

cry Ia 基因小麦高效表达载体的构建*

侯文胜¹, 郭三堆², 路明¹

(1 西北农林科技大学 农学院 国家小麦改良中心杨凌分中心, 陕西 杨陵 712100;
2 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081)

[摘要] 利用在禾谷类作物中表达效率较高的启动子 *Ubi* 对含目的基因 *cry Ia* 的现有载体进行了改造, 并引入了筛选标记基因 *bar*, 为提高目的基因的表达水平, 还在目的基因 5 端引入了 Ω 和 Kozak 序列, 3 端引入了 poly (A) 序列。成功构建了适用于小麦的抗虫基因植物表达载体 pGU 4ABBar, 该载体含有顺向连接的 *Ubi-cry Ia* 及 *Ubi-bar* 基因表达盒, 可用于基因枪、花粉管通道法等介导的小麦遗传转化, 人工合成的苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因 *cry Ia* 可以编码对鳞翅目昆虫具有毒杀作用的蛋白。

[关键词] 表达载体; 启动子; 基因; 质粒; 小麦

[中图分类号] S512 103 53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387 (2002) 06-0121-04

小麦虫害每年都会造成相当严重的产量损失, 因此尽快将小麦现有种质资源中非常缺乏的抗虫基因导入小麦, 创造抗虫新种质是非常必要的^[1]。郭三堆研究员合成的经过优化的苏云金芽孢杆菌 (*B acillus thuringiensis*, 简称 *B t*) 杀虫蛋白基因 *cry Ia* 是我国拥有自主知识产权的新型杀虫基因, 其编码的蛋白对鳞翅目害虫具有毒杀作用, 在转基因抗虫棉的选育中已发挥了良好的作用^[2]。

要将目的基因导入植物体, 并使之稳定整合于植物基因组中, 获得目的基因稳定表达的转基因植株, 必须借助合适的植物表达载体来实现。本研究

在载体构建中引入了在单子叶植物中表达效率较高的玉米 *Ubi* 启动子^[3- 5], 和在小麦中应用效果较好的筛选标记基因 *bar*^[4], 以及对外源基因表达有一定促进作用的表达调控元件 Ω 序列、Kozak 序列、poly (A) 序列等^[2, 3, 5- 8], 以期获得适合于小麦应用的高效植物表达载体。

1 材料与方法

1. 1 材料

- 1) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株;
- 2) 载体构建用基础质粒情况见表 1。

表 1 基础质粒

Table 1 Basic plasmids involved in the work

质粒 Plasmid	大小/kb Size	抗性标记 Antibiotic resistance	结构 Structure	来源 Source
pAHC20	5.5	Amp ^r	<i>UbiP-intron-bar-nosT</i>	徐惠君研究员惠赠 Given by researcher XU Huijun
pG4AB	5.8	Amp ²	CaMV 35SP- Ω K-cry Ia-4poly (A) -nosT	本课题组构建保存 From our research group

1. 2 方法

含基础质粒的大肠杆菌 DH5 α 菌株在 LB 培养基中培养后, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定确证后再酶切回收大小合适的目的片段, 回收的目的片段按试验设计连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞后, 筛选阳性转化子, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定确

证连接正确后, 按同样的程序进一步构建下一个载体, 直至目标载体构建成功并鉴定正确^[9]。

2 结果与分析

2. 1 植物表达载体 pGU 4ABBar 的构建过程

植物表达载体 pGU 4ABBar 的构建过程如图 1

* [收稿日期] 2001-11-26
[基金项目] 国家“九五”重点科技攻关项目(专题)(96-009-01-14); 杨凌农业生物技术育种中心开放课题资助项目(1999-19)
[作者简介] 侯文胜(1969-), 男, 北京房山人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦基因工程和遗传育种研究。

所示。

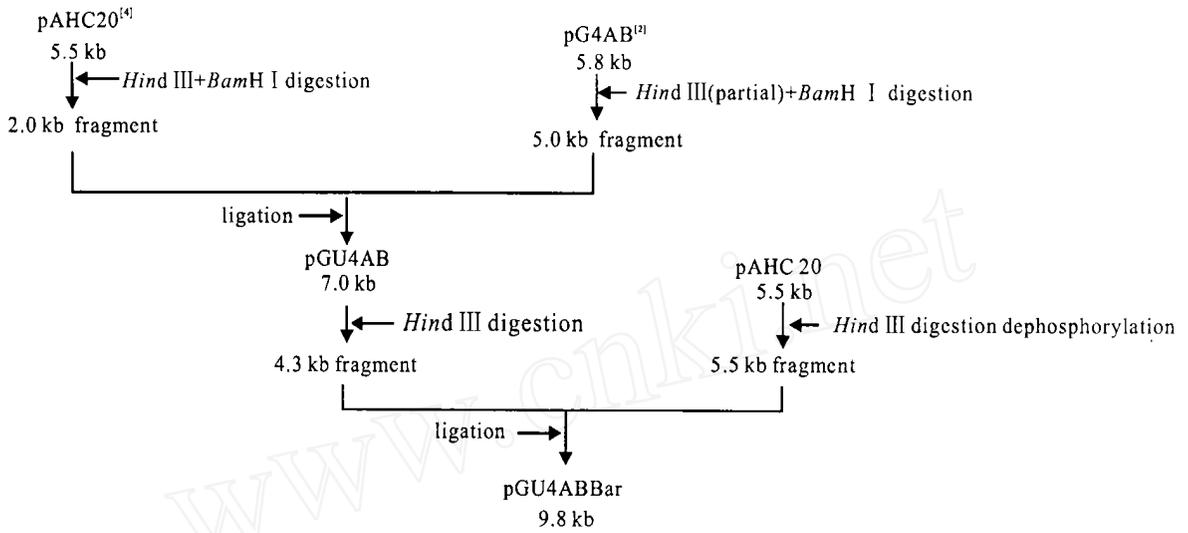


图 1 植物表达载体 pGU 4ABBar 的构建过程

Fig 1 Schematic diagrams for construction outline of plant expression vector pGU 4ABBar

2.2 植物表达载体 pGU 4ABBar 的筛选鉴定

如图 1 所示分别构建中间载体并进行酶切鉴定, 直至获得目的重组质粒 pGU 4ABBar, 其图谱及酶切鉴定结果见图 2, 3。

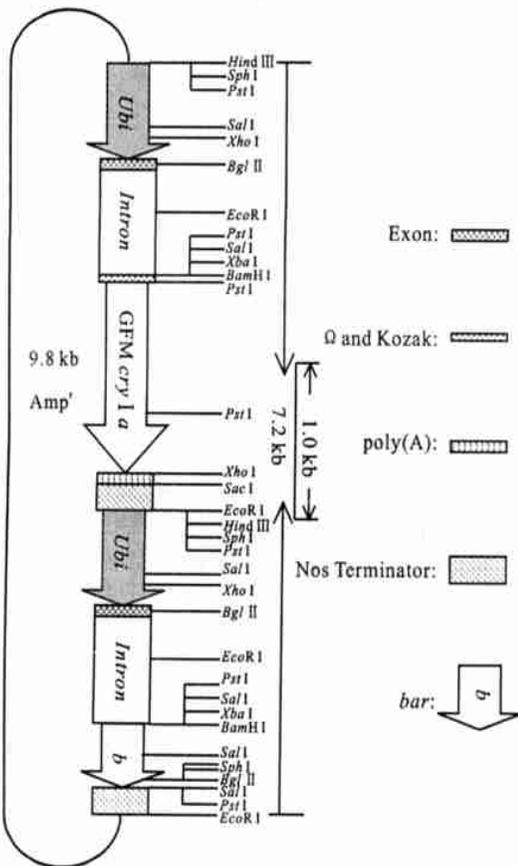


图 2 pGU 4ABBar 质粒图谱

Fig 2 Schematic diagrams of expression vector pGU 4ABBar

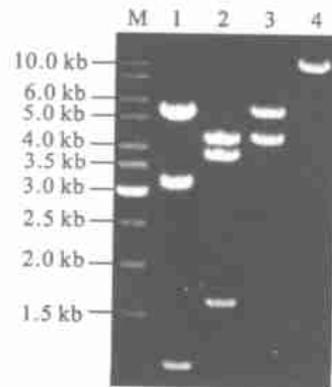


图 3 表达载体 pGU 4ABBar 的酶切分析

M. 1 kb DNA 分子质量标准; 1. *Xho* I; 2. *Bgl* II; 3. *Hind* III; 4. *Sac* I

Fig 3 Restriction endonuclease analysis of the expression vector pGU 4ABBar

M. 1 kb DNA ladder; 1. *Xho* I; 2. *Bgl* II; 3. *Hind* III; 4. *Sac* I

由图 3 可以看出, pGU 4ABBar 质粒 DNA 经 *Sac* I 单酶切后出现了约 9.8 kb 的目的带, *Hind* III 单酶切后出现了约 5.5 和 4.3 kb 两条目的带, 证明有目的片段插入, *Xho* I 单酶切后出现了约 5.5, 3.2 和 1.1 kb 3 条目的带, *Bgl* II 单酶切后出现了约 4.3, 3.9 和 1.6 kb 3 条目的带, 证明 *cry1a* 和 *bar* 基因表达盒呈顺向连接 (如为反向连接 *Xho* I 单酶切后会出现约 5.2, 3.2 和 1.4 kb 3 条目的带, *Bgl* II 单酶切后会出现约 6.3, 1.9 和 1.6 kb 3 条目的带), 与图 2 的图谱相符, 说明获得了 pGU 4ABBar 质粒的正确克隆子, 可用于基因枪、花粉管通道介导的小麦遗传转化工作, 其 *cry1a* 和

bar 基因表达盒呈顺向连接, 在所筛选的克隆子中未获得这两个基因表达盒呈反向连接的克隆子。

3 讨论

在双子叶植物遗传转化中广泛采用的花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 启动子, 在绝大多数单子叶植物中活性较低, 对禾谷类作物并不适合^[3], 而选用合适的启动子可以在一定程度上克服外源基因表达效率低的问题。近年来, 一些源于单子叶植物的启动子已被用于构建适合单子叶植物应用的外源基因表达载体, 其中源于玉米泛素 (ubiquitin) 基因 *Ubi1* 的启动子 *Ubi* 在转基因玉米、水稻、小麦中都有较高的活性, 其效率可以达到 CaMV 35S 启动子的 4~5 倍^[4,5], 在禾谷类作物转基因应用研究中价值较高。

烟草花叶病毒 (TMV) 富含 TTAAC 序列的非翻译前导序列通常称为 Ω 序列, 能与真核 80S、原核 70S 核糖体结合, 促进外源基因在真核细胞及原核细胞体内或体外的表达, 常作为翻译增强子用于植物基因工程^[6], TMV Ω 序列的增强作用已在许多研究中被证实, 它在双子叶植物原生质体中可提高 *GU S mRNA* 表达量 18~20 倍, 在单子叶植物如水稻原生质体中也能提高 *GU S mRNA* 表达量 3~17 倍, 但在禾谷类作物植株中的效果似乎并没有如此明显, 研究报道也很少^[5,7]。Kozak 序列是指在动植物基因的起始密码子 ATG 之前存在的特定序列, 它的存在与否也会对基因的表达水平产生影响^[8], 但在禾谷类作物中尚未见研究报道。

有研究表明^[3], 植物细胞中 mRNA 的稳定性与多聚腺苷酸 (polyadenylic acid) 化序列 poly (A) 的加入速度及长度有关, 基因转录成 mRNA 后, 如果不能及时加入多聚腺苷 poly (A) 尾巴, 将会很快被核酸外切酶降解。mRNA 在细胞内存在的半衰期越长, 经翻译产生的蛋白量就有可能越多, 因此, poly (A) 序列的加入似乎可以增加 mRNA 的稳定性, 从而利于基因产物的稳定表达。郭三堆等^[2]在国产抗虫棉的研制过程中所采用的植物表达载体就含有 Ω 、Kozak 和 poly (A) 序列, 并对抗虫基因的高效表达起到了一定的促进作用。

快速准确地有效识别转化体是小麦遗传转化的一个关键环节, 目前用于小麦转化体筛选的抗生素抗性基因主要有可编码卡那霉素、新霉素、巴龙霉素等抗性的新霉素磷酸转移酶 (neomycin phosphotransferase) *np t II* 基因和可编码潮霉素 (hygromycin) 抗性的潮霉素磷酸转移酶 (hygromycin phosphotransferase) *hpt* 基因。但是, 许多研究认为^[10,11], 这些基因在用于小麦转化体筛选时并不理想, 多数小麦基因型对卡那霉素具有较高的天然抗性, 成为其在小麦中应用的限制因素, 在用其进行筛选时非转化体逃逸现象较为严重, 并且在选择性上对真正的转化体也并不一定具有专一性。用 G418 和巴龙霉素作筛选试剂在一定程度上可克服这一缺点, 但在应用时间和材料上仍有很大的局限性。*hpt* 基因提供的潮霉素抗性虽是水稻、玉米转化中的理想筛选标记, 但有研究表明^[12], 其对小麦分化有着严重的影响, 并不适用于小麦转化细胞的筛选, 然而也有研究者不同意这一论断, 认为可通过适当的潮霉素、激素浓度调节措施来改善这一局面^[13]。与抗生素抗性基因相比, 用除草剂抗性基因筛选作用明显, 检测方法简便可靠, 因此近年来研究应用较多, 其中以 *bar* 基因最为典型, 它的表达产物可以提供对草丁膦 (phosphinothricin, PPT) 类除草剂的抗性, 用含相应有效成分的除草剂进行筛选可以收到较为明显的效果^[4]。

本研究以质粒 pAHC 20 和 pG4AB 为基础, 成功构建了适用于小麦的植物表达载体 pGU 4AB*bar*, 该载体含有顺向连接的 *Ubi-cry 1a* 及 *Ubi-bar* 基因表达盒, 可用于基因枪、花粉管通道法等介导的小麦遗传转化。在载体构建中引入了在单子叶植物中表达效率较高的启动子 *Ubi* 及其内含子, 和在小麦中应用效果较好的筛选标记基因 *bar*, 以及 Ω 序列、Kozak 序列、poly (A) 序列等表达调控元件, 以期提高外源基因的表达效率和对转基因植株进行有效筛选。目前本课题组利用该载体进行的基因枪、花粉管通道法介导的小麦遗传转化研究中都已获得了外源基因表达良好的小麦转基因植株 (研究结果将另文发表), 说明这一载体构建策略是有效的。

[参考文献]

[1] 中国农业年鉴编写组. 中国农业年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1990-1999.

[2] 郭三堆, 崔洪志, 倪万潮, 等. 双价抗虫转基因棉花研究 [J]. 中国农业科学, 1999, 32 (3): 1-7.

- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [4] Christense A H, Quail P H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants [J]. Transgenic Research, 1996, 5: 213- 218
- [5] 郭殿京, 傅容昭, 李文斌, 等. 小麦中外源基因表达调控研究及免防御素 (NP-1) 基因的转化 [J]. 遗传学报, 1999, 26 (2): 168 - 173
- [6] Gallie D R, Walbot V. The 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcript *in vivo* and *in vitro* [J]. Nucleic Acids Research, 1989, 15 (8): 3257- 3273
- [7] Mitsuhashi L, U gaki M, Hirochika H, et al. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants [J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37: 49- 59.
- [8] Kozak M. Completion and analysis of sequences upstream from translational site in eukaryotic mRNAs [J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12 (2): 857- 872
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Takumi S, O tani M, Shimada T. Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment [J]. Plant Science, 1994, 103: 161- 166
- [11] Nehra N S, Chibbar R N, Leung N. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs [J]. The Plant Journal, 1994, 5 (2): 285- 297.
- [12] Weeks T J, Anderson O D, Blechl A E, et al. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077- 1084
- [13] Ortiz M I, Reggiardo R A, Ravizzini R A, et al. Hygromycin resistant as an efficient selectable marker for wheat stable transformation [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 877- 881.

Construction of high-level expression vector based on *cry Ia* gene for use in wheat transformation

HOU Wen-sheng¹, GUO San-du², LUM ing¹

(1 Yangling Branch of China Wheat Improvement Center, College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In the report, the maize ubiquitin 1 promoter *Ubi*, a high efficiency promoter in gramineous crop, had been introduced into the original plasmid with *cry Ia* gene. Expression box of *bar* gene had also been inserted as a selectable marker. In order to improve the expression level of the target genes, Ω -Kozak sequence and poly (A) sequence were added to the 5'-end and 3'-end of the target genes, respectively. The insect-resisting gene wheat expression vector pGU4ABBar had been constructed. pGU4ABBar contains direct inserted expression box of *Ubi-cry Ia* and *Ubi-bar*. It is suitable for genetic transformation of wheat mediated by microprojectile or pollen-tube pathway. The *cry Ia* gene, a synthetic insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*, may code a poisonous protein for *Lepidoptera*.

Key words: expression vector; promoter; gene; plasmid; wheat