

龙丽坤,李飞武,李葱葱,等.复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律[J].江苏农业科学,2014,42(12):29-33.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.008

# 复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律

龙丽坤,李飞武,李葱葱,武奉慈,宋新元

(吉林省农业科学院,吉林长春 130033)

**摘要:**应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量检测转基因玉米 MON89034 × NK603 的 3 个复合性状转基因玉米中 Cry1A.105、Cry2Ab2、CP4-EPSPS 蛋白在各组织中的表达量,分别取苗期和心叶期叶片、吐丝期花粉和花丝、灌浆期籽粒、雌穗顶端和茎髓组织进行检测。结果显示,3 个转基因品种中,外源基因在各组织中的表达显示较高的一致性,均在叶片组织表达最高。转化体同一组织中表达外源蛋白在品种间变异不明显,组织间差异大于品种差异。

**关键词:**复合性状转基因玉米;ELISA;外源蛋白;时空表达规律

**中图分类号:**S513.035.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)12-0029-05

自 1998 年首例转基因玉米被批准商业化以来,转基因玉米种植面积不断扩大,随着转基因技术快速发展,新一代转基因植物及复合性状转基因植物不断涌现<sup>[1]</sup>。2011 年,全球共有 16 个国家种植转基因玉米,种植面积达到 5 100 万 hm<sup>2</sup>,占全球玉米种植总面积的 32%。抗虫耐除草剂复合性状转基因玉米种植面积近 12 年来不断增长,2012 年种植面积达 2 029 万 hm<sup>2</sup>,比 2011 年增长 10.9%。复合性状转基因玉米已逐渐取代了单一性状转基因玉米,成为市场主导<sup>[2]</sup>。然而,转基因大面积种植后引起的生态环境安全问题也引起了人们的广泛关注<sup>[3-4]</sup>。因此,对复合性状转基因玉米在不

同栽培条件下外源蛋白时空表达成为转基因环境安全评价的关注焦点之一<sup>[5]</sup>。本试验材料为孟山都公司选育的 DK007YGRR、DK008YGRR、NC6304YGRR 等 3 个复合性状转基因玉米品种,这 3 个品种均以 MON89034 和 NK603 为亲本杂交选育而成,具有来自父本的 Cry1A.105 和 Cry2Ab2 杀虫蛋白基因和母本的 CP4-EPSPS 蛋白外源基因,表达双价抗虫和耐除草剂的复合性状。本研究采用 ELISA 方法对 3 个复合性状转基因玉米不同时期、不同组织进行外源蛋白表达的实时检测,研究复合性状转基因玉米抗虫和耐除草剂基因的时空表达规律。同时,以本品种的同型对照品种以及当地主栽品种作为阴性对照开展外源蛋白组织表达测定,以期阐明杂交种外源蛋白时空表达规律,为杂交选育复合性状转基因玉米环境安全评价方案提供参考依据。

收稿日期:2014-02-27

基金项目:中国博士后面上项目(编号:2011M500626);吉林省科技发展计划(编号:20130522075JH);转基因生物新品种培育重大专项(编号:2014ZX08011-003)。

作者简介:龙丽坤(1976—),女,吉林长春人,博士,副研究员,从事转基因植物环境安全检测方向研究。Tel:(0431)87063122;E-mail:longlikun@126.com。

通信作者:宋新元,副研究员,从事转基因环境安全评价研究。E-mail:songxinyuan1980@163.com。

## 参考文献:

- [1] Searles L L, Jokerst R S, Bingham P M, et al. Molecular cloning of sequences from a drosophila RNA polymerase II locus by Element transposon tagging[J]. Cell, 1982, 31(3 Pt 2): 585-592.
- [2] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [3] Hofstetter H, Schamböck A, van Den Berg J, et al. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA). poly(dT) method[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 454(3): 587-591.
- [4] Ren B Z. Biochemistry and clinical medicine[M]. Changsha: Hunan Science and Technical Press, 1993.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

阳性转基因玉米材料 3 个,品种名为 DK007YGRR、DK008YGRR、NC6304YGRR,同型对照阴性玉米样品分别为 DK007、DK008 和 NC6304,由美国孟山都公司提供。当地主

- [5] 瞿礼嘉. 现代生物技术[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [6] Yang X M, Xie L, Hu Z Y, et al. A method of screening an arrayed cDNA library by PCR[J]. Chinese Biochemical Journal, 1997, 13(5): 505-508.
- [7] 杨晓明,谢玲,胡志远,等. PCR 介导的 cDNA 文库矩阵排列筛选方法[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(5): 14-17.
- [8] 瞿礼全,金治平,赵德修,等. 快速简便筛选 cDNA 文库的 SSS 法[J]. 遗传, 2003, 25(5): 583-586.
- [9] 王志成,蒋建雄,钟军,等. PCR 快速筛选棉纤维 cDNA 文库分离全长 cDNA 序列[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2005, 31(3): 272-275.
- [10] Israel D I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(11): 2627-2631.
- [11] Alfandari D, Darribère T. A simple PCR method for screening cDNA libraries[J]. PCR Methods and Applications, 1994, 4(1): 46-49.

裁品种对照 ZD958 和 CP619 为当地大田推广材料,购于种子公司。3 个转基因玉米材料均为 MON89034(双价抗虫)和 NK603(耐除草剂)杂交选育的复合性状品种。

主要化学试剂采购于 Sigma 公司。

## 1.2 田间试验设计和取样方法

1.2.1 小区设计 NC6304YGR 和其同型对照 NC6304、主栽品种对照 ZD958 种植于吉林省公主岭市;DK007YGR、DK008YGR,同型对照 DK007、DK008,主栽品种 CP619 种植于广西;每小区面积为  $30\text{ m}^2$  ( $6\text{ m} \times 5\text{ m}$ ),3 次重复,随机区组排列。

1.2.2 播种时间与方法 吉林省 2012 年 5 月 12 日播种,常规播种方式,播种后按当地常规耕作管理模式进行管理。广西壮族自治区 2012 年 4 月 20 日播种,常规播种方式,播种后按当地常规耕作管理模式进行管理。

1.2.3 取样方法 分抽雄前、抽丝、灌浆初期和乳熟末期 4 个时期取样,取样部位:苗期叶片、心叶期叶片、花粉与花丝、籽粒、雌穗顶端和茎髓,取样后用液氮速冻,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰柜保存。

## 1.3 ELISA 试验方法

1.3.1 样品处理和蛋白抽提 当在田间对测试材料的各个组织进行采样后,当天放入实验室  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中进行保存,直至全部样品采集完毕,开始样品处理。样品组织在处理时先粉碎成均匀的粉末样本。样品称重后,对 Cry1A.105、Cry2Ab2、CP4-EPSPS 蛋白用  $1 \times$  PBST 进行提取。提取的蛋白样品在 6 h 内进行测试时,保存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下,否则用小管分装保存在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下。

1.3.2 CP4-EPSPS 蛋白检测方法 单克隆小鼠抗 CP4 EPSPS 抗体用含  $50\text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲液和  $0.15\text{ mol/L NaCl}$  的溶液稀释至  $2.0\text{ g/mL}$ ,每孔加  $100\text{ }\mu\text{L}$  稀释的抗体在 96 微孔板上固定,放入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育 8 h 以上。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,分别在各孔对应加入 CP4-EPSPS 蛋白标准液、样本提取液、标准品和样品缓冲液  $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h。秸秆、叶片、花粉、花丝和根样品提取液使用  $1 \times$  PBST/0.1% BSA 溶液稀释;籽粒样品使用  $1 \times$  TBA 稀释。 $1 \times$  PBST 洗板 3 次,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  过氧化物酶偶联的抗 CP4 EPSPS 抗体,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,向孔内加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  TMB,室温静置 10 min,加入  $100\text{ }\mu\text{L}$   $6\text{ mol/L H}_3\text{PO}_4$  终止酶反应。CP4-EPSPS 蛋白水平定量通过绘制  $0.456 \sim 14.600\text{ ng/mL}$  的 CP4-EPSPS 蛋白标准曲线用内插法确定。

1.3.3 Cry2Ab2 蛋白检测方法 小鼠抗 Cry2Ab2 的捕获抗体用包被缓冲液( $9.2\text{ }\mu\text{L}$  单克隆抗体加到  $10\text{ mL } 50\text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  的缓冲液)稀释,最终浓度为  $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,每孔加  $100\text{ }\mu\text{L}$  稀释抗体在 96 微孔板上固定,放入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育 8 h 以上。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,分别在各孔对应加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  Cry2Ab2 蛋白标准液、样品提取液、标准品和样品缓冲液( $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ ),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。 $1 \times$  PBST 洗板 3 次,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  生物素偶联的山羊抗 Cry2Ab2 抗体和 NeutrAvidin-HRP(Pierce)来检测捕获的 Cry2Ab2。 $1 \times$  PBST 洗板 3 次,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  TMB 显色。向各孔中加入  $100\text{ }\mu\text{L}$   $6\text{ mol/L H}_3\text{PO}_4$  终止酶活反应。通过绘制浓度为  $0.219 \sim 7.000\text{ ng/mL}$  的 Cry2Ab2 蛋白标准曲线,用内插法完成定量。

1.3.4 Cry1A105 蛋白检测方法 山羊抗 Cry1A.105 的捕获抗体用包被缓冲液( $50\text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3 + 150\text{ mmol/L NaCl}$ )稀释至终浓度  $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,每孔加  $100\text{ }\mu\text{L}$  稀释抗体在 96 孔微孔板上固定,放入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中孵育 8 h 以上。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次。进行籽粒样本分析时,向各孔加  $100\text{ }\mu\text{L}$  含 9% 脱脂奶粉(NFDM)的  $1 \times$  PBST,再进行封闭,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 ~ 90 min,用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,其他组织样本不进行此步骤。分别在各孔对应加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  Cry1A.105 蛋白标准液或样品提取液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  生物素偶联的山羊抗 Cry1A.105 抗体和 NeutrAvidin-HRP(Pierce)来检测捕获的 Cry1A.105。用  $1 \times$  PBST 洗板 3 次,每孔加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  HRP 底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色。向各孔中加入  $100\text{ }\mu\text{L}$   $6\text{ mol/L H}_3\text{PO}_4$  终止酶活反应。通过绘制  $0.438 \sim 14.000\text{ ng/mL}$  Cry1A.105 蛋白标准曲线,用内插法完成定量。

## 1.4 数据统计和分析

ELISA 研究中采用 Bio-rad iMark™ 微孔板吸收光酶标仪进行检测。Cry1A.105、Cry2Ab2、CP4 EPSPS 蛋白用波长  $450\text{ nm}$  时的吸光度和波长  $655\text{ nm}$  时的参考吸光度来确定其在样品中的表达量,在计算时根据标准蛋白所建立的标准曲线和内插法。蛋白的标准浓度用四参数逻辑曲线模型确定曲线,用内插法确定 Cry1A.105、Cry2Ab2、CP4 EPSPS 蛋白在各样品中的含量,并将结果由  $\text{ng/mL}$  转化为  $\mu\text{g/g}$ (鲜质量)。数据用 ELISA 软件进行归纳分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 组织中外源蛋白表达的差异显著性分析

本试验的 3 个复合性状品种分别在吉林省和广西壮族自治区两地栽种,3 个复合性状转化体,均为 MON89034 和 NK603 的杂交选育品种。3 个转基因玉米材料的遗传背景的外源基因具有来自父本 MON89034 的双价抗虫基因(Cry1A.105、Cry2Ab2)和来自母本的 NK603 耐除草剂基因(CP4-EPSPS)。采样时期分别为苗期(V4)、心叶期(V8)、吐丝期(R1)和灌浆期(R3),各时期采集的组织为 V4 叶片、V8 叶片、R1 花粉和花丝、R3 籽粒、穗尖(雌穗顶端)、茎髓(雌穗着生节茎秆),在各小区中对每个组织材料随机选取 5 株进行蛋白提取。

对 3 个平行小区开展 3 次重复 ELISA 检测,根据  $405\text{ nm}$  吸光度的数值在标准曲线中对照其蛋白在转基因玉米植株中的外源蛋白表达含量。

表 1 统计分析了 3 个复合性状转基因品种 CP4-EPSPS 蛋白在 7 个不同生长时期的组织中的表达情况,结果表明,同一组织内的蛋白表达在品种间多差异不显著,特别是叶片组织,V4 叶片(新鲜)和 V8 叶片(新鲜)的 CP4-EPSPS 蛋白持续稳定地高表达,均约为  $35\text{ }\mu\text{g/g}$ ,其他组织在品种间或有差异,但各组织间表现了更大的差异显著性,方差分析结果见表 2。

表 3 分析了 3 个复合性状转基因品种的 Cry1A.105 抗虫蛋白在 7 个不同生长期组织中的表达,该抗虫蛋白在各组织中表达差异较大。统计分析结果表明,3 个品种同一组织蛋白表达量不同,但差异均不显著,而组织间 V4 叶片、V8 叶

表 1 CP4 – EPSPS 蛋白表达情况

组织	品种名	蛋白表达量(μg/g)				0.05 显著水平
		I	II	III	标准差	
V4 叶片	NC6304YGRR	32.040	53.750	35.690	12.00	a
	DK007YGRR	22.920	39.370	38.340	9.20	a
	DK008YGRR	36.570	34.410	37.770	1.70	a
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
V8 叶片	NC6304YGRR	35.060	29.16	34.480	3.30	a
	DK007YGRR	36.230	30.370	33.700	2.60	a
	DK008YGRR	39.760	30.700	33.470	4.60	a
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
花丝	NC6304YGRR	1.804	1.802	1.664	0.08	e
	DK007YGRR	8.292	14.042	8.160	3.40	cd
	DK008YGRR	7.092	8.666	8.422	0.85	de
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
花粉	NC6304YGRR	13.190	12.656	11.291	9.80	cd
	DK007YGRR	9.1270	10.2440	10.762	8.40	cd
	DK008YGRR	10.7660	13.2220	13.591	15.00	cd
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
茎髓	NC6304YGRR	15.572	12.772	14.066	1.40	bed
	DK007YGRR	15.630	25.710	22.770	5.20	b
	DK008YGRR	13.990	18.970	31.580	9.10	b
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
穗尖	NC6304YGRR	8.228	8.408	9.726	0.82	bc
	DK007YGRR	22.830	15.210	14.630	4.60	de
	DK008YGRR	11.180	5.730	6.540	2.90	de
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
籽粒	NC6304YGRR	7.330	5.770	15.780	5.40	d
	DK007YGRR	1.292	1.540	1.391	0.12	e
	DK008YGRR	2.081	1.624	1.687	0.24	e
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		

注:LOD 为检测极限。

表 2 CP4 – EPSPS 蛋白方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	9 597.436 7	20	479.871 8	22.389 0	0
处理内	900.210 6	42	21.433 6		
总变异	10 497.647 3	62			

注: $LSD_{0.05} = 7.628\ 5, LSD_{0.01} = 10.198\ 9$ 。

片均显著高于其他组织,3 个品种蛋白表达量在穗尖和籽粒上差异显著,在其他组织上差异均不显著,广西的 2 个品种间在同一组织内表达仅在穗尖组织上差异显著,方差分析见表 4。

可见,复合性状的转化体组织表达外源蛋白在转化个体间变异不明显,其表达量与表达蛋白种类有关。组织间的差异大于品种差异,栽培种植条件也是影响其蛋白表达的原因之一。

2.2 抗虫和耐除草剂基因在转化体中的蛋白表达

由图 1、图 2、图 3 可见,转基因植株中耐除草剂蛋白 CP4 – EPSPS 在 V4 叶片、V8 叶片、花粉、茎髓、穗尖、籽粒中表达量均高于 Cry1A. 105、Cry2Ab2 抗虫蛋白,只有在花丝中 3 种蛋白表达量均较低的情况下,Cry2Ab2 蛋白表达量略高于 CP4 – EPSPS。

Cry1A. 4、Cry2Ab2 2 种抗虫蛋白的表达量在 3 个品种中表现趋势也较明显,Cry1A. 105 抗虫蛋白在 V4 叶片、V8 叶片、花粉、穗尖组织中的表达量高于 Cry2Ab2 抗虫蛋白;仅在 3 个品种的花丝、广西品种 DK007YGRR 和 DK008YGRR 茎髓和籽粒中,Cry2Ab2 表达的抗虫蛋白量略高于 Cry1A. 105。

因此,3 个品种显示的耐除草剂和抗虫蛋白的组织表达

规律一致,其外源蛋白的表达量可能与在其亲本来源有关,在亲本中的基因插入位置和表达调控可直接影响到其在杂交品种中的表达。

2.3 植物各组织中外源蛋白的鲜质量含量

如图 4、图 5、图 6 所示,3 个复合性状品种 DK007YGRR、DK008YGRR、NC6304YGRR 在各组织中表达情况也显示出较高的一致性,即营养器官组织(V4 叶片、V8 叶片)的外源蛋白表达量均高于生殖器官(花丝、花粉、穗尖、籽粒、茎髓)。V4 叶片中 3 种外源蛋白表达最高,V8 叶片其次,这一结果可能与叶片中可溶性蛋白含量较高有关。

在 3 个转化体中,NC6304YGRR 各时期的植物组织器官中 Cry1A. 105 蛋白表达量最高,DK007YGRR 其次,DK008YGRR 中表达相对较低。

在植物的营养器官中,NC6304YGRR 的 Cry2Ab2 蛋白表达量最高,而生殖生长阶段中 NC6304YGRR 生殖器官(花丝、花粉、穗尖、籽粒、茎髓)中 Cry2Ab2 蛋白表达量均低于 DK008YGRR。

在苗期和心叶期,3 种转化体叶片中 CP4 – EPSPS 蛋白表达量最高,其中 V4 叶片时期略大于 V8 叶片时期,这种情况可能与前期转化体筛选有关。这一时期叶片的高表达量为草甘膦喷施效果提供了有效保证。

2.4 植物生长条件对转化体外源蛋白组织表达的影响

NC6304YGRR 是在吉林种植和栽培管理的玉米品种,DK007YGRR、DK008YGRR 在广西栽培种,因此植株生长的

表 3 Cry1A. 105 蛋白表达情况

组织	品种名	蛋白表达量(μg/g)				0.05 显著水平
		I	II	III	标准差	
V4 叶片	NC6304YGRR	25.345	27.675	30.815	2.70	a
	DK007YGRR	29.205	30.130	25.610	2.40	a
	DK008YGRR	23.950	24.4	29.185	2.90	ab
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
V8 叶片	NC6304YGRR	20.690	25.595	25.255	2.70	bc
	DK007YGRR	20.470	19.515	29.330	5.40	bc
	DK008YGRR	16.200	23.355	23.085	4.10	c
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
花丝	NC6304YGRR	2.456	1.931	2.503	0.32	fgh
	DK007YGRR	2.677	1.236	1.006	0.91	gh
	DK008YGRR	0.997	1.048	1.402	0.22	h
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
花粉	NC6304YGRR	6.483	6.810	7.605	0.58	d
	DK007YGRR	3.985	4.620	4.358	0.32	de
	DK008YGRR	3.555	6.008	5.823	1.40	de
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
茎髓	NC6304YGRR	5.030	4.665	4.920	0.19	def
	DK007YGRR	4.440	3.585	2.320	1.10	fgh
	DK008YGRR	4.020	3.830	8.320	2.50	def
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
穗尖	NC6304YGRR	8.515	8.665	6.025	1.50	de
	DK007YGRR	7.340	9.385	6.920	1.30	d
	DK008YGRR	4.425	3.340	5.365	1.00	efgh
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		
籽粒	NC6304YGRR	1.848	3.488	4.62	1.40	fgh
	DK007YGRR	1.308	1.819	0.905	0.46	h
	DK008YGRR	1.627	1.137	0.856	0.40	h
	受体对照	< LOD	< LOD	< LOD		

表 4 Cry1A. 105 蛋白方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	5 975.105 0	20	298.755 3	67.423 0	0
处理内	186.104 8	42	4.431 1		
总变异	6 161.209 8	62			

注:  $LSD_{0.05} = 3.468\ 5, LSD_{0.01} = 4.637\ 3$ 。

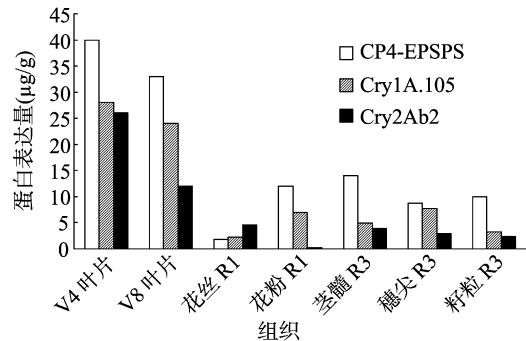


图1 NC6304YGRR组织中外源蛋白的表达

环境条件有所不同。生长在吉林的 NC6304YGRR 的 Cry1A. 105 蛋白表达量基本均大于生长于广西的 DK007YGRR、DK008YGRR。Cry2Ab2 蛋白和 CP4 - EPSPS 蛋白表达量两地各不相同,无明显规律。复合性状转基因品种各组织中的外源蛋白表达量存在差异,且在相同条件栽种的 DK007YGRR、DK008YGRR 蛋白表达量同样存在差异,但差异较小。

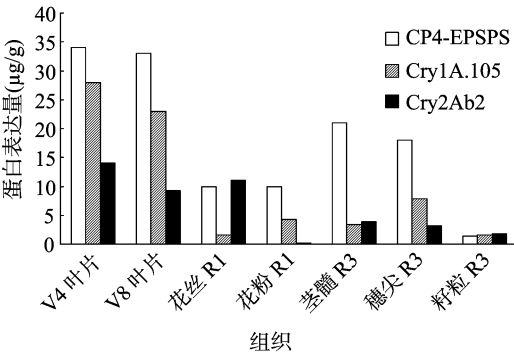


图2 DK007YGRR组织中外源蛋白的表达

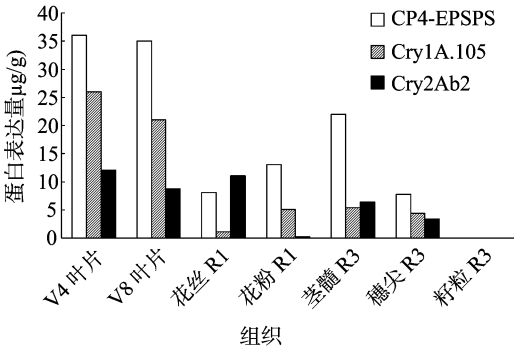


图3 DK008YGRR各组织中的外源蛋白表达

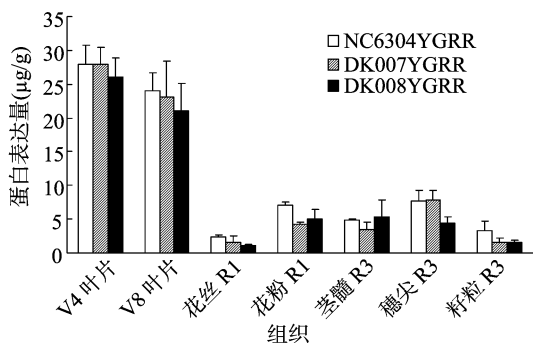


图4 3个转化体植物各组织中 Cry1A.105 蛋白的表达情况

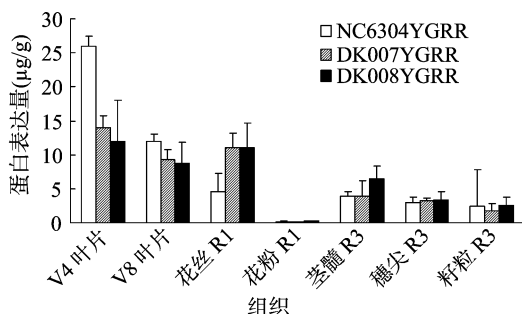


图5 3个转化体各组织中 Cry2Ab2 蛋白的表达情况

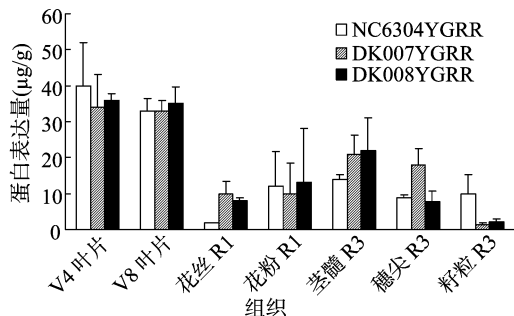


图6 3个转化体植物各组织中 CP4-EPSPS 蛋白的表达情况

### 3 结论与讨论

转基因植株外源基因蛋白在不同生育期不同组织器官表达不同<sup>[6]</sup>,既可能与外界栽培条件有关,也可能与外源基因整合的位点有关<sup>[7]</sup>。当外源基因整合到与生长发育有关的基因附近,外源基因的表达就会受生长发育基因调控序列的调控,随着生长时期的不同而发生变化。

本研究结果表明,在转基因玉米各生长时期中,抗虫 *Bt* 蛋白含量均未明显减少,其抗虫的表达量趋于稳定,能够持续地进行抗虫表达,因此能够达到更好的抗虫效果。在玉米不同生长发育阶段的组织中,苗期叶片转基因蛋白表达量明显高于心叶期叶片。这可能与表达不同时期的环境条件有关,也可能与发育阶段中基因的表达调控相互关联。

在苗期和心叶期,3种转化体中,叶片 CP4-EPSPS 蛋白表达量最高,其中 V4 叶片时期略大于 V8 叶片时期,这种情况可能与前期转化体筛选有关。这一时期叶片的高表达量为草甘膦喷施效果提供了有效保证。3个复合性状品种的 CP4-EPSPS 蛋白均来源于转基因玉米品种 NK603,因此笔者认为,通过杂交育种的复合性状转基因转化体对其亲本的安全评价可作为复合性状杂交种的安全评价的数据参考,其外源基

因表达可能直接决定亲本多种杂交后代中外源基因的表达。

由于 NC6304YGRR 是在吉林种植和栽培的管理玉米材料,DK007YGRR、DK008YGRR 在广西栽种,因此植株生长的环境条件有所不同,组织间外源蛋白表达呈现差异。这与文献中所述转基因植物外源基因表达与生长自然环境条件、栽培管理措施密切相关的结论相一致。而在相同条件下栽种的 DK007YGRR、DK008YGRR 同样存在表达蛋白量的差异,但差异较小。因此,组织表达与蛋白种类相关性更强,即与转入的外源基因的本身构建及插入基因组位置有显著的相关性,该研究结果与其他作物的转基因外源蛋白表达调控影响的研究<sup>[8-9]</sup>相一致。有研究表明,杂交本身对于外源基因的表达存在影响<sup>[10]</sup>,复合性状玉米与其亲本的表达差异和调控,有待于进一步研究。

ELISA 方法是直接检测转基因植物体内外源蛋白表达量的手段之一,具有快速、简单、低耗、结果客观、易判定等特点<sup>[11]</sup>。本试验的 *Bt* 蛋白和 CP4-EPSPS 蛋白最低检出量为 0.5 ng/mL,灵敏度较高。每样品均作平行检测,并设立阴性和空白对照,提高了检测的准确性与可靠性。ELISA 方法的检测也受到检测环境温度、湿度的影响,因此每次检测要在环境相同的条件下进行,并且每次均须同时作空白及标准曲线,以减小误差。穗尖、花丝及花粉的外源蛋白含量比其他部位的含量低,因为这些部分的可溶性蛋白本身含量就低,多为纤维素及其他物质<sup>[12]</sup>。外源蛋白含量用 1 g 鲜质量中含量表示时,结果受样品本身含水量的影响较大,导致有一定的误差。

### 参考文献:

- [1] 谢树章,杨小艳,林清,等. 抗草甘膦转基因玉米研究进展[J]. 中国农业科技导报,2013,15(3):36-41.
- [2] 吕霞,王慧,曾兴,等. 转基因抗虫玉米研究及应用[J]. 作物杂志,2013(2):7-12.
- [3] 梅晓宏,许文涛,贺晓云,等. 新型转基因植物及其食用安全性评价对策研究进展[J]. 食品科学,2013,34(5):308-312.
- [4] 史晓利,杨益众,蔡建华,等. *Bt* 毒蛋白在转基因抗虫玉米中的表达及在亚洲玉米螟中的转移积累[J]. 应用生态学报,2009,20(11):2773-2777.
- [5] 王军辉,王念,张建国,等. 转 *Bt* 基因植物中外源基因时空动态表达的研究现状[J]. 生物技术通报,2004(2):1-4,18.
- [6] 杨影丽,铁双贵,齐建双,等. *Cry1Ac* 基因在玉米中的转化与表达[C]. 2012年全国玉米遗传育种学术研讨会暨新品种展示观摩会论文及摘要集,2012.
- [7] 王家宝,王留明,沈法富,等. 环境因素对转 *Bt* 基因棉 *Bt* 杀虫蛋白表达量的影响[J]. 山东农业科学,2000(6):4-6.
- [8] 王建成,冯远娇,骆世明. *Bt* 玉米抗虫蛋白表达的时空动态及其土壤降解研究[J]. 中国农业科学,2003,36(11):1279-1286.
- [9] 张永军,吴孔明,郭予元. 转 *Bt* 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及对棉铃虫的毒杀效果[J]. 植物保护学报,2001,28(1):1-6.
- [10] 刘海涛,郭香墨,夏敬源. 抗虫杂交棉  $F_1$  代与亲本 *Bt* 蛋白表达量及抗虫差异性研究[J]. 棉花学报,2000,12(5):261-263.
- [11] 张小四,李松岗,许崇任,等. 转 *Bt* 棉不同生长期及不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定[J]. 北京大学学报:自然科学版,2000,36(4):477-484.
- [12] 李葱葱,刘娜,康岭生,等. 转基因抗虫玉米 *Bt* 蛋白表达量的研究[J]. 玉米科学,2006,14(3):40-41.