

研究报告

Research Report

西和半夏凝集素抗虫基因克隆及对棉花的遗传转化

张正英¹, 李淑洁², 李静雯², 王红梅²

1. 甘肃省农业科学院, 兰州, 730070

2. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 兰州, 730070

✉ 通讯作者: kegc8@sina.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 42 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0042

收稿日期: 2012 年 05 月 16 日

接受日期: 2012 年 06 月 25 日

发表日期: 2012 年 09 月 25 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 5 期 546-550 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

张正英等, 2012, 西和半夏凝集素抗虫基因克隆及对棉花的遗传转化, 分子植物育种(online) Vol.10 No.42 pp.1312-1316 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0042)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2012, A Gene Encoding Agglutinin Cloned from Xihe Banxia (*Pinellia ternata*) and Introduced into Cotton, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.42 pp.1312-1316 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0042)

摘要 采用同源序列克隆方法, 通过设计特异引物克隆甘肃西和半夏(*Pinellia ternata*)凝集素基因 *pta*, 其序列全长 1 069 bp, 编码区 804 bp, 编码 268 个氨基酸残基, 有 3 个典型的甘露糖结合位点, 预测分子量和等电点分别为 29.1 kD 和 7.77, GenBank 登录号 AY725425。构建了 35S 启动子驱动的植物表达载体 pBI-*pta*。建立了陇棉 2 号花粉管通道法遗传转化技术, 获得 5 株卡那霉素抗性和 PCR 检测阳性植株, 为建立棉花转基因方法和培育抗虫种质奠定了基础。

关键词 Xihe Banxia (*Pinellia ternata*) 半夏凝集素; 棉花; 遗传转化; 蚜虫抗性

A Gene Encoding Agglutinin Cloned from Xihe Banxia (*Pinellia ternata*) and Introduced into Cotton

Zhang Zhengying¹, Li Shujie², Li Jingwen², Wang Hongmei²

1. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, 730070;

2. Biotechnology Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, 730070

✉ Corresponding author, kegc8@sina.com; ✉ Authors

Abstract *Pinellia agglutinin gene (PTA)* were homologous cloned from *Pinellia* called Gansu Xihe Banxia (*Pinellia ternata*) based on the designed specific primers, and the gene had 1 069 bp full-length sequence including encoding region of 804 bp that encodes 268 amino acid residues and three typical mannose binding sites. The predicting molecular weight and isoelectric point are 29.1 kD and 7.77, respectively. GenBank accession number was assigned to AY725425. We built a 35S promoter-driven expression vector of pBI-*pta* to set up cotton genetic transformation approach by pollen tube pathway technology, and obtained five kanamycin resistant and PCR-positive cotton plants, which might lay the foundation for the establishment of the methods of transgenic cotton and development of insect-resistant cotton germplasm.

Keywords Xihe Banxia (*Pinellia ternata*) agglutinin; Cotton; Genetic transformation; Aphid resistance

研究背景

据统计, 全球粮食与饲料作物总产量每年因虫害造成的损失达 14%, 直接给农业生产造成的经济损失高达数千亿美元。同翅目害虫蚜虫、稻飞虱和叶蝉等对农业生产造成的危害是严重的, 在直接引起作物的产量损失和品质下降的同时, 还将多种致病病原菌和病毒传播给植物, 加重危害程度。在植物抗虫育种研究中, 应用植物外源凝集素基因转基因技术获得抗虫特性近年来研究较多。在体外或转基因抗虫实验中应用最多的是雪花莲外源凝集素

(GNA), 研究结果显示对烟草夜蛾、豌豆象、飞虱和蚜虫等咀嚼式和刺吸式口器昆虫均有抗性。

半夏(*Pinellia ternata* Schott)为天南星科半夏属植物。凝集素是半夏蛋白的重要组成部分之一, 能专一结合甘露糖, 属于单子叶植物甘露糖凝集素家族(孙册等, 1983; 王克夷和郭猛, 1993)。研究结果显示, 人工饲喂半夏凝集素提取物的量达到 1.2 g/L 时, 对棉蚜发育有明显的抑制作用; 当人工饲喂半夏凝集素提取物的量达到 1.5 g/L 时, 对桃蚜发育有明显的抑制作用(黄大昉等, 1997)。

国内部分实验室应用半夏凝集素基因(*pta*)在水稻(张红宇等, 2003)及百合(唐东芹等, 2004)、菘蓝(许铁峰等, 2003)等植物上开展了转基因研究, 获得了一些转基因工程植株, 显示出良好的抗虫性能和应用前景。

甘肃西和半夏是半夏之精品, 享有盛誉。本研究克隆了甘肃西和半夏凝集素完整基因, 通过花粉管通道法开展了棉花转基因研究, 旨在建立棉花转基因方法和培育抗虫种质。

1 结果与分析

1.1 半夏凝集素基因(*pta*)扩增

扩增模板 DNA 为提取纯化的半夏叶片基因组 DNA, 特异引物为 *pta*-F、*pta*-R, 通过 PCR 扩增获得目的基因片段长度约 1 000 bp, 长度与实验设计预期结果一致(图 1)。

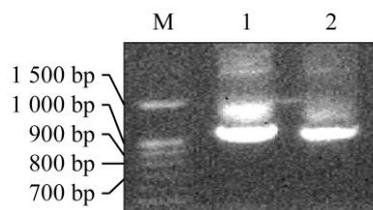


图 1 PCR 扩增半夏 DNA 片段

注: M: 100 bp DNA marker; 1,2: PCR 产物

Figure 1 DNA fragment of *Pinellia ternate* amplified by PCR

Note: M: 100 bp DNA marker; 1,2: PCR product

1.2 目的基因的克隆与鉴定

按照回收试剂盒说明, 纯化回收 PCR 扩增产物, 将其连接到 pGEM-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 。少量提取重组质粒用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切及 PCR 进行鉴定(图 2), 结果都出现了大约 1 000 bp 的序列片段, 其长度与扩增片段相符。证明 pGEM-T 载体构建是正确的(图 2)。

1.3 半夏凝集素基因(*pta*)序列及其编码氨基酸分析

pta 序列测定结果表明(图 3), 扩增片段全长为 1 069 bp, 应用 DNAMAN 6.0 对序列进行分析, 在序列的 29~835 nt 处发现一连续 ORF, 第 29~31 nt 处是该序列的转录起始密码子 ATG, 833~835 nt 为终止密码子, 全编码区为 804 bp, 编码一条 268 个氨基酸残基的多肽, 预测分子量 29.1 kD, 等电点为 7.77。5'端非编码区(5'UTR) 28 bp, 3'端非编码区(3'UTR) 234 bp。在 poly(A)上游存在典型的真核生物基因 poly(A)的信号序列-AATAAA。第 27~120 位

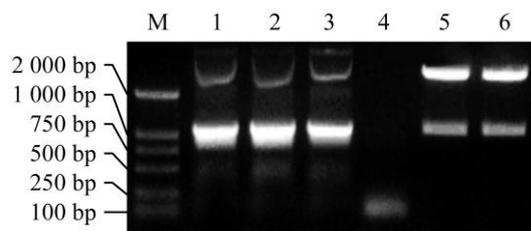


图 2 pGEM-T-*pta* 重组质粒 PCR 及酶切鉴定

注: M: DL2000 DNA marker; 1,2,3: PCR 扩增产物; 4: 阴性对照; 5,6: *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切产物

Figure 2 Identification of pGEM-T-*pta* by PCR and Enzymatic digestion

Note: M: DL2000 DNA marker; 1,2,3: PCR Dproduct; 4: Negative control; 5,6: Digesting products by *Xba* I, *Sma* I

氨基酸残基、第 144~177 位氨基酸残基分别为两个保守结构域, 第 1 个结构域含 1 个甘露糖结合位点, 第 2 个结构域含 2 个甘露糖结合位点, 具有甘露糖结合植物凝集素的典型特征(Lin et al., 2006); 分析 *pta* 编码蛋白 N-末端序列, 发现序列中 N-端有 21 个氨基酸残基的信号肽, 剪切位点位于第 24 位的丙氨酸(A24)和第 25 位的缬氨酸(V25)之间; 前端 33 个氨基酸和中间区域第 118~155 位的 37 个氨基酸残基主要是由一些疏水性氨基酸组成的肽链, 其余区域以亲水性氨基酸组成, 从整体来看, *pta* 在一级结构上以亲水性为主。*pta* 已在 GenBank/EMBL 中登记, 登录号 AY725425。与已报道的同科 PTA 基因核苷酸序列比对分析显示, 该基因序列也有相似的保守序列域和 QXDXNXVXY(QDNVY)甘露糖结合识别区, 因而推测也应具有相同的抗虫功能。

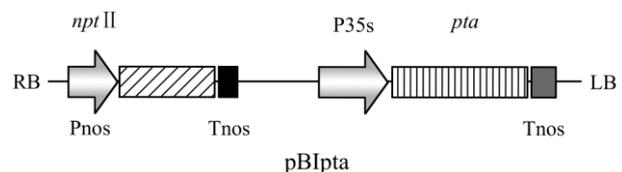


图 3 表达载体 pBI-*pta* 结构简图

Figure 3 The scheme of plasmid pBI-*pta*

1.4 表达载体 pBI-*pta* 的构建与鉴定

用 *Xba* I 和 *Sma* I 限制性内切酶对质粒 pGEM-*pta* 进行酶切, 回收 1 069 bp 的目标片段。用 *Xba* I 和 *Sma* I 限制性内切酶消化 pBI121 质粒后, 补平经 *Sma* I 粘端, 然后将回收的 *pta* 基因通过粘端(*Xba* I)-粘端(*Xba* I)、平端(*Sma* I)-平端(*Sma* I)连接, 得到由 CaMV 35S 启动子驱动的 *pta* 基

因的植物表达载体 pBI-*pta* (图 3), 导入 *E. coli* DH5 α 。进行酶切和 PCR, 均得到一条 1 069 bp 目标片段, 说明 pBI-*pta* 植物表达载体的构建是正确的, 可以用于基因转化研究。

1.5 转基因棉花植株及其后代的抗性筛选和分子鉴定

以陇棉 2 号为受体材料, 做 2 000 个导入处理, 收获 T₀ 棉铃共 130 个, 导入材料成铃率为 6.5%。

将 T₀ 棉铃种子按单粒种植, 经卡那霉素筛选获得 T₁ 抗性植株 5 株, 单株收获并进行室内考种。抗性植株与对照田间调查和室内考种发现, 两者在植株形态与经济性状上无明显差别。

用 2 500 mg/L 卡那霉素连续涂抹棉花第一片真叶 7 d 后, 对照及导入材料仅有个别植株(<5%)有叶片变薄、变大和发黄症状; 4 000 mg/L 卡那霉素涂抹 5~7 d 后, 约有 50% 以上植株叶片明显黄化或出现黄色斑点; 6 000 mg/L 卡那霉素涂抹 3~6 d 后, 约 50%~96% 植株黄化(图 4)。在后续转基因棉花的筛选中直接选用了 6 000 mg/L 卡那霉素作为筛选浓度、筛选周期为 6 d, 每批转基因材料筛选周期缩短约 14 d。

T₂ 植株中, 23 株卡那霉素 6 000 mg/L 的黄化植株 PCR 扩增没有出现 *pta* 和 *npt* II 目的条带; 14 株抗性植株中有 6 株扩增出了 *npt* II 的目的条带(图 5), 但都没有扩增出 *pta* 基因。PCR 分子鉴定结果初步表明, 外源 *npt* II 已整合到棉花的基因组中。

2 讨论

在早先的实验中, 证明所克隆的半夏凝集素基因具有较好的抑制蚜虫效果, 转基因烟草植株的蚜口密度抑制率在 25.5%~89.4%, 平均蚜口密度抑制率为 56.2% (张正英等, 2010)。本研究通过花粉管通道法将半夏凝集素基因直接转入棉花品种陇棉 2 号中, 通过抗性筛选和 PCR 分析证明获得了转基因后代。对 T₁ 抗性植株在伏蚜期田间调查单株蚜量, 以棉株顶部 5 叶中受害叶最重叶片为标准叶, 结果初步显示抗性植株对棉蚜表现中抗水平, 抗性植株蚜害减退率较对照高 10%。抗虫性是否稳定表达, 需要继续验证。

花粉管通道法操作简单, 转化成本较低, 为农作物育种提供了创造新种质的新途径。多数利用花粉管通道法获得转化棉花后代的研究报告, 提供了分子生物学证据(翁坚等, 1984; 郭三堆等, 1999; 邓德旺等, 1999)。但是, 转化后代假阳性植株多, 鉴



A



B



C

图 4 6 000 mg/L 卡那霉素筛选转化棉花

Figure 4 Transgenic cotton identified by kanamycin selection with 6 000 mg/L

定工作量大, 总体转化效率低(周小云等, 2008, 生物技术, 18(2): 93-95)。本研究从 6 000 mg/L 卡那霉素抗性植株中检测出了报告基因 *npt* II, 而非抗性植株没有扩增出 *npt* II 基因, 说明 6 000 mg/L 卡那霉素的筛选是可靠的。但这个浓度比刘方等(刘方等, 2008, 中国棉花, (8): 16)建议的要高, 与马纪等(2008)相同。

在经卡那霉素抗性筛选的 PCR 分子鉴定中, 没有扩增到 *pta*, 可能与马盾等(马盾等, 2007, 新疆农业科学, 44(S3): 105-107)报道的外源基因丢失和外源 DNA 的遗传不稳定有关。

本研究中选用了 4 种不同的受体材料, 所做处理数相同, 但只有陇棉 2 号得到的转化植株, 这是

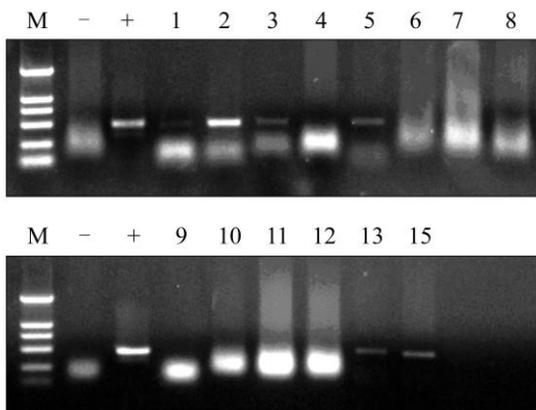


图 5 棉花抗性植株 *npt II* 扩增结果
注: M: DL2000 DNA marker; 1~15: 抗性植株; -: 未转基因对照; +: 阳性对照
Figure 5 *npt II* amplification of cotton resistant plants
Note: M: DL2000 DNA marker; 1~15: Transgenic plant; -: Non-transgenic plant; +: Positive control

否说明花粉管通道法成功与否也与基因型依赖有关, 仍需要做进一步的实验分析。

3 材料与方

3.1 试验材料和试剂

本实验用西和半夏无菌苗、大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、植物表达载体 pBI121 由本实验室保存。*Taq* DNA Polymerase、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶购自大连宝生物公司, Rnase、GEM-T vector、DNA 回收试剂盒等分别购自 Sigma 公司、Promega 公司和中科开瑞生物公司。

参照 Genbank 半夏凝集素基因(AY191305.1)的核心序列, 以及 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点, 设计了 PCR 扩增正、反向特异引物。引物由大连宝生物公司合成。

以甘肃省棉花主栽品种陇棉 2 号(代号 k9505, 白棉)为实验材料。

3.2 半夏凝集素基因(*pta*)的扩增

按照 CTAB 法(王关林和方宏筠, 1998)提取半夏模板 DNA 进行 PCR 扩增和产物回收, 方法见参考文献(张正英等, 2010)。

3.3 扩增产物的克隆及鉴定

依照说明将扩增的 PCR 产物克隆到 T-easy 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 。通过蓝白斑筛选、重组质粒限制性内切酶双酶切和 PCR 扩增产物的电泳结果进行鉴定。

3.4 序列测定与分析

阳性克隆送大连宝生物公司测序。测序结果用 BLAST 和 DNAMAN 6.0 软件分析。

3.5 植物表达载体的构建

按照张正英等(2010)叙述方法进行载体构建。

3.6 花粉管通道法介导的棉花遗传转化

参照《分子克隆》实验指南提取待转化质粒。参照刘方等介绍方法(刘方等, 2008, 中国棉花, (8): 16)进行转化, 方法略有修改。先沿纵轴插入至子房中轴约 2/3 处, 然后再退至约 1/3 处开始注射。涂抹赤霉素溶液(浓度 40 mg/kg)于处理铃柄基部, 以减轻幼铃脱落。同时, 对转基因铃绑线以区分非转基因处理棉铃。质粒浓度 10~20 μ g/mL, 每朵花注射用量 10 μ 。

3.7 导入材料的田间筛选和室内分析

将收获的处理棉花种子种植于大田。利用 4 000~5 000 mg/L 的卡那霉素在 T₁ 棉花苗期、盛蕾期喷涂倒 2 叶, 选出抗性植株, 单独收获。

将 T₂ 棉铃种子按单粒种植, 待长出第一片真叶时进行 2 500 mg/L 的卡那霉素溶液涂抹, 每天分早、中、晚 3 次涂抹, 连续 7 d。统计棉花叶片的变化情况。表现为抗性的材料进一步进行 4 000 mg/L、6 000 mg/L 的卡那霉素抗性检测。对检测到的抗性植株做 PCR 检测。

作者贡献

张正英是项目负责人, 指导实验设计和数据分析, 完成论文写作和修改。李淑洁、李静雯和王红梅是研究的执行人, 分别开展了部分试验研究, 完成了相应的数据分析。

致谢

本文由基金项目甘肃省科技支撑项目(1104WCGA188)以及甘肃省农业生物技术应用与开发项目(GNSW-2006-05)资助完成。在项目实施过程中, 得到了甘肃省农业科学院作物所棉花课题组张秉贤研究员和冯克云副研究员的大力支持, 对此表示衷心感谢。

参考文献

- Deng D.W., Guo S.D., and Yang Z.M., 1999, Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 32(6): 113-114 (邓德旺, 郭三堆, 杨志民, 1999, 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究, 中国农业科学, 32(6): 113-114)
- Guo S.D., Cui H.Z., Xia L.Q., Wu D.L., Ni W.C., Zhang Z.L.,

- Zhang B.L., and Xu Y.J., 1999, Development of bivalent insect-resistant transgenic cotton plants, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 32(3): 1-7 (郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 武东亮, 倪万潮, 张震林, 张保龙, 徐英俊, 1999, 双价抗虫转基因棉花研究, *中国农业科学*, 32(3): 1-7)
- Lin J., Zhou X.W., Fei J., Liao Z.H., Jin W., Sun X.F., and Tang K.X., 2006, Genomic cloning and characterization of a PPA gene encoding a mannose binding lectin *Pinellia pedatisecta*, *Biocell*, 30(1): 15-25 PMID:16845824
- Ma J., Li C.P., Qiu L.M., Xu J.H., Zhao G., and Li S.L., 2008, Screening of transgenic cotton with an insect (*Microdera pun-tipennis dzungarica*) antifreezing protein gene via pollen-tube pathway, *Xinjiang Nongye Kexue (Xinjiang Agricultural Sciences)*, 45(3): 381-385 (马纪, 李春平, 邱立明, 徐建辉, 赵干, 李素丽, 2008, 花粉管介导的准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白转基因棉花的筛选, *新疆农业科学*, 45(3): 381-385)
- Huang D.P., Pan Y.H., Zhang S.X., Cao J.P., Yang X.M., Zhang J., and Yin W.Z., 1997, The discovery of insecticidal protein against aphids from *Pinellia pedatisecta* and *P. ternata*, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 30(2): 94 (黄大昉, 潘映红, 张淑香, 曹景萍, 杨雪梅, 张杰, 尹蔚庄, 1997, 从掌叶半夏和半夏中发现对几种蚜虫有致死活性的蛋白, *中国农业科学*, 30(2): 94)
- Sun C., Xu J.H., Zhai S.K., Tao Z.J., Zhu Z., Yan T.Y., and Shen Z.W., 1983, Some biological properties of pinellin, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 1983, 15(4): 334-338 (孙册, 徐继华, 翟世康, 陶宗晋, 朱政, 严泰英, 沈昭文, 1983, 半夏蛋白的若干生物学性质, *生物化学与生物物理学报*, 15(4): 334-338)
- Tang D.Q., Qian H.M., Tang K.X., and Huang D.F., 2004, Genetic transformation of lily with pBIXPTA gene by *Agrobacterium tumefaciens*, *Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science))*, 22(2): 135-137 (唐东芹, 钱虹妹, 唐克轩, 黄丹枫, 2004, 根癌农杆菌介导的半夏凝集素基因 pBIXPTA 对百合的转化, *上海交通大学学报(农业科学版)*, 22(2): 135-137)
- Wang G.L., and Fang H.J., eds., 1998, Theory and technology of plant genetic engineering, Science Press, Beijing, China, pp.53-178 (王关林, 方宏筠, 编著, 1998, 植物基因工程原理与技术, 科学出版社, 中国, 北京, pp.53-178)
- Wang K.Y., and Guo M., 1993, Purification of lectin from *Pinellia ternata*, *Shengwu Huaxue Zazhi (Chinese Biochemical Journal)*, 9(5): 544-548 (王克夷, 郭镭, 1993, 半夏凝集素的分离纯化和在植物中的分布, *生物化学杂志*, 9(5): 544-548)
- Weng J., Sheng R.F., Wang Z.F., Chen K.Q., Yang W.X., Gong Z.Z., Zeng Y.S., Zhou G.Y., Huang J.Q., Qian S.Y., and Liu G.L., 1984, A molecular demonstration of the introduction into cotton embryos of exogenous DNA, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 16(3): 325-327 (翁坚, 沈慰芳, 王自芬, 陈克勤, 杨晚霞, 龚蓁蓁, 曾以申, 周光宇, 黄骏麒, 钱思颖, 刘桂玲, 1984, 外源 DNA 导入棉花的分子验证, *生物化学与生物物理学报*, 16(3): 325-327)
- Xu T.F., Zhang L., Liu C.H., Tan Q.M., Tang K.X., Guo M.L., Qiao C.Z., and Zhang H.M., 2003, *Agrobacterium tumefaciens* mediated transgenic tetraploid *Isatis indigotica* carrying antiinsect gene from *Pinellia ternata* agglutinin (II), *Zhongcaoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 34(9): 846-849 (许铁峰, 张磊, 刘成洪, 谭秋敏, 唐克轩, 郭美丽, 乔传卓, 张汉明, 2003, 四倍体菘蓝转抗虫基因研究 II. 转半夏凝集素基因菘蓝的分子生物学检测, *中草药*, 34(9): 846-849)
- Zhang H.Y., Wu X.J., Tang K.X., Wang X.D., Sun X.F., and Zhou K.D., 2003, A primary study of transferring the *Pinellia tenata* agglutinin (*pta*) gene into rice and expression, *Yichuan Xuebao (Acta Genetic Sinica)*, 30(11): 1013-1019 (张红宇, 吴先军, 唐克轩, 汪旭东, 孙小芬, 周开达, 2003, 半夏凝集素基因(*pta*)导入水稻及其表达的初步研究, *遗传学报*, 30(11): 1013-1019)
- Zhang Z.Y., Ling L.J., Wang H.M., Li S.J., and Li J.W., 2010, Cloning and transformation of *pta* gene and inhibitory effects of the transgenic tobacco plants on development of aphid populations, *Zhiwu Baohu (Plant Protection)*, 36(6): 21-25 (张正英, 令利军, 王红梅, 李淑洁, 李静雯, 2010, 半夏凝集素基因的克隆及转基因烟草对蚜虫的抑制作用, *植物保护*, 36(6): 21-25)