

李 敏,马祥建,李玉娟,等. 耐盐柳树抗虫基因 *Cry3A* 重组表达载体的构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):108-109.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.025

耐盐柳树抗虫基因 *Cry3A* 重组表达载体的构建

李 敏,马祥建,李玉娟,王 莹,谈 峰,张 健

(江苏沿江地区农业科学研究所,江苏如皋 226541)

摘要:将苏云金芽孢杆菌 *Cry3A* 类抗虫基因经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后与植物表达载体 pCambia1304-C6 连接,构建 pCambia1304-C6-*Cry3A* 重组表达载体,将其转化到农杆菌 LBA4404 中,同时进行双酶切、测序及 PCR 鉴定。结果表明:双酶切及测序产物与预期扩增片段相符,重组表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A* 构建成功;农杆菌 LBA4404 中含有重组质粒,成功构建了 *Cry3A* 农杆菌基因工程菌株。

关键词:柳树;抗虫基因;*Cry3A*;表达载体构建

中图分类号: S722.3⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0108-02

柳树是我国沿海滩涂重要的绿化造林树种之一,当单品种大面积造林时,会造成柳树害虫大面积发生。在江苏南通地区对柳树造成严重危害的是食叶害虫柳蓝叶甲(*Plagiodera versicolora*),它属鞘翅目叶甲科,成虫咬食柳树叶片造成缺刻或孔洞;幼虫多聚集危害幼嫩叶片,高龄幼虫少有单独为害成熟叶片,发生严重时叶片幼虫可高达 30 多头/张,危害严重时能食光柳树初生的嫩芽及嫩叶,影响柳树正常生长,造成严重的经济损失。传统的化学防治方法存在很多弊端,如污染环境,能使害虫产生耐药性^[1]。在基因工程技术飞速发展的今天,转基因技术已成为柳树害虫防治的关注焦点。

本研究针对柳树严重的虫害现象,选用 *Cry3A* 类抗鞘翅目害虫基因^[2],构建抗虫植物表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A*,重组表达载体经 PCR、双酶切及测序鉴定正确后转入农杆菌制备基因工程菌,为今后进行转基因抗虫耐盐柳树育种和耐盐柳树抗虫效用研究奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 大肠杆菌 DH5 α ,根癌农杆菌 LBA4404、pCambia1304-C6 植物表达载体均由北京林业大学生物科学与技术学院提供,含有目的基因的质粒 pUC57-*Cry3A* 由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。

1.1.2 酶和生化试剂 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I, *T*₄ DNA 连接酶、*Taq* DNA 酶[购自生工生物工程(上海)股份有限公司]。胶回收试剂盒及 PCR 产物回收试剂盒[购自宝生物工程(大连)有限公司]。卡那霉素与 LB 培养基所用的胰蛋白胨(trypton)、酵母浸膏(yeast extract)、氯化钠琼脂等[购于生工生物工程(上海)股份有限公司]。

收稿日期:2015-08-25

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)5094];江苏省南通市科技局科技创新计划(编号:HL2013028)。

作者简介:李 敏(1981—),女,江苏如东人,硕士,副研究员,主要从事耐盐林木育种与栽培研究。E-mail:alice04@163.com。

通信作者:张 健,博士,副研究员。E-mail:yjnkyy@sohu.com。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A* 的构建 pUC57-*Cry3A* 质粒和 pCambia1304-C6 质粒载体经大量提取与纯化后,分别用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切,酶切产物经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳,分别回收 pUC57-*Cry3A* 小片段和 pCambia1304-C6 大片段,通过 *T*₄ DNA 连接酶连接这 2 个片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体平板上筛选转化菌落。用 *Cry3A* 基因特异的引物(正向 5'-CACACAGCCAGGGTCGTATT-3',反向 5'-AGCACGCTAAGGGTCATCTC-3')进行菌落 PCR 筛选阳性菌株。在含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 液体培养基过夜培养后,提取质粒,*Bam*H I、*Sal* I 双酶切鉴定转化子^[3]。经鉴定的重组子命名为 pCambia1304-C6-*Cry3A*。并将相应的克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 农杆菌 pCambia1304-C6-*Cry3A* 重组菌株的构建 用液氮冻融法将构建的表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A* 转化到农杆菌 LBA4404 中,在含有卡那霉素(50 μ g/mL)和利福平(50 μ g/mL)的 YEB 固体平板上培养后,随机挑取 7 个单菌落,分别接种于 3 mL 含有卡那霉素(50 μ g/mL)和利福平(50 μ g/mL)的 YEB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养^[4]。各取 2 μ L 菌液为模板,用引物 F1、R1 进行 PCR 鉴定。

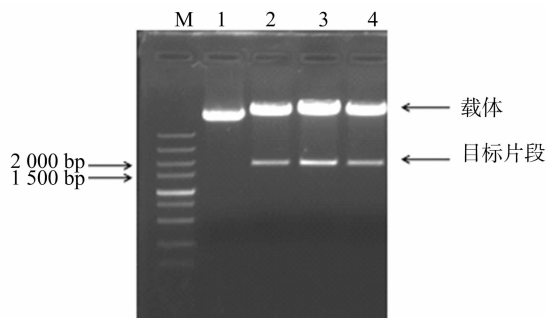
2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A* 的构建

采用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别对质粒 pUC57-*Cry3A* 和 pCambia1304-C6 进行双酶切,切胶回收长度为 1 806 bp 的 *Cry3A* 基因片段和长度为 15 140 bp 的 pCambia1304-C6 载体骨架。通过 *T*₄ DNA 连接酶将目的片段连接到载体上,经过大肠杆菌中的菌落 PCR,质粒酶切(图 1)和测序等过程,表明成功构建了重组表达质粒(图 2)。

2.2 重组表达载体 pCambia1304-C6-*Cry3A* 转化农杆菌的验证

将 pCambia1304-C6-*Cry3A* 重组质粒,按“1.2.2”节



M—DL 5000 (大连宝生物); 1—阳性质粒
未用内切酶处理; 2—4—3 个阳性克隆

图1 重组表达载体 pCambia1304-C6-Cry3A 的双酶切图谱

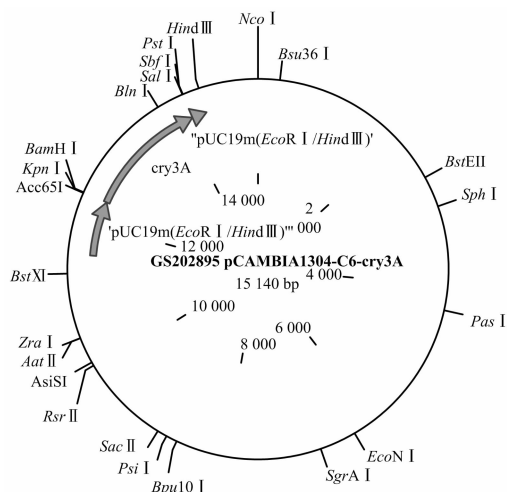
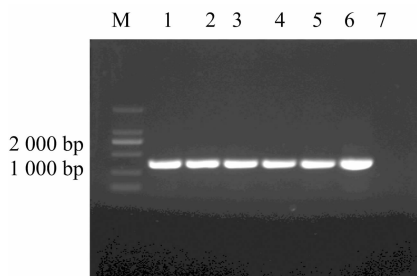


图2 重组表达载体的 pCambia1304-C6-Cry3A 图谱

方法转化农杆菌并进行 PCR 验证。各菌液和阳性对照 pCambia1304-C6-Cry3A 质粒均能扩增出目的基因片段, 而阴性对照 LBA4404 菌液未能扩增出目的片段(图3)。表明 pCambia1304-C6-Cry3A 质粒已成功转入农杆菌 LBA4404, 成功构建农杆菌基因工程菌株, 可进行后续的转基因试验。



M—5 kb DNA marker; 1—5—PCR产物;
6—阳性对照; 7—阴性对照

图3 重组表达载体 pCambia1304-C6-Cry3A
转化农杆菌的PCR图谱

3 结论与讨论

1981 年第 1 个编码苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因被 Schnepf 等成功克隆^[5], 从此揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕。随着分子生物学的迅速发展, 利用转基因技术将 *Bt* 杀虫基因转入各种 *Bt* 野生菌株构建具有使杀虫机制多样化^[6]、扩大杀虫谱^[7]、降低害虫抗药率^[8] 等优势的杀虫工程

菌的方法已广泛应用于害虫生物防治领域^[9-10]。武汉大学高梅影等就曾从中国土壤中分离出 2 株产近菱形的薄扁伴孢晶体的杀鞘翅目昆虫的苏云金芽孢杆菌 YM-03 及 SHQ11-10, 生物毒力试验中其稀释 400 倍的制剂喷雾对柳蓝叶甲 (*Plagioderma versicolora*) 及马铃薯甲虫防治效果达 94.6%^[11]。到目前为止已报道的编码 cry 蛋白的基因超过 300 个, 其中 *cry3*、*cry5*、*cry7*、*cry8* 和 *cry18A* 系列的蛋白基因对鞘翅目昆虫具有专一毒性, 并且当中 *cry3Aa* 基因专一性和毒性最高, 从细胞营养期开始即可不依赖芽孢的产生较长时间表达, 且表达的蛋白多肽分子量较小, 易于被昆虫中肠液降解为 55 ku 的毒性多肽, 而且遗传背景也最清楚, 因此国内外一般都优先选用 *cry3Aa* 基因作为抗虫基因转入微生物, 构建具有抗鞘翅目昆虫杀虫活性的重组 *Bt* 杀虫剂^[12-13]。

综合考虑, 笔者选择了 *BtCry3A* 类基因, 成功构建抗虫植物表达载体 pCambia1304-C6-Cry3A, 为下一步进行转基因抗虫柳树育种研究奠定了基础。在后续的试验中, 将构建双价抗虫植物表达载体, 对转单价和双价柳树植株抗虫性方面进行比较, 以期耐盐柳树害虫绿色防控提供方法及获得具有高效广谱抗虫性的转 *Bt* 基因柳树植株。

参考文献:

- [1] 张健, 李敏, 陈惠, 等. 不同种类药剂防治竹柳主要虫害柳蓝叶甲的研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(3): 83-84.
- [2] 李敏, 张健, 李玉娟, 等. 抗虫转基因林木育种研究进展[J]. 南通农业, 2013(3): 13-15.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 32-34.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 189-190.
- [5] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. *Bt* 杀虫晶体蛋白基因及其转基因育种研究进展[J]. 生物工程进展, 2000, 20(2): 45-48.
- [6] 张爽, 杜克久, 李成德, 等. 抗鞘翅目基因工程研究进展[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(5): 61.
- [7] Yue C Y, Sun M, Yu Z N. Broadening the insecticidal spectrum of lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains by chromosomal integration of *cry3A*[J]. Wiley Inter Science, 2005, 91(3): 299-301.
- [8] Environmental Protection Agency. The environmental protection agency white paper on *Bt* plant-pesticide resistance management[M]. Washington: EPA Publication, 1998: 128-136.
- [9] 易晓莉, 马晓, 刘先方, 等. 昆虫对毒素抗性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 149-151.
- [10] 华鹤良, 陈源, 张祥, 等. 基因导入对棉花叶片生长特征的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 53-55.
- [11] 高梅影, 李荣森. 杀鞘翅目苏云金芽孢杆菌新菌株及其杀虫剂的研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(167): 515-520.
- [12] Crickmore N, Zeugler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 807-813.
- [13] Sheng J W, Koller B C N, Deborah L, et al. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* *Cry3A* δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop[J]. FEBS Letters, 2000, 473(2): 227-232.