, Geng L L, et al. Comparison of codon optimizations of *cry1Ah1* gene in rice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(10): 1184–1194. (in Chinese)
- [21] 戴军, 李秀影, 朱莉, 等. 转 *Bt cry1Ah* 基因抗虫玉米的分子检测及农艺性状分析[J]. 生物技术通报, 2014(5): 62–68. Dai J, Li X Y, Zhu L, et al. Molecular detection and agronomic traits analysis of insect-resistant transgenic maize harboring *Bt cry1Ah* gene[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, 0(5): 62–68. (in Chinese)
- [22] 杨丽丽, 董姗姗, 刘燕, 等. *mCry1Ac* 基因在抗虫转基因 *Bt799* 中的表达特征[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(5): 670–673. Yang L L, Dong S S, Liu Y, et al. Expression of *mCry1Ac* gene in insect-resistant transgenic maize (*Bt799*)[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2014, 30(5): 670–673. (in Chinese)
- [23] Pilcher C D, Rice M E. Effect of planting dates and *Bacillus thuringiensis* corn on the population dynamic of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2001, 94(3): 730–742.
- [24] Traore S B, Carlson R E, Picher C D, et al. Bt and non-Bt maize growth and development as affected by temperature and drought stress[J]. Agronomy Journal, 2000, 92(5): 1027–1035.

(责任编辑: 朴红梅)