

分子生物学手段检测转 Bt 基因棉花中 Cry 杀虫蛋白的定性和定量方法

李衍亮^{1,2,3}, 方志翔⁴, 游静¹

- (1. 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640;
2. 广东省农业科学院农业资源与环境研究所, 农业部南方植物营养与肥料重点实验室/
广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室, 广州 510640;
3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要: 建立了转 Bt 基因棉花中 Cry 杀虫蛋白的提取、样品前处理以及酶联免疫(ELISA)定量分析方法, 并使用凝胶电泳、普通聚合酶链式反应(PCR)和实时荧光定量 PCR 等分子生物学手段对转基因棉花中的 Bt 基因进行定性和定量检测。所建立的苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白(Cry1Ab 蛋白和 Cry1Ac 蛋白)标准曲线线性关系良好, 相关系数 r^2 均大于 0.999, 相对标准偏差 RSD 均小于 2.0%。方法简单、快速、重现性和精密度好, 可为农业食品行业和环境领域科研人员提供一种简便快速地从转基因棉花中检测 Bt 毒蛋白的分析方法。

关键词: 转 Bt 基因棉花; Cry 杀虫蛋白; 酶联免疫法; 凝胶电泳; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: O657.32

文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2014)03-0148-07

转基因生物技术的研究, 大多集中在抗虫基因工程和品质改良基因工程等领域。例如, 通过对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫蛋白基因的修饰和改造、表达载体的构建和组织转化等转基因手段, 将 Bt 基因导入植物体中。目前, 在全世界范围内已获得了包括烟草、玉米、棉花、马铃薯和水稻等多种抗虫转 Bt 基因农作物。为解决棉花生产的虫害问题, 1991 年我国“863”计划启动抗虫棉研制工作, 中国农业科学院的郭三堆研究员^[1-2]通过花粉管通道法把 Bt 的 GFM Cry1A 融合 Bt 抗虫基因导入棉花, 研制形成了具有自主知识产权单价抗虫棉品种, 在国内广泛推广种植。自从 1996 年开始大面积商业化种植 Bt 抗虫棉以来, 全世界 Bt 抗虫棉种植面积迅猛增加, 从 170 万公顷大幅度增加到 2011 年的 660 万公顷^[3]。迄今为止, 中国成为世界上第二大转基因棉花种植国家, 2011 年 Bt 抗虫棉种植面积为 390 万公顷, 约占全国棉花总种植面积

的 71.5%^[3-5]。

植物基因工程发展到一定程度后, 对检测方法也提出了更高的要求, 转基因表达产物的检测也成为转基因研究的一项重要内容。当前所应用的检测方法主要有生物个体水平上的生物测试法^[6](主要是实验室及田间的毒性测试)、蛋白质水平上的测定法^[6-7](Western blot 和酶联免疫法)和 DNA 水平上的测定法^[8](普通和实时荧光定量 PCR 和 Southern blot)等。这些方法各有特点, 需要根据目的和要求来选择合理的检测方法。转 Bt 基因棉花是抗虫基因工程的典型代表, 因此有必要建立恰当和简便的方法对其分泌的 Cry1Ac 毒蛋白基因进行快速鉴定与检测。这也是开展对转基因棉花中表达的 Bt 基因进行研究的前提, 能够促进农业转基因作物的安全管理, 同时监控和保护生态环境, 有助于进一步开展农业转基因生物的生态风险评估的研究^[9-10]。

收稿日期: 2014-08-28; 修订日期: 2014-09-12.

基金项目: 本文系国家转基因专项(2013ZX08011-002, 2014ZX08011-002)资助。

作者简介: 李衍亮(1982-), 男, 博士, 主要从事环境中农药行为和毒性研究。E-mail: lee8338@126.com

通信作者: 游静, 女, 研究员, 《分析测试技术与仪器》编委, 研究方向: 环境地球化学与生态毒理学。E-mail: youjing@gig.ac.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

S1000-96 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国); StepOnePlus Real-Time PCR 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国); Power/PAC 300 电泳仪 (Bio-Rad 公司, 美国); ND-1000 核酸蛋白分析仪 (Nanodrop 公司, 美国); Gel Doc XR+ 全自动凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国); Thermo Varioskan Flash 全波长酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国)。

试剂盒 THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix (东洋纺 TOYOBO, 日本); 商业化 Cry1Ab/Cry1Ac 定量试剂盒 AP 003 (EnviroLogix 公司, 美国); 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) DP305 (天根生化科技有限公司, 中国); Cry1Ab 蛋白标准品和 Cry1Ac 蛋白标准品 (EnviroLogix 公司, ≥99%, 美国), 其它试剂为分析纯, 购自中国国药集团化学试剂有限公司。

实验棉花品种: 转 Cry1Ac 单价 Bt 基因抗虫棉“GK 12”和其亲本常规棉“泗棉 3 号”, 这 2 种棉花种子均由中国农业科学院棉花研究所提供。

1.2 样品前处理

1.2.1 Bt 毒蛋白的提取

先配置 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS (1.9 mmol/L NaH₂PO₄, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4), 然后在 PBS 中加入适量 Tween-20 配置成为含 0.55% Tween-20 的 PBST 提取溶液。选取同一品种棉花生长大体一致的植株, 对其叶片取样分析, 每株植株选取顶端 3~4 片叶片, 标好名称, 于 -70 °C 超低温冰箱保存, 备用。棉籽用浓硫酸脱绒 (叶片不需要) 后, 在液氮保护下 将脱

绒棉籽迅速研磨成粉末状, 然后再加入配好的提取液 PBST 溶液, 继续研磨提取。过滤去除种皮与组织后, 快速地将研磨成浆的粗蛋白转移到离心管中, 在 -4 °C、13 000 rpm 离心 3 min, 然后移取上清液做为 Bt 粗蛋白, 于 -70 °C 冰箱保存。

1.2.2 植物基因组的提取

分别取转基因棉花 GK 12 种子、泗棉 3 号种子、GK 12 的叶片、泗棉 3 号的叶片 4 个植物组织样本, 按照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP305 中的方法对其 DNA 进行提取, 所有操作均在冰上进行。提取得到的基因组产物如不立即进行下一步实验, 则立即放置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.2.3 普通 PCR 的扩增

根据转 Bt 基因的特性, 使用引物设计软件 Primer Premier 6.0 (PREMIER Biosoft International, Canada) 和 Primer 3 V.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计 PCR 引物, 然后委托上海生工生物工程有限公司合成。设计了 3 组 Cry1Ac 的引物和 1 组 Cry1Ab 的引物 (表 1), 以 1.2.2 中提取的植物基因组 cDNA 为模版, 利用特异性引物进行 PCR 扩增, 20 μL 反应体系样品加入量如下: Template (DNA 模板) 为 2.5 μL, Primer 1 (正引物) 为 0.4 μL, Primer 2 (反引物) 为 0.4 μL, Taq PCR Master Mix 为 10 μL, ddH₂O 为 7.1 μL, 体系总量为 20 μL。

反应在 S1000-96 梯度 PCR 仪上运行, PCR 扩增程序的设置如下:

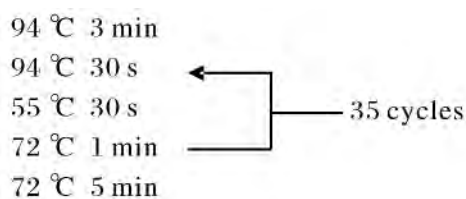


表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

引物名称	引物和探针 DNA 序列
Cry1Ac-1F	5' - GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC - 3'
Cry1Ac-1R	5' - CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT - 3'
Cry1Ac-2F	5' - TAAGGGGAAATCACATGGATAACAATCCGAAC - 3'
Cry1Ac-2R	5' - GGGGATTCCTTACAAGTAAAGCATATA - 3'
Cry1Ac-3F	5' - GTTCCAGCTACAGCTACCTCC - 3'
Cry1Ac-3R	5' - CCACTAAAGTTTCTAACACCCAC - 3'
Cry1Ab-F	5' - CAGCGGCGCCAACCTCTACG - 3'
Cry1Ab-R	5' - TGAACGGCGATGCACCAATGTC - 3'

而两侧 2 条相对比较暗淡,但是也能清楚看到。2 条较亮的条带为种子的 DNA,说明种子中提取的 DNA 浓度较叶片提取的浓度要高。提取的 DNA 完整性好,可以用于下一步的普通 PCR 扩增和实时荧光定量 PCR 实验。

2.2 棉花中 Bt 基因的 PCR 扩增

不同组织提取的棉花基因组使用前面设计的 4 对引物对 Bt 基因进行扩增,扩增后的产物用琼脂糖凝胶进行电泳,结束后,把琼脂糖凝胶置于 Gel Doc XR+ 全自动凝胶成像系统中进行拍照查看(图 2)。

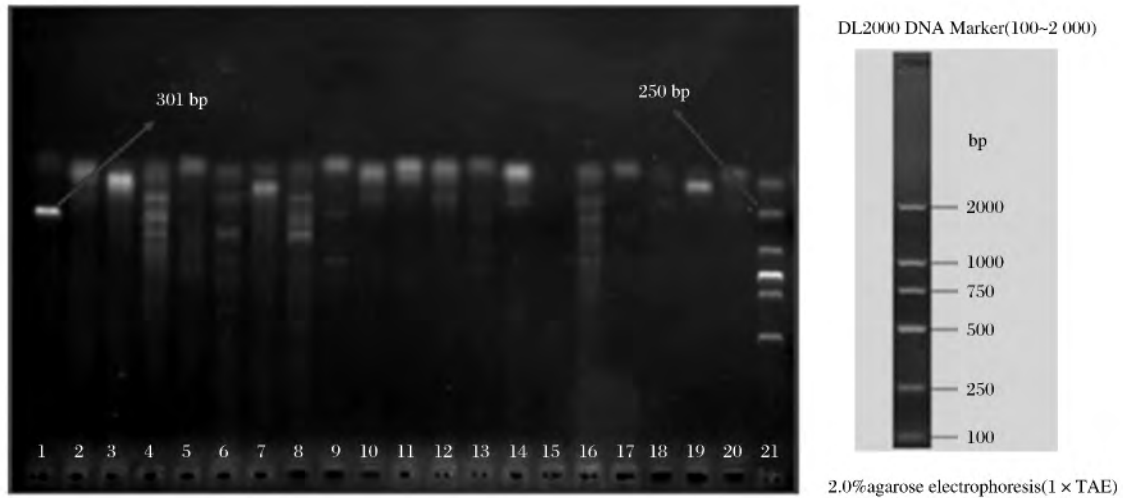


图 2 棉花基因组 PCR 扩增电泳检测图

Fig. 2 Electrophoretic image of cotton after genomic PCR amplification

从左到右的泳道依次为:(1) GK 12 种子(引物 1);(2) GK 12 种子(引物 2);(3) GK 12 种子(引物 3);(4) GK 12 种子(引物 4);(5) 泗棉 3 号种子(引物 1);(6) 泗棉 3 号种子(引物 2);(7) 泗棉 3 号种子(引物 3);(8) 泗棉 3 号种子(引物 4);(9) GK 12 叶片(引物 1);(10) GK 12 叶片(引物 2);(11) GK 12 叶片(引物 3);(12) GK 12 叶片(引物 4);(13) 泗棉 3 号叶片(引物 1);(14) 泗棉 3 号叶片(引物 2);(15) 泗棉 3 号叶片(引物 3);(16) 泗棉 3 号叶片(引物 4);(17) 阴性对照(引物 1);(18) 阴性对照(引物 2);(19) 阴性对照(引物 3);(20) 阴性对照(引物 4);(21) DL 2000 DNA Marker

由图 2 可以看出目标基因的泳道(泳道 1)只有一条特异性扩增产物,并且较亮,产物与 301 bp 位置又十分接近,说明反转录的 cDNA 模板质量高,产物具有特异性。Cry1Ac 基因是一段长为 301bp 的碱基序列^[11]经过常规的 PCR 扩增后,凝胶电泳检测结果表明,1 号有明显的扩增条带,9 号也能看到微弱的扩增条带,说明 GK 12 经过引物 1 的 PCR 扩增后,能得到目的基因产物。用 1 号模板进行扩增,也就是 GK 12 种子基因组,使用设计的引物 1 进行扩增,效果是最明显的。另外,从泳道 1 中没有发现引物二聚体,也无杂带,说明引物可以进一步用荧光定量 PCR 来验证目标基因和管家基因扩增效率是否一致。

引物 1 对转基因棉花的 Bt 基因有比较好的扩增效果,故继续使用它来对不同组织提取的棉花基因组进行 PCR 扩增,检测的结果如图 3 所示。

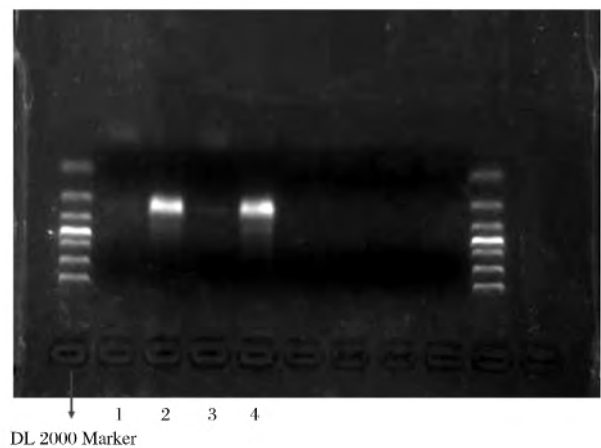


图 3 引物 1 对棉花基因组 PCR 扩增电泳检测图

Fig. 3 Electrophoretic image of cotton after genomic PCR amplification with primer 1

(1) 泗棉 3 号叶片;(2) GK 12 叶片;
(3) 泗棉 3 号种子;(4) GK 12 种子

由图 3 可以看到转基因棉花提取的基因组,不管是种子还是叶片,经过 PCR 的扩增后,使用前面实验所设计的引物 1 进行扩增,所得产物电泳后都能得到信号强度比较明显的条带. 该条带经过内参 Marker 比对,所对应的是 300 bp 左右的碱基序列,这与 Cry1Ac 基因报道的是一段 301 bp 的碱基序列相符合. 而普通棉花提取的基因组,不管是种子还是叶片,都未能看到任何微弱的信号强度. 从实验的结果看没有发现样品有非特异性扩增的现象,自此可以确信棉花品种 GK 12 自身具有 Cry1Ac 基因,通过实验室种植后棉花叶片也能检测到转基因成分,说明转 Bt 基因棉花在生长过程中自身能表达 Cry1Ac 基因.

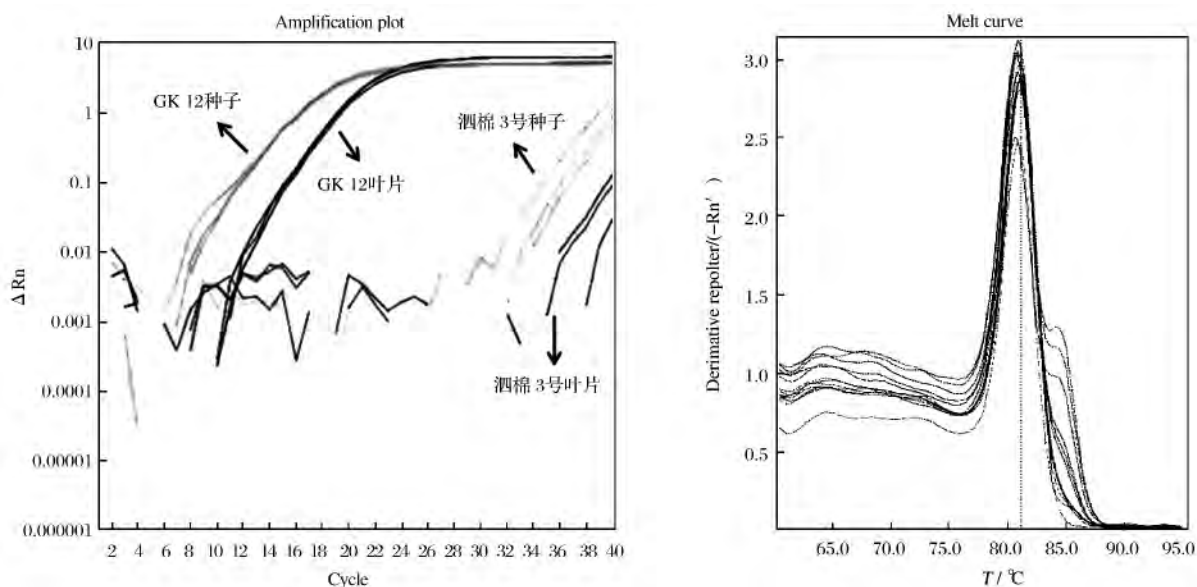


图 4 棉花基因组荧光定量 PCR 扩增曲线和融解曲线

Fig. 4 Amplification plot and melt curves of cotton after genomic quantitative real-time PCR

图 4 扩增曲线中 GK 12 种子和 GK 12 叶片分别代表转基因棉花种子和转基因棉花叶片,泗棉 3 号种子和泗棉 3 号叶片分别代表普通棉花种子和普通棉花叶片. 从图中所设定的阈值 Ct 上看,转基因棉花种子和转基因棉花叶片都能检测到 Bt 基因,而常规棉花无论是种子还是叶片均未检测到 Bt 基因. 融解曲线显示能见到单峰,并且 Tm 值都大于 80 °C,说明没有引物二聚体的出现.

2.4 ELISA 定量方法的建立

以浓度为横坐标,光密度 OD 值为纵坐标,在 0 ~ 1.0 ng/mL 的 Cry1Ab 和 Cry1Ac 蛋白标准系列溶液的浓度范围内绘制标准曲线,标准曲线的回归方

2.3 棉花中 Bt 基因的实时荧光定量 PCR 检测

用前面提取的 cDNA 模板来对棉花中表达的 Bt 蛋白基因进行检测. 为了对所检测样本之间进行比较,在荧光定量 PCR 反应的指数期,先设定一定荧光信号的域值 Ct,也就是 PCR 扩增信号刚进入对数增长长期时的荧光值^[12]. 每个模板的 Ct 值与模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,故通过 Ct 值的大小可以判断样本中是否含有转基因成分甚至浓度的大小. 由于实时荧光定量 PCR 具有定量、特异性强、灵敏度高、污染少和更加快速的优点,自出现以来发展十分迅速,目前已经广泛应用于生物学、医学和环境等领域微生物的检测、转基因产品的检测和定量、基因表达分析等方面^[13-14].

程与复相关系数分别为:

$$\text{Cry1Ab: } Y = 0.0013X + 0.1066 \quad r^2 = 0.9996$$

$$\text{Cry1Ac: } Y = 0.0022X + 0.0846 \quad r^2 = 0.9996$$

Cry1Ab 和 Cry1Ac 的浓度与 OD 值呈良好的线性关系,证明本实验所使用的定量方法可行,仪器运行状态良好,检测结果可信,可用于对 Bt 蛋白进行定量分析.

相对标准偏差 (RSD) 用来作为检验方法重现性的重要指标,通过考察日内和日间的变异性来对定量分析方法的重现性进行评估. 本实验对标准品溶液 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的日内 (n = 5) 和日间 (n = 3) 分别作了变异性考察,数据见表 2. 从表 2 可以看

出 Cry1Ab 和 Cry1Ac 在日内和日间变异的 RSD 都小于 2.0% ,表明建立的定量分析方法具有良好的重现性。

方法的精密度是通过分别重复测量 5 次

Cry1Ab 和 Cry1Ac 的标准品溶液 ,经酶标仪读数分析计算浓度来测定的 ,其结果的 RSD 均小于 2.0% ,表明建立的定量分析方法具有良好的精确性。

表 2 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的日内和日间变异分析结果

Table 2 Analytical results of intra-day and inter-day variabilities for Cry1Ab and Cry1Ac

化合物	日内/(ng/mL)		日间/(ng/mL)	
	Mean ± SD	RSD/%	Mean ± SD	RSD/%
Cry1Ab	0.942 ± 0.018	1.91	0.933 ± 0.016	1.71
Cry1Ac	0.916 ± 0.015	1.64	0.925 ± 0.012	1.30

Bt 蛋白稳定性的考察是通过在室温下(约 23 ℃)不避光放置样品溶液 48 h 内按设定的时间间隔取样进行酶联免疫反应 ,经酶标仪读数分析计算浓度来测定的。结果表明 ,Cry1Ab 和 Cry1Ac 的 RSD 均大于 26% ,表明样品在室温下容易降解 ,较不稳定 ,必须在使用完后即刻放进超低温冰箱(-70 ℃)保存 ,尽量避免 Bt 蛋白标准品母液反复的冻融。

3 结论

本文采用多种分子生物学手段(凝胶电泳、普通 PCR、实时荧光定量 PCR 和 ELISA 等)建立了对转基因棉花中的 Bt 基因成分的快速定性与定量分析方法。所建立的方法简单、快速、重现性和精密度较好 ,可为从事农业食品行业的工作人员和环境领域的科研人员提供一种简便快速地从转基因棉花中检测 Bt 毒蛋白的分析方法^[15-16]。

参考文献:

- [1] 郭三堆,洪朝阳,王京红,等. 苏云金芽孢杆菌贴泽变种 7-29 杀虫蛋白质结构基因的改造和表达[J]. 微生物学报,1992,32(2): 167-175.
- [2] 郭三堆,崔洪志. 中国抗虫棉 GFM Cry1A 杀虫基因的合成及表达载体构建[J]. 中国农业科技导报,2000,2(2): 21-26.
- [3] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011 [R]. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) Brief No 43. Ithaca, New York.
- [4] Huang J K, Mi J W, Lin H, et al. A decade of Bt cotton in Chinese fields: Assessing the direct effects

and indirect externalities of Bt cotton adoption in China [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(8): 981-991.

- [5] Lu Y H, Wu K M, Jiang Y Y, et al. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services[J]. *Nature*, 2012, 487: 362-365.
- [6] Head G, Surber J B, Watson J A, et al. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use [J]. *J Environ Entomol*, 2002, 31(1): 30-36.
- [7] Gruber H, Paul V, Meyer H H D, et al. Determination of insecticidal Cry1Ab protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-year field trial of Bt-maize MON810 [J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(1): 77-88.
- [8] Song J, Lei S R, Liu Y, et al. Uncertainty in measuring construct-specific fragments of genetically modified maize MON863 by real time quantitative PCR [J]. *Agricultural Science & Technology - Hunan*, 2011, 12(12): 1777-1780.
- [9] Shelton A M, Zhao J Z, Roush R T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants [J]. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 845-881.
- [10] Wu K M, Guo Y Y. The evolution of cotton pest management practices in China [J]. *Annu Rev Entomol*, 2005, 50: 31-52.
- [11] Fabrick J A, Mathew L G, Tabashnik B E, et al. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20(5): 651-665.
- [12] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature*

- Protocols ,2008 ,3: 1 101 –1 108.
- [13] 陈旭,齐凤坤,康立功,等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. 东北农业大学学报, 2010 ,41 (8): 148 –155.
- [14] 汪秀秀,杨捷琳,宋青,等. 转基因棉花 GHB119 品系特异性定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2014 ,22 (3): 380 –388.
- [15] Li Y L , Fang Z X , You J. Application of Box – Behnken experimental design to optimize the extraction of insecticidal Cry1Ac from soil [J]. J Agric Food Chem ,2013 ,61 (7): 1 464 –1 470.
- [16] Li Y L , Du J , Fang Z X , et al. Dissipation of insecticidal Cry1Ac protein in different matrices and its toxicity to non – target aquatic organisms [J]. J Agric Food Chem ,2013 ,61 (46): 10 864 –10 871.

Molecular Biological Methods for Qualitative and Quantitative Analysis of Cry Insecticidal Proteins in Transgenic Bt Cotton

LI Yan – liang^{1,2,3} , FANG Zhi – xiang⁴ , YOU Jing¹

(1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry , Guangzhou Institute of Geochemistry , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510640 , China ;

2. Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer in South Region of Ministry of Agriculture/Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation , Institute of Agricultural Resources and Environment , Guangdong Academy of Agricultural Sciences , Guangzhou 510640 , China ;

3. University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China ;

4. Nanjing Institute of Environmental Sciences , Ministry of Environmental Protection of China , Nanjing 210042 , China)

Abstract: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative method has been established to analyze Cry proteins extracted from transgenic Bt cotton. Various molecular biological methodologies such as gel electrophoresis , ordinary polymerase chain reaction (PCR) and real – time fluorescence quantitative PCR were applied to detect Bt gene in transgenic cotton qualitatively and quantitatively. Both standard curves of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1Ab and Cry1Ac proteins in the ELISA analysis were of good linearity with correlation coefficients (r^2) of > 0.999 , and the relative standard deviations (RSD) for the analyses were less than 2% . The newly established method is easy to operate , rapid , reproducible and precise , and it can be used in the fields of agro – food industry and environmental science to analyze Bt toxin proteins in genetically modified crops.

Key words: transgenic Bt cotton;Cry insecticidal protein;ELISA;gel electrophoresis;real – time fluorescence quantitative PCR

Classifying number: O657.32