

表达苏云金杆菌 δ -内毒素基因的转基因烟草的抗虫性

田颖川 秦晓峰 许丙寅 李太元 方荣祥 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

李文谷 符文俊 丽一平

(中国科学院昆虫研究所, 上海)

张书芳 谢强江

(中国科学院动物研究所, 北京)

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)HD-1的 δ -内毒素基因原始克隆TH12和 TH48分别含有5.3kb和6.6kb型两类同源异族基因。经定点突变改造其5'端, 酶切对3'端进行缺失后, 在大肠杆菌中仍能表达出有杀虫活性的被修饰的毒蛋白。将上述加工过的基因插入到双元载体pBin437(pBin19的派生质粒)中, 借助辅助Ti质粒pAL4404 转入烟草, 获得了抗卡那霉素的再生植株。经Southern 印迹和狭槽印迹(Slot blot)杂交证明有1—5个拷贝的毒素基因整合至烟草染色体中。Northern印迹法分析结果表明这两类基因都在转基因植株中得到表达。有4株5.3kb类型, 3株6.6kb类型的转基因植株对烟青虫有高抗性, 与对照相比, 这7株转基因烟草植株的杀虫率可达40—50%, 并能显著抑制昆虫蜕皮和生长发育, 表现明显的抗虫作用。结果表明这两类毒蛋白基因都可在植物中表达并赋予转基因植株以抗虫性。

关键词 苏云金杆菌毒蛋白基因; 转基因烟草植株; 抗虫作用

苏云金杆菌 δ -内毒素蛋白基因(Bt毒蛋白基因)是苏云金杆菌在芽孢期产生的伴孢晶体蛋白。该蛋白可特异地毒杀鳞翅目、双翅目或鞘翅目昆虫^[1]。

随着植物基因工程技术的发展, 完全有可能将Bt毒蛋白基因引入植物体而获得抗虫转基因植物。1981年 Schnepf 等^[2]首次将 Bt 毒蛋白基因克隆后已有数类 Bt 亚种毒蛋白基因被克隆。我们也已成功地克隆了Bt HD-1 毒蛋白基因^[3], 并对原始克隆TH12和TH48进行酶谱分析和部分DNA序列分析, 结果证明: 按Kronstad提出的以 Hind III 酶切片段长度多型性的分类方法, 这两个原始克隆分别含有5.3和6.6kb两类毒蛋白基因^[4,5]。

目前已有几家实验室成功地利用Ti质粒系统将5.5或4.5kb类型的毒蛋白基因转入烟草和蕃茄, 获得了抗虫的转基因植物^[6-8], 转基因的抗虫蕃茄已进行大田试验^[9], 并证明能有效地抗御几种鳞翅目害虫。

本实验室曾利用合成的寡核苷酸引物对TH12(5.3kb型)和 TH48(6.6kb型)两个毒蛋白基因的5'-端分别进行定点突变, 去除了多余的 ATG 密码子, 并分别用内切酶对其3'-端进行缺失, 以确保毒蛋白

本文于1990年4月18日收到。

微生物所杨毛周、王桂玲、袁左伟同志协助部分工作, 动物所沙捷云同志协助部分毒性试验, 特此致谢。本工作系国家科委和国际科学文化中心的世界实验室(WLICSC, 日内瓦, 洛桑)资助项目。

基因在工程植株内能有效地表达^[5]。本文报道这些被修饰的基因在 *E. coli* 中由 Tac 启动子驱动的表达及其菌体蛋白的毒力测定; 同时, 为了提高在转基因植株内的表达水平, 我们构建了含两个增强子的 35S 启动子和被修饰过的 Bt 毒蛋白基因的中间载体质粒, 经转化烟草后已整合至烟草染色体中并表达出 Bt 毒蛋白基因特异的 RNA, 经虫测试验证证明这些转基因烟草具有抗虫性。6.6kb 类型的毒蛋白基因的抗虫的转基因植株, 在国际上尚未见类似的报道。

材料与方法

(一)材料

1. 菌种及质粒: Bt-HD1 毒蛋白基因克隆 TH12, TH48 及亚克隆 pB48-110 (含 6.6kb 型, 5'-端已被修饰的全长毒蛋白基因的表达载体质粒), pB12-10 (含 5.3kb 型, 5'-端已被修饰的全长毒蛋白基因表达载体质粒); pB12-101 及 pB48-101 分别带有 5.3kb 和 6.6kb 两类 Bt 毒素基因, 都是 5'-端修饰过的, 但 3'-端分别缺失至 Kpn I 或 Hind III 位点, 其 Bt 毒蛋白基因大小分别为 2.1kb 和 2.8kb (图 1), pB48-102 带有 6.6kb 型 3' 缺失至 Kpn I 的 Bt 毒蛋白基因, 大小为 2.1kb, 以上质粒均由本实验室构建^[5]。农杆菌 LBA-4404 及 pBI 121.1 由英国 Jefferson 教授, pDO432 质粒由美国 Howell 教授惠赠。

2. 植物: 温室培养的普通烟 SR1 (*Nicotiana tabacum* subsp. *petit* SR1), 4—5 叶期的烟苗用于转化试验。

3. 生化试剂: 限制酶和其它核酸修饰酶购自 Boehringer 或 BRL 公司; 通用翻译终止子购自 Pharmacia; RNA 分子量标准物购自 Boehringer 公司; α -³²P-

dCTP 购自 NEN 公司; Bt 毒蛋白抗血清由中国科学院动物所提供。

4. 测试昆虫: 烟青虫 (*Heliothis assulta*) 和玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 由中国科学院上海昆虫所及中国科学院北京动物所人工饲养; 二化螟 (*Chilo suppressalis*) 由中国科学院上海昆虫所饲养。

(二)方法

1. 两端被修饰过的 Bt 毒蛋白基因在大肠杆菌中的表达

(1) 菌体蛋白的制备: 含有完整的或 3'-端有不同程度缺失的毒蛋白基因的亚克隆菌在含氨苄青霉素 (Ap) 培养基中, 37℃ 下摇床培养过夜, 收集菌体后, 菌体蛋白制备方法与前文所述相同^[3]。

(2) Western 印迹分析: 利用 Tricine-SDS PAGE 系统的微型胶 (10 × 8 × 0.02cm) 电泳, 样品量为 2μl (5—10μg 蛋白) 电泳后参照 Dann 方法^[10]将蛋白转移至硝酸纤维膜上, 用 Bt 毒蛋白抗血清及羊抗兔血清偶联的碱性磷酸酶 (GAR-AP) 的免疫反应检测膜上结合的菌体毒蛋白。

(3) 菌体蛋白杀虫活性测定: 一定量的冷干菌体蛋白溶于 1ml 10mmol/L NaOH, 取一定量溶液加入人工饲料。一般使菌体蛋白浓度为 50—100μg/ml 饲料。对照组加入等量的只携带空载体的大肠杆菌 JM109 菌体蛋白或加入等量的 NaOH 溶液, 每处理饲喂 20 头虫, 一定时间后观察昆虫死亡, 生长发育及体重情况。

2. 中间载体的构建及转化农杆菌

(1) 中间载体的构建: 35S 启动子及其增强子来自 pDO432^[1,3]。经多次酶切加工将 0.24kb 的增强子与 35S 启动子串联, 并克隆至 pBR322 的 Hind III-BamHI 位点, 构成 pD436。将通用翻译终止子

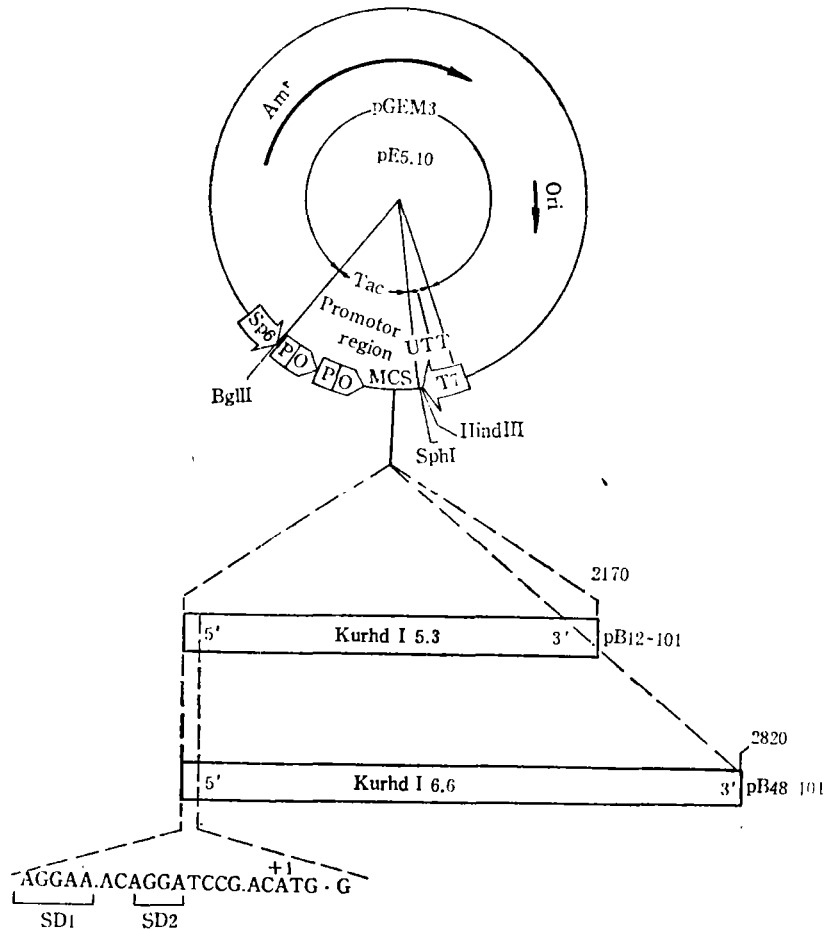


图 1 3' 端缺失的 Bt 毒蛋白基因的大肠杆菌表达载体的结构

Fig.1 Diagram of the *E.coli* expression vector carrying the 3' truncated Bt toxin genes

图中右侧数字表示 Bt 毒蛋白基因的长度(bp), SD1, SD2 表示原核基因调控序列

Figure on the right indicate the size (in bp) of 3' truncated Bt toxin genes, SD1 and SD2, the regulation sequence for prokaryote genes

UTT 连接在 0.23kb 的 NOS-3' 端序列的上游, 克隆至 pGEM3, 构建成 pGT3。pD436 的 HindIII-Sal I 片段插入到 pGT3 的 HindIII-Sal I 位点。从而组建成 pD437, 它包含双拷贝 35S 增强子, 35S 启动子, pBR322 可代替区, UTT 和 NOS-3' 等组分。将包含这些组分的整个片段转入 pBin19 的多克隆位点而构成最终的中间载体质粒 pBin437。利用相同酶切位点分别将 pB12-101 和 pB48-101 (图 1) 中的 Bt 毒素基因克隆至 pBin437 的 pBR322 可

替代区, 得 Bt 毒素基因的双元表达载体 pB12-211 和 pB48-211 (见图 2)

(2) 中间载体向农杆菌 LBA4404 的转化: 按 An 等的方法进行^[11]。

3. 烟草叶片的转化及转基因植株的再生: 参照文献[12]进行。

4. 植物 DNA 的 Southern 印迹分析: 植物 DNA 提取法参照文献[12]。EcoR I 酶解, 电泳并转移至 Z-probe 膜上后与 ³²P 标记的 pB48-101-EcoR I 酶解片段探针杂交。

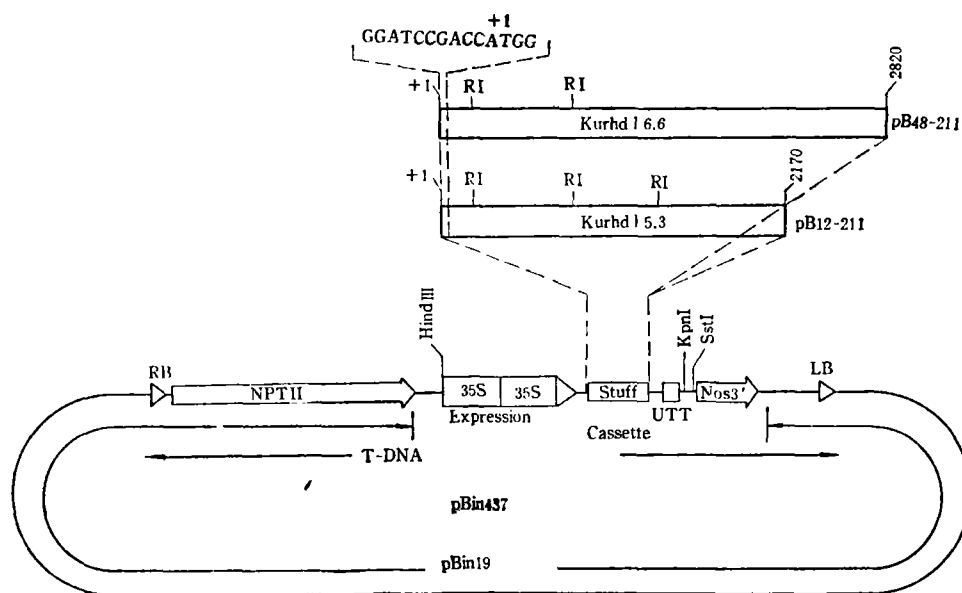


图 2 带有Bt毒素基因的双元载体结构图
Fig.2 Diagram of the binary vector carrying the Bt toxin genes

5. 转基因植株的 Northern 印迹法分析: 取具有抗虫作用的转基因植株 T₁ 代 R14X-7, R1111-11 及非转化植株的叶片, 按 Nagy 等^[13] 所述方法提取 Poly A⁺ RNA 并进行 Northern blot 分析, 杂交所用探针为 ³²P 标记的 6.6kb 型 Bt 毒蛋白基因 5' 端 BamHI 到 XhoI 的 DNA 片段。

6. 转基因植株子代 (T₁) 抗虫活性的测定: 将 10 头当天孵化的烟青虫放入装有转基因植株子代 (T₁) 叶片的玻璃管 (2 × 10cm) 中, 棉塞封口, 在 26℃, 90% 相对湿度温箱内, 3 天和 6 天后检查活虫再现率, 并鉴别虫龄, 第 7 天将存活的幼虫称重, 计算平均体重和标准差。

蜕皮指数的计算, 以 I 龄幼虫作 1, II 龄作 2, 依此类推, 每处理存活幼虫各龄虫数乘其相应指数, 乘积相加除以总虫数得出处理组的蜕皮指数, 说明对生长发育的影响。

结果与讨论

(一) 修饰过的 Bt 毒蛋白基因在

E. coli 中的表达

Kronstad 根据 Bt. HD-1-Dipel, HD-1 和 HD-73 等毒素基因的限制酶酶切图谱分析提出: Bt 毒素蛋白基因可按其 5' 端 HindIII 酶切片长度多型性 (RFLP) 分成 4.5, 5.3 和 6.6kb 三类, 利用此 RFLP 探针对 *kurstaki*, *thuringiensis* 亚种的 24 个株系的毒素基因进行系统分析, 进一步发现许多菌株编码一类以上的同源基因^[4]。对 TH12 和 TH48 两个原始克隆的酶谱及部分序列分析结果证明这两个克隆分别含有同源基因, TH12 为 5.3kb 型而 TH48 含有 6.6kb 型。它们 5' 端第一个 EcoRI 切点的上游序列完全相同, 在翻译起始点 ATG 密码子的上游竟存在 5 个多余的 ATG, 这可能会干扰 Bt 毒蛋白基因在植物体内的表达, 为此将紧邻起始点 ATG 的上游碱基做定点突变, 以形成单一切点 NcoI, 利用此切点切除多余的 ATG^[5]。已有报道表明 Bt 毒蛋白基因 3'-端序列干扰它在植物体内表达^[8], 用酶切对 3'-端缺失加工获得 2.1kb 的 5.3kb 类型基因片段和 2.8kb

的6.6kb类型基因片段并克隆到*E. coli*表达载体质粒pE5-10中,得到质粒pB12-101和pB48-101(图1)。将这两种质粒与其相应对照pB12-10, pB48-110(均为全长毒蛋白基因,其3'-端末端经加工)分别在JM109中表达。图版I-A为以上几种质粒表达后菌体蛋白的Western印迹分析结果,带全长Bt毒蛋白基因的菌能产生~130kd与晶体蛋白抗血清有特异反应的蛋白,而被修饰过3'-端的Bt毒蛋白基因可表达出与其基因长短相应的蛋白:106kd(2.8kb)(泳道4)和86kd(2.1kb)(泳道2及5),但泳道2中的86kd多肽被降解,此

带几乎看不见。图谱中各种处理均出现65kd左右多肽,很可能是特异性降解产物,其原因不清。

将上述含表达的Bt毒蛋白的菌体蛋白填入人工饲料对烟青虫、玉米螟、二化螟做虫测毒力试验,结果见表1。从总体看含毒蛋白全长基因的(B48-50, B48-110及B12-10)比3'端被修饰的(B48-101, B48-102, B12-101)杀虫效果好。如B48-50和B48-110对玉米螟有100%杀伤作用;对烟青虫效果较低,对二化螟则无毒杀作用,但有显著的抑制生长作用,处理的烟青虫体重仅为对照的1/16,对二化螟也有

表1 含苏云金杆菌毒蛋白基因及其3'端缺乏基因的大肠杆菌蛋白对昆虫的毒性

Table 1 Toxicity of proteins from *E. coli* carrying complete or 3' truncated Bt toxin genes

亚克隆号	基因结构	毒 性 Toxicity					
		烟 青 虫 <i>H. assulta</i>		玉 米 螟 <i>O. furnacalis</i>		二 化 螟 <i>G. suppressalis</i>	
		死亡率 Mortality (%)	平均体重 Average weight (mg/larva)	死亡率 Mortality (%)	平均体重 Average weight (mg/larva)	死亡率 Mortality (%)	平均体重 Average weight (mg/larva)
B48-50	complete gene, 3.5kb	ND	ND	100	—	0	19.7
B48-110	5' modified, complete gene, 3.5kb	35	3.0	100	—	0	9.6
B48-101	5'-modified, 3' to Hind III, 2.8kb	25	3.3	100	—	0	15.5
B48-102	5'-modified, 3' to Kpn I, 2.1kb	0	12.3	0	ND	0	40.0
B12-10	5'-modified, complete gene 3.5kb	100	—	70	16.3	ND	ND
B12-101	5'-modified, 3' to Kpn I, 2.1kb	10	11.9	23.3	47.0	ND	ND
Ck1	empty vector	5	53.1	30	45.7	0	44.0
Ck2	10mmol/L NaOH	10	47.6	10	83.5	0	47.3

相当的抑制作用, B48-110处理组体重仅为对照的1/4。又如B12-10菌体蛋白对烟青虫有100%死亡率,对玉米螟有70%死亡率,但是凡3'-端被修饰过的除B48-101

对玉米螟仍保持原有毒力外,都显著地丧失了部分或大部毒性,似乎3'-端缺失得愈多毒性也丧失得愈多,但抑制作用仍保留,基因被修饰的长度虽是毒力强弱原

因,但也不能排除质粒在*E.coli*中表达水平的影响,无论6.6kb型或5.3kb型3'-端被修饰过的基因其表达量大大低于全基因的。

(二)植物表达载体的构建及向农杆菌的转化

已有报道表明Bt毒蛋白基因的mRNA在植物体内不稳定,表达的蛋白量仅为可溶性总蛋白的0.0001—0.001%^[2,7]。为补偿这种不足除对该基因的5'-和3'-端进行必要的修饰外,还通过改建35S启动子来提高其转录水平。Ow^[14]及方荣祥^[15]近年报道头尾相接的重复增强子结构可使CaMV35S启动子转录活性提高5—10倍,为此构建了含有这种结构的双元载体pBin437(图2)。

将分别来自pB12-101和pB48-101的Bt毒素蛋白基因片段插入pBin437的35S启动子和UTT之间的可替代区,得pB12-211和pB48-211两个中间载体质粒(图2上方),该基因将由强化的35S启动子驱动,转录起始点位于ATG前第(-9)位,终止点由NOS-3'端序列所控制,三相通用终止子密码子UTT可防止翻译通读(Read through)。采用质粒直接转化法分别将pB12-211和pB48-211转入受体菌LBA4404并利用选择培养基选出转化子,分别为BT11, BT15。将这两个转化子用于转化烟草叶组织。

(三)植物的转化及转基因植物的分析

利用叶片共培养法转化普通烟草SR1。在含卡那霉素培养基上选育出再生完整植株,并以DNA杂交进一步从中选出有Bt毒蛋白基因整合的转基因植株。随后用转基因植物子代(T₁)植株测试对烟青虫的毒性并同时进行了Southern印迹(图版I-B, C)及DNA狭槽印迹法(资料未列出)分析。选4个转化植株的子代植

株各10株。进行了DNA狭槽印迹法杂交,这4个植株是:R1103, R1111为pB12-211(5.3kb型, 2.1kb长的毒蛋白基因, 编码86kd毒蛋白)的转基因植物; R1504和R14X为pB48-211(6.6kb型, 基因长2.8kb, 编码106kd毒蛋白)的转基因植物。其中能与Bt毒蛋白基因探针杂交的阳性反应株数为R1103-6/10(杂交阳性数/测定植株数)R1111-7/10; R1504-5/10, R14X-8/10。与拷贝数参照比较,这些杂交阳性的子代株所含Bt毒蛋白基因的拷贝数为1—5个。同时用上述40株T₁子代叶片饲喂烟青虫测其抗虫性(表2, 图版I-D, E)。根据狭槽杂交阳性反应和毒性强弱选出部分转基因植物进行Southern印迹分析(图版I-B, C)。结果表明大部分pB12-211转基因植株DNA样品的EcoRI片段均能与Bt毒蛋白基因探针杂交,出现0.58, 0.73/0.80kb以及一个与植物DNA相连的大片段(图版I-B), 0.73和0.80kb两个片段因分子量接近未能充分分开,此结果与所预期的pB12-211中该基因的酶谱结构是一致的,说明该基因在这些转基因植物染色体上未发生重排,缺失或插入。图版I-C为R14X子代DNA的Southern印迹图谱。转基因植株产生了所预期的0.7, 2.1kb和与植物DNA相连的一个大片段,并都含有1—5个拷贝的整合。可见6.6kb型的基因也已被整合至植物染色体中,未见异常现象。

用有抗虫作用的转基因植株子代R14X-7(pB48-211转化)和R1111-11(pB12-211转化)的PolyA⁺RNA进行Northern印迹分析,结果见图版I-D。结果表明含6.6kb型Bt毒蛋白基因的转基因植株可转录其毒蛋白基因,主要产生2.8, 2.0和1.3kb三个RNA转录物,大部分产物为1.3kbRNA(图版I-D泳道1)。从

pB48-211 中的 Bt 基因结构可知, Bt 毒蛋白基因转录产物应为 2.8kb, 而实际产物却只有少部分是 2.8kb, 说明此 Bt 毒蛋白 mRNA 在转基因植株中很不稳定, 转录后很快降解为 1.3kb 左右的 RNA。图版 I-D 泳道 2 为含 5.3kb 型毒蛋白基因的转基因植株的 RNA 杂交图谱, 从图谱上虽看不到预期的 2.1kb 的转录产物, 但可见主

要分散在 0.6—1.3kb 之间的与 Bt 基因探针杂交的 RNA, 说明这类 Bt 毒蛋白的基因转录产物也是很很不稳定的。看来 Bt 毒蛋白 mRNA 在植物中不稳定性可能是 Bt 毒蛋白表达水平低的主要原因之一。

(四) 转基因植株子代 (T_1) 对昆虫的毒性

将同时进行过 DNA 分子杂交的上述

表 2 转基因植株子一代对烟青虫的毒性

Table 2 Tolerance of first progeny of transgenic tobacco plants (T_1) to *Heliothis assulta*

植株号及 Bt 基因结构 To plant No. & Bt gene structure	T_1 植株号 T_1 plant No.	DNA 杂交 DNA hybri- dization	校正死亡率 Corrected mortality (%)	蜕皮指数 Exuviation index	平均体重 Average weight (mg/larva)	毒性 ^b Toxicity
R1103 5.3kb class; 2.1kb modified Bt. gene	6	+	0	2.7	2.5 ± 1.6	***
	7	+++	20	2.0	0.9 ± 0.7	
	10	—	10	2.4	3.0 ± 1.7	
	11	—	0	2.7	4.9 ± 2.2	
	12	ND	30	2.3	2.4 ± 1.3	
R1111 5.3kb class; 2.1kb modified Bt. gene	(1) ^a	+++	40	1.33	0.7 ± 0.7	****
	2	+++	40	1.5	1.1	****
	3	—	0	3.0	6.2 ± 2.6	****
	9	+	20	1.0	0.8 ± 0.8	****
	(11) ^a	+	50	1.5	1.3 ± 1.0	****
R1504 6.6kb class; 2.8kb modified Bt. gene	6	+	10	2.6	3.3 ± 1.7	*
	7	+	0	2.9	3.6 ± 1.7	
	8	+	0	2.3	3.3 ± 2.7	
	9	+	0	2.4	1.6 ± 1.1	
	11	+	0	2.4	1.5 ± 0.8	
R14X 6.6kb class; 2.8kb modified Bt. gene	1	+	0	1.7	1.4 ± 0.9	*
	3	+	30	1.0	0.5	****
	6	+	0	1.8	1.1 ± 0.6	***
	7	+	0	1.2	1.0 ± 0.7	****
	8	++	0	2.1	4.8 ± 3.6	*
Ck1			0	2.7	} 6.1 ± 4.9	
Ck2				2.7		
Ck3			0	3.4		

a 数据来自另一组实验

Data from the other experiment

b 毒性判断: 蜕皮指数为对照平均指数的 60%—80% 的为 “*”, 低于对照 60% 的为 “***”; 平均体重为对照的 20%—40% 的为 “*”, 低于对照 20% 的为 “***”。每个处理的这两项指标即 “*” 数相加, 根据 “*” 数并参考死亡率, 以确定毒性程度。

Toxicity, Toxicity was judged by the summed number of the exuviation index and average weight. The exuviation index of the insects, between 60—80% of that of the control is designated as “*”, while below 60%, “***”; The average weights of the tested insects, between 20—40% of that of the control were designated “*”, while below 20% of the control, “***”.

4 株转基因植物的子代各10株,共40株,取叶片喂当天孵化的烟青虫各10头统计活虫再现率(或换算为死亡率),计算蜕皮指数和平均体重。表2列出每种转基因植物所试10株子代植株中5株的虫试结果,毒性较好的植株都已包括在内,对于毒性强弱判断是综合死亡率,蜕皮指数和平均体重三个指标考虑的。因死亡率固然重要,但也应充分估计对害虫蜕皮,生长抑制的抗生效应。从表2可明显看出从R1111和R14X的子代可各选出3—4株高抗性植株,与对照相比,昆虫死亡率可达40—50%,蜕皮指数只相当于对照的34—60%,平均体重大多为对照的20%以下,少数只有10%左右,这三项指标是一致的。综观分子杂交和抗虫能力结果,可以认为凡有抗虫性的植株必有Bt毒蛋白基因的整合,无整合必无抗性,但有整合并非必然有抗性。抗性高低与整合的拷贝数也并非成正比,抗性的高低可能主要取决于整合位置和表达水平。

图版I-E为具有高抗的转基因植株R1111-11的虫试结果的照片,F为非转基因的烟叶,两者对比,在虫体大小,进食量,叶片受损程度等方面形成鲜明对比。

其它几株高抗植株也有类似的结果。

以上结果充分证明我们已用来自HD1株系的5.3和6.6kb这两个类型的Bt毒素基因通过DNA重组和植物基因工程技术获得了具有毒杀和抑制烟青虫生长的转基因烟草(SR1品种)。将5.3kb和6.6kb这两类Bt毒蛋白基因转入植物体内,在RNA水平证明有Bt基因的表达,并证明有抗虫作用,为获得其它抗虫的转基因经济作物打下了基础。但也充分认识到进一步改造该毒素基因结构,研究其表达调控,提高表达水平的必要性。

原设想不同结构,不同长度的Bt毒素基因在*E. coli*中表达,其菌体蛋白的杀虫力可较快地为设计该基因在植物体内的表达提供参考数据。但本文结果却说明该基因在*E. coli*中的表达水平和杀虫力似乎不能反映同一结构的基因在植物体内表达的状况,如5.3kb型的2.1kb短基因在*E. coli*中表达和杀虫力虽不高,但在植物体内表达却较好,又如6.6kb型2.8kb的较长基因在*E. coli*中表达及杀虫效果比5.3kb型的好,是否6.6kb型2.1kb短基因在植物体内表达也会比5.3型2.1kb的表达更好些,有待进一步试验。

参 考 文 献

- [1] Whiteley, H.R. and Schnepf, H.E.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 40:549, 1986.
- [2] Schnepf, H.E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2893, 1981.
- [3] 田颖川等: *生物工程学报*, 5:11, 1989.
- [4] Kronstad, J.W. et al.: *Gene*, 48:109, 1986.
- [5] 秦晓峰: 中国科学院微生物研究所, 研究生毕业论文(待发表).
- [6] Vaec, M. et al.: *Nature*, 328:33, 1987.
- [7] Fischhoff, D.A. et al.: *Bio/Technology*, 5:807, 1987.
- [8] Barton, K.A. et al.: *Plant Physiol.*, 85:1103, 1987.
- [9] Delannay, X. et al.: *Bio/Technology*, 7:1265, 1989.
- [10] Dann, S.D.: *Anal. Biochem.*, 157:144, 1986.
- [11] An, G. et al.: *Methods Enzymol.* Vol. 153, ed. Ray Wu, Academic Press, London, p.293, 1987.
- [12] 田颖川等: *中国科学*, 第8期, p.822—831, 1990.
- [13] Nagy, F. et al.: *Plant Mol. Biol. Manual*, B4, 1—29, 1988.
- [14] Ow, D. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4870, 1987.
- [15] Fang, R.X. et al.: *The Plant Cell*, 1:141, 1989.

Insect Resistance of Transgenic Tobacco Plants Expressing δ -endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis*

Tian Yingchuan Qin Xiaofeng Xu Bingyin Li Taiyuan,

Fang Rongxiang Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Li Wengu Fu Wenjun Li Yiping

(Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai)

Zhang Shufang Xie Qiangjiang

(Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing)

The original *B. thuringiensis* δ -endotoxin (Bt toxin) gene clones TH12 and TH48 contain two different classes of homologous genes, the 5.3kb class and 6.6kb class respectively. Bt toxin genes of both classes modified at the 5'-end and truncated at the 3'-end can still be expressed to produce the entomocidal, truncated toxin proteins in *E. coli*. The modified Bt toxin genes were inserted into the plant binary expression vector pBin437 (a derivative plasmid of pBin 19) and were transferred into tobacco genome by disarmed Ti plasmid pAL 4404 gene transfer system. Southern blot and DNA slot blot analysis indicate that the Bt toxin genes have been integrated into tobacco genome at a copy number of 1—5. Northern blot analysis of poly A⁺ RNAs from progenies of the transgenic plants revealed that Bt toxin genes of both 5.3 and 6.6 kb classes were expressed in transgenic plants, though the transcripts were degraded to RNAs of lower molecular weights. In entomocidal test, 5 plants from the progeny of 5.3 kb class gene-transformed SR1 tobacco plants and 3 plants from that of 6.6kb class gene-transformed plants were found to be toxic to the testing larvae of *H. assulta*. In comparison with the control, mortality of the insects feeded on transgenic plants reached 40—50% and the growth of the survived insects was remarkably inhibited. These results indicated that the modified Bt genes of the 5.3kb and 6.6kb classes were expressed in transgenic plants and could confer the transgenic plants a new character of insect resistance.

Key words

Bt toxin gene; transgenic tobacco plant; insect resistance

图 版 说 明

Explanation of Plate I

A. 含有Bt毒素基因表达载体的大肠杆菌菌体蛋白的Western印迹法分析

Western blot analysis of the Bt toxin polypeptide synthesized in *E. coli*; Lanes 1—6 show the immunoreaction pattern of total bacterial protein from pB12-10, pB12-101, pB48-110, pB48-101, pB48-102 and pE5-10 (empty vector) respectively. Lane 7 shows the immunoreaction pattern of Bt crystal protein. Number on the right indicates protein MW standards.

B, C. 转基因植株子一代(T₁)的Southern印迹法分析

Southern blot analysis of T₁ plants of transgenic tobacco plants

B. pB12-211(5.3kb类型Bt基因)转基因植株子代

Analysis of T₁ plants of pB12-211 (5.3kb class) transgenic plants. Lanel, DNA from non-transformed plant; Lanes 2—13, hybridization patterns of DNA from T₁ plants R1111-1, 2, 10, 11, 5, 9 and R1103-3, 4, 5, 7, 10, 12. Lane 14 is ³²P-labeled MW standards. Lanes 15 and 16 show the copy number control of 1 and 5 copies, respectively.

C. pB48-211(6.6kb类型Bt基因)转基因植株子代

Analysis of T₁ plants of pB48-211 (6.6kb class) transgenic plants. Lanes 1—4, copy number reconstruction 10, 5 and 1 copy and MW marker respectively.

Numbers on the right indicate MW in kb and on the left show the expected fragments produced by EcoRI digestion of transgenic plant DNA.

D. 转基因植株子代mRNA的Northern印迹法分析

Northern blot pattern of mRNA from progeny (T₁) of Transgenic plant resistant to insects, 20μg of poly A⁺ RNA of each sample were used in the Northern blot analysis, lane 1 indicates the hybridization pattern of RNA from plant R14X-7 and lane 2 from R1111-11. Lane 3 is the poly A⁺ RNA from non-transformed tobacco plants. The numbers on the right indicate RNA MW standards.

E, F. 转基因植株子一代(T₁)植株R1111-11对烟青虫的毒杀作用

Insect tolerance test of T₁ progeny of transgenic tobacco plants.

R1111的子代R1111-11的叶片, 幼虫仅在叶片上咬出几个小孔, 未转化植株的叶片, 大部分已被虫食。

E. Leaf strips from T₁ plant R1111-11 of transgenic plant R1111, only tiny holes could be seen formed by insect feeding, F. leaves from non-transformed plant, most of the leaves have been consumed by the feeding insects.

重 要 更 正

本刊1990年第4期文后巫爱珍等的图版
应与侯永敏等的图版下方的照片互换。

Tian Yingchuan et al.: Insect resistance of transgenic tobacco Plate I
plants expressing δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*

