

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910082840.6

[51] Int. Cl.

C12N 15/32 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月18日

[11] 公开号 CN 101580843A

[22] 申请日 2009.4.23

[21] 申请号 200910082840.6

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

[72] 发明人 赖锦盛 董永彬 宋伟彬 赵海铭

权利要求书1页 说明书16页 附图2页

[54] 发明名称

人工合成用于转基因抗虫植物的 Bt 杀虫基因

[57] 摘要

本发明公开了一种“人工合成用于转基因抗虫植物的 Bt 杀虫基因”，进一步，本发明涉及对 Cry1Ac 杀虫基因的编码框及密码子进行了系统的优化和改造，根据 Bt 蛋白不同区域的活性分析，按照单子叶植物编码特征获得了密码子和编码框优化的可以在单子叶植物中高效表达的抗虫基因 Cry1Ac - M。改造后的 Cry1Ac - M 基因被连在 CaMV35S - Adh1 为启动子的表达载体上。然后用基因枪共转化的方法把 Bt 基因 Cry1Ac - M 转到具有高效转化效率的玉米自交系中，转基因后代经 Bt 蛋白检测为阳性，田间抗虫试验检测为高抗。

-
- 1、一种对鳞翅目昆虫具有毒性的 *Bt CryIAc-M* 基因，其特征是该基因具有 SEQ ID N03 所示的核苷酸序列。
 - 2、权利要求 1 的基因序列，其中所说的基因序列包括该基因序列的部分序列及同源性高于 80% 的同源序列。
 - 3、含有权利要求 1 中所述 *Bt CryIAc-M* 基因的表达载体。
 - 4、权利要求 1 所述的 *Bt CryIAc-M* 基因在转化微生物或植物中的用途。

人工合成用于转基因抗虫植物的 *Bt* 杀虫基因

技术领域:

本发明属于生物防治技术领域, 具体涉及用于植物表达的 *Bt CryIAc-M* 基因。

背景技术:

Bt 基因编码杀虫晶体蛋白, 来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), 该菌为革兰氏阳性土壤杆菌, 属于芽孢杆菌属, 其菌体为短杆状, 生鞭毛, 单生或形成短链。它在芽孢形成过程中产生称为 δ -内毒素的杀虫伴胞晶体蛋白(控制合成这种蛋白质的基因在质粒上), 这些蛋白对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目等多种昆虫具有特异性的杀虫活性。

1981年 Schenpf 和 Whiteley 从苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中克隆了第一个编码 δ -内毒素的 *cry* 基因 *CryIAa1*。1985年 Adang, M. J 等从苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中克隆了 *CryIAc* 基因, 但由于该基因序列特征使得其在过去的二十几年中一直没有得到实际应用。截止到目前, 已确定数十种苏云金芽孢杆菌菌系及 130 多种它们编码的杀虫晶体蛋白。

1983年美国华盛顿大学宣布成功将卡那霉素抗性基因导入烟草细胞, 以及同年4月美国威斯康星大学宣布成功将大豆基因转入向日葵共同标志着植物转基因技术的诞生。1986年, 首批转基因植物(抗虫、抗除草剂)被批准进入田间试验。1989年哺乳动物抗体重链和轻链基因在烟草中成功表达并正确组装成有功能的抗体。1990年 Gordon-Kamm 首次报道用基因枪转化玉米悬浮细胞系获得了可育的转化体。随后, 玉米转基因技术开始迅猛发展, 大量转基因植物陆续研制开发成功。Koziel (1993) 等培育出了抗虫转基因玉米, 转基因植株能高水平表达 *CryIA(b)* 抗虫基因。张秀君 (1999) 等用基因枪法将两个含高赖氨酸蛋白质基因导入玉米的胚性愈伤组织。刘大文 (2000) 等将 *Zm13-Barnase* 基因转化玉米胚性愈伤组织, 经过除草剂筛选得到阳性植株。Ishida (1996) 等首次利用超双元载体建立了根癌农杆菌转化玉米自交系的幼胚, Frame (2002) 等成功实现了根癌农杆菌利用普通的双元载体转化幼胚。张艳贞 (2002) 等对根癌农杆菌介导法将 *Bt* 杀虫基因导入优良玉米自交系进行了较为系统的研究。Huang 和 Wei (2005) 利用根癌农杆菌成功转化了常规玉米自交系。Frame (2006) 等和 Lee (2007) 等分别利用农杆菌成功转化了常规玉米自交系。

我国在转基因技术研究方面, 已经建立了比较成熟的玉米转基因技术体系, 在国内, 中国农业大学较早的开展了玉米遗传转化的工作, 1994 在国内外首次用子房注射的方法把抗

虫基因 *Bt* 转入玉米并获得转基因植株，以自主知识产权基因 *Bt* 为代表的抗虫玉米已展示了良好的开发前景。同时，在无选择标记、选择标记基因删除和目标基因产物定时降解、植物组织特异性优势表达等核心技术创新方面已具有较强的创新能力。目前已分离的抗虫基因很多，主要的抗虫基因有：①细菌来源的抗虫基因，主要是 *Bt* 毒蛋白基因（*Cry1Ab*、*Cry1Ac*、*Cry2*、*Cry3*等）；②植物来源的蛋白酶抑制剂基因，特点在于抗虫谱广、来源于植物本身易于被公众接受；③细菌来源的营养杀虫蛋白（*Vip1*、*Vip2*、*Vip3*等），广谱抗鳞翅目，特别是对小地老虎、粘虫和甜菜叶蛾具有较强作用。由于基因抗虫能力及昆虫耐受性的影响，转基因抗虫产品主要通过获得更多更有效的抗虫基因、改造已有基因、双抗植物体等途径获得。

美国是世界上种植转基因玉米最大的国家，转基因玉米推广面积占美国玉米总面积的比例由2000年的25%上升至2007年的73%。数据显示，由于 *Bt* 玉米的使用，农药和杀虫剂的用量明显下降，大大减少了对环境的污染。既减少了农业生产成本，又可以节省劳动力。玉米抗虫的优良性状为社会带来了巨大的经济和环境效益，并被越来越多的大众所接受，其推广面积逐年大幅度提高。

本实验室对 *Cry1Ac* 基因进行了基因编码框长度及密码子优化改造，*Cry1Ac* 对鳞翅目昆虫（如玉米螟）有很强的毒性，但是原始的基因不能在植物中高效表达，达不到植物保护的要求，我们按照单子叶植物编码特征对 *Cry1Ac* 基因进行了全面的改造，改造后的 *Cry1Ac-M* 被连在 CaMV35S-*Adh1* 为启动子的表达载体上。通过共转化的方法，把 *Bt* 基因 *Cry1Ac-M* 转到具有高效转化效率的玉米自交系中，然后通过回交的方法获得了含有抗虫基因 *Bt Cry1Ac-M* 的转基因玉米骨干自交系。

发明内容：

发明目的

玉米是我国的重要粮食作物，当前玉米虫害严重，造成玉米大量减产，由此对我国玉米生产造成巨大的经济损失。生产上造成玉米减产的主要虫害是玉米螟，因此采取有效措施控制其危害对玉米生产至关重要。目前解决虫害的主要方法是在生长过程中喷施化学杀虫剂。但是化学杀虫剂不但杀死害虫，还杀死了害虫的天敌，造成生态平衡破坏和环境污染。

本发明的目的是针对 *Bt* 菌株来源的 *Cry1Ac* 基因，通过对基因编码框长度及密码子序列的人工改造，改造后的编码氨基酸密码子序列如 SEQ ID NO6 所示，将改造后的序列构建植物高效表达载体，使改造后的基因能够在植物中高效表达，将其转化农杆菌等微生物可以用于侵染玉米幼胚等植物组织，达到转化玉米等植物的功效，从而提高玉米等植物的抗虫性。通

过转基因及常规育种手段,把抗虫基因 *Bt* 转入生产中普遍应用的骨干自交系当中,为解决玉米生产中的虫害提供了一条行之有效途径。

解决问题

美国已成为世界上种植转基因玉米最大的国家,转基因玉米推广面积占美国玉米总面积的比例由 2000 年的 25% 上升至 2007 年的 73%。数据显示,由于 *Bt* 玉米的使用,农药和杀虫剂的用量明显下降,大大减少了对环境的污染。既减少了农业生产成本,又可以节省劳动力。玉米抗虫的优良性状为社会带来了巨大的经济和环境效益,而在我国转基因玉米品种培育较美国还有较大差距,为此 08 年国家启动了《转基因生物新品种培育科技重大专项》来改善目前状况。

我国在转基因抗虫玉米品种培育方面虽有些报道,但是却没有能够最终商品化,主要归结于 *Bt* 基因的抗虫效果及转化植株的稳定性。本发明对 *CryIAc* 蛋白的活性区域进行了细致的分析,在保证进一步提高其杀虫活性的前提下,按照单子叶植物编码特征对 *CryIAc* 进行了密码子及编码框长度的改造,使得该基因能够在植物体中高效表达,并构建了植物表达载体,通过共转化的方法,将改造后的 *Bt CryIAc-M* 杀毒蛋白基因转化玉米株系,经过多代多点检测,该基因不但在各株系中能够正常表达杀虫活性,而且能够稳定遗传,这就为转 *Bt* 抗虫基因的推广奠定基础。

技术方案

1、*CryIAc* 基因的改造

根据 *CryIAc* 不同区域的活性分析,我们对它的密码子及编码框进行了改造,改造后的核苷酸序列与原始的 *CryIAc* 同源性仅为 69%,编码框长度由原来的 1179 个氨基酸变为 616 个氨基酸,而 G+C 含量也由原来的 37.32% 变为 57.64%。

2、*Bt CryIAc-M* 基因的表达载体构建

将人工合成的 *Bt* 基因 3' 端分别连上启动子和增强子,5' 端连上终止子,从而实现 *Bt* 基因在植物体内正常的表达,具体图谱见(图1)。依次为:CaMV35S 启动子—*Adh1* intron—*Bt CryIAc-M* 编码区域—nos 终止子;

其中:

CaMV35S 启动子 538bp,来自花椰菜花叶病毒 CaMV,负责启动 *Bt* 基因的表达;(SEQ ID NO 1)

Adh1 intron 增强子 575bp, 来自玉米, 负责增强 *Bt* 基因的表达 (SEQ ID NO2);
Bt CryIac-M 基因编码区域 1868bp, 人工合成, 负责编码杀虫蛋白 (SEQ ID NO 3);
 nos 终止子 253bp, 为根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区胭脂碱合成酶基因终止子, 终止 *Bt* 基因的转录 (SEQ ID NO 4)。

3、*Bt CryIac-M* 基因在玉米植株中的表达

将含 *Bt CryIac-M* 基因的植物表达载体转化玉米胚性愈伤组织, 将含 *Bt CryIac-M* 的愈伤再生成苗, 检测 *Bt CryIac-M* 基因的表达情况 (图 2)。

4、转 *Bt CryIac-M* 基因玉米植株抗虫性鉴定

通过田间人工接虫检测转 *Bt CryIac-M* 植株玉米的抗虫性。将转 *Bt CryIac-M* 玉米植株及非转化植株于田间接虫, 进行抗虫性分析 (图 3)。

附图说明:

图 1、含 *Bt CryIac-M* 基因的植物表达载体。

图 2、利用金标 *Bt* 蛋白检测试纸检测转 *Bt CryIac-M* 基因植株。

从左向右依次为转 *Bt CryIac-M* 基因植株、转化空载体植株、非转基因植株。

图 3a、转 *Bt CryIac-M* 玉米接虫 2 周后表现。

图 3b、非转 *Bt CryIac-M* 玉米接虫 2 周后表现。

具体实施方式

1、*CryIac* 基因的改造

本发明对 *CryIac* 蛋白的活性区域进行了细致的分析, 在保证进一步提高其表达水平的前提下, 按照单子叶植物编码特征对 *CryIac* 进行了基因编码框及密码子改造。改造后的 *CryIac-M* 与 *CryIac* 序列同源性只有 69%, 编码框长度由原来的 1179 个氨基酸变为 616 个氨基酸, 而 G+C 含量也由原来的 37.32% 变为 57.64%, 改造前后密码子使用率见下表。密码子改变前序列见 SEQ ID N05, 改造后序列见 SEQ ID N06。

氨基酸	密码子	密码子使用率	密码子使用率
		野生型 <i>CryIac</i> 百分率%/氨基酸个数	改造基因 <i>CryIac-M</i> 百分率%/氨基酸个数
ARG	CGA	13.7/10	0/0

	CGC	4. 1/3	7. 0/3
	CGG	1. 4/1	0/0
	CGU	24. 7/18	0/0
	AGA	42. 5/31	0/0
	AGG	13. 7/10	93. 0/40
LEU	CUA	18. 1/17	0/0
	CUC	6. 4/6	0/0
	CUG	8. 5/8	10. 4/5
	CUU	16. 0/15	89. 6/43
	UUA	42. 6/40	0/0
	UUG	8. 5/8	0/0
SER	UCA	20. 0/18	0/0
	UCC	15. 6/14	96. 7/59
	UCG	13. 3/12	0/0
	UCU	17. 8/16	0/0
	AGC	6. 7/6	3. 3/2
	AGU	26. 7/24	0/0
THR	ACA	42. 3/30	0/0
	ACC	15. 5/11	94. 4/34
	ACG	21. 1/15	0/0
	ACU	21. 1/15	5. 6/2
PRO	CCA	49. 1/26	48. 5/16
	CCC	3. 8/2	45. 5/15
	CCG	20. 8/11	0/0
	CCU	26. 4/14	6. 0/2
ALA	GCA	25. 8/17	0/0
	GCC	12. 1/8	93. 9/31
	GCG	22. 7/15	0/0

	GCU	39.4/26	6.1/2
GLY	GGA	40.2/33	0/0
	GGC	9.8/8	7.3/3
	GGG	22.0/18	0/0
	GGU	28.1/23	92.7/38
ILE	AUA	24.7/18	0/0
	AUC	23.3/17	95.7/44
	AUU	52.0/38	4.3/2
VAL	GUA	39.8/33	0/0
	GUC	9.6/8	0/0
	GUG	20.5/17	100/40
	GUU	30.1/25	0/0
LYS	AAA	66.7/22	0/0
	AAG	33.3/11	100/2
ASN	AAC	28.0/23	95.7/45
	AAU	72.0/59	4.3/2
GLN	CAA	86.0/37	0/0
	CAG	14.0/6	100/27
HIS	CAC	18.2/4	100/9
	CAU	81.8/18	0/0
GLU	GAA	79.1/72	0/0
	GAG	20.9/19	100/29
ASP	GAC	22.0/13	96/24
	GAU	78.0/46	4/1
TYR	UAC	20.0/11	100/28
	UAU	80.0/44	0/0
CYS	UGC	37.5/6	100/2
	UGU	62.5/10	0/0

PHE	UUC	20.4/11	100/36
	UUU	79.6/43	0/0
MET	AUG	100/10	100/8
TRP	UGC	100/6	100/2

2 *Bt CryIAc-M* 基因的表达载体构建

插入序列的大小和结构，确定其特性的分析方法

插入序列的大小约为3234bp，依次为：

CaMV35S启动子—*Adh1* intron—*CryIAc-M*编码区域—*nos*终止子；

其中：

CaMV35S 启动子 538bp，来自花椰菜花叶病毒 CaMV，负责启动 *CryIAc-M* 基因的表达；

Adh1 intron 增强子 575bp，来自玉米，负责增强 *CryIAc-M* 基因的表达；

CryIAc-M 基因编码区域 1868bp，人工合成，负责编码杀虫蛋白；

nos 终止子 253bp，为根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区胭脂碱合成酶基因终止子，终止 *CryIAc-M* 基因的转录；

植物选择标记基因 *bar*，552bp，来自吸水链霉素，编码磷化麦黄酮乙酰转移酶，用来和 *CryIAc-M* 基因共转化。

各片段大小和排列次序质粒的酶切图谱及重组过程确定，并参考相关的资料。

3 目的基因与载体构建的图谱，载体的名称、来源、结构、特性和安全性，包括载体是否有致病性以及是否可能演变为有致病性分析。

目的基因是和植物筛选标记基因 *bar* 进行共转化，目的基因所在的载体是线性结构，仅包括 CaMV35S 启动子、*Adh1* intron、*Bt* 编码区域、*nos* 终止子，不含有任何其他冗余序列。这些核苷酸序列均不带有致病基因，不携带毒素合成基因，对动植物安全，无演变为有致病性质粒的可能。

4 载体中插入区域各片段的资料

4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称

CaMV35S 启动子，780bp 长，来自花椰菜花叶病毒 CaMV，负责启动 *CryIAc-M* 基因的表达。

nos 终止子，250bp 长，为根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区胭脂碱合成酶基因终止子，终止 *CryIAc-M* 基因转录。

4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称

标记基因 *bar* 基因 (bialaphos resistance gene), 长552bp, 编码217个氨基酸。能使植物抵抗以 L-Phosphioth ricin (PPT, γ -羟基甲基亚膦基- α -酪氨酸, 膦化麦黄酮) 为活性成分的除草剂 (De-Block等, 1987; Wohlleben等, 1988), 如除草剂 Bialaphos (双丙氨膦) 和 Glufosinate (草丁膦)。*bar* 基因是从合成 Bialaphos 的吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 中分离出来的 (Wohlleben等, 1988), 是 *S. Hygroscopicus* 避免自身产物 Bialaphos 毒害的保护基因, 编码 PPT 乙酰转移酶 (PAT)。PAT 催化乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到 PPT 的氨基上, 形成乙酰 PPT, 而使 PPT 失活。

5 转基因方法

采用基因枪法将插入序列导入受体植株的愈伤组织, 经除草剂草丁膦筛选后获得转基因植株。具体方法为:

一、诱导 II 型愈伤组织

- 1、去除苞叶。切除果穗顶端约 1cm 左右, 用镊子从顶端插入果穗, 这样可以以镊子当作把手, 有利与操作, 然后把果穗放入含有消毒液的烧杯里, 根据实际需要, 可以在同一个烧杯里放 4-6 个果穗。
- 2、向烧杯里加约 700ml 的消毒液 (50% 的漂白剂或 5.25% 的次氯酸钠, 并加入一滴 Tween 20) 用来浸泡果穗, 在消毒 20 分钟过程当中, 不时的旋转果穗同时轻轻拍打烧杯以驱除子粒表面的气泡, 从而达到最佳的消毒效果, 消毒结束后, 取出果穗并放入盛满灭菌水的烧杯里, 在水里洗 3 次, 然后准备剥胚。
- 3、把消毒过果穗的一端放在一个大的培养皿上, 用大的手术刀削掉子粒的顶部 (1-2mm), 在这过程当中, 要勤消毒所用的工具, 如: 手术刀片、培养皿、剥胚刀等。
- 4、用剥胚刀的刀尖插在胚和胚乳之间, 然后轻轻向上撬出幼胚, 用小的手术刀尖轻轻托起幼胚, 确保幼胚不受到任何的损伤, 把幼胚的胚轴面紧贴放有滤纸的 N6E 培养基, 胚的密度大约是 2X2cm (20-25 个/皿)。
- 5、新鲜的幼胚大约 1.5-1.8mm 大小, 放置在 N6E 培养基上面, 每隔 10-15 天继代一次, 刚获得的幼胚容易长出芽状组织, 这样可以提早去掉该组织, 而不用等到 10-15 天。
- 6、挑选优等 II 型愈伤: 第二次愈伤继代时, II 型愈伤已经开始形成, 其特征为: 颜色米黄, 生长速度快, 松散易碎, 新生愈伤顶端呈现米粒状颗粒。可以根据其特征来进行有针对性的挑选, 可以把已经分化出的 II 型愈伤分成麦粒状大小, 每皿 (90cm) 放 20-25

块。

7、为了保证愈伤的质量，保证每次继代的时间间隔不能超过 15 天，同时保证一直有 400 皿以上的 II 型愈伤，以便做基因枪转化。

二、金粉的准备和基因枪轰击

1、称量 15mg 金粉并放入灭菌后的 1.5ml 的 eppendorf 离心管当中，这样结果是 10X 的量。

2、在超净台下，向每个离心管中加入 500ul 冰冻（-20℃）无水乙醇，震荡 15sec，在超净台上收集金粉到离心管管底部，静止 30 分钟，直到金粉全部沉淀。

3、然后转速 3000rpm 离心 60sec，彻底去除乙醇。再向离心管中加入冰浴的无菌 ddH₂O，用手指轻弹混匀，然后转速 3000rpm 离心 60sec。重复上述步骤 2-3 次，最后一次用转速 5000rpm 离心 15sec，然后移去上清，再用 500ul ddH₂O 悬浮。震荡 15sec，然后快速悬浮混匀，边混边分装。

4、具体的分装方法是：先把 10 个离心管放好，用 25ul 的量分装，重复分装两次，第一遍从第一个管开始，第二遍从最后一个管开始，这样每个离心管含有 50ul 水，1.5mg 金粉。然后盖上盖子于 -20℃ 保存。

5、上午先把要打枪的愈伤分成小块，堆积在渗透培养基 (N6OSM) 的中央区域，根据计划做准备。

6、目的 DNA 的包裹先把分装好的金粉 (-20℃) (每管 1.5mg 并保存在 50 微升超纯水当中) 放在冰上，同时把 CaCl₂ 浓度为 2.5M (4℃) 和亚精胺浓度为 0.1M (-70℃) 也放在冰上融化，其中 CaCl₂ 和亚精胺分装成一次性使用的包装。

7、用手指轻轻弹装有金粉的离心管使之悬浮起来，然后加入目的 DNA (60-200ng)，迅速用手指轻弹使之混匀然后加入 50 微升 CaCl₂ 并用枪头轻轻吸吐使之混匀，然后加入 20 微升亚精胺，静置 30 秒把离心管放在漩涡振荡器上面震荡 10 分钟（注意使漩涡液体不要上升太高，同时使液体全部悬浮起来）。

8、离心管放到冰上静置 5 分钟（如果震荡以后有金粉在液体表面漂浮，静置前再用手指轻弹使金粉沉淀下来），然后 2000rpm 离心 15 秒，然后用吸头吸掉上清加入预冷（-20℃）的无水乙醇 250 微升，并用枪头轻轻（使 20 微升的枪调到 10-13 微升）吸吐混匀重

复以上步骤 3-4 次，然后加入无水乙醇 120-140 微升使之平均分成 8 份并加到宏载片上面开始基因枪轰击。

9、基因枪轰击以后的 1-12 小时把愈伤倒到 N6E 培养基上进行恢复。

三、转基因植株的获得

1、在 N6E 培养基上诱导愈伤组织 10-14 天后，转移到 N6S（选择培养基）上面（2.0mg/L bialaphos）开始选择含有转化子的细胞，然后用 parafilm 封口膜封培养皿。

2、3 周以后，把胚转移到新鲜的 N6S 培养基上面，大约 6-8 周，就会选到抗草胺膦的克隆。

3、把 II 型愈伤组织每皿转移 15 片（4mm/片）到再生培养基 I 上面，25 度暗培养 2-3 周，并用通风带封住培养皿。

4、2-3 周后，把成熟的胞质胚转移到再生培养基 II 上面准备发芽，同时用通风带封住培养皿，植株将在这个培养基里长叶和根。

5、移栽成活的转化植株长出 7-8 叶时，取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测外源基因，转基因植株开花后套袋自交或姊妹交结实。种子播种在温室，植株长到 4-6 叶期时取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测是带有外源基因，对 PCR 阳性植株进行 Southern blotting 检测，选转基因植株进行基因表达分析。

6、检测 *Bt CryIAb-M* 基因在转化植株中的表达

采用 Bt-Cry1Ab/Ac 免疫检测试纸检测 Bt 蛋白表达情况。

6.1、检测样本处理及准备

取 0.3g 新鲜的玉米叶片，放入 2ml 离心管中，加入 600 微升蒸馏水和 0.2g 石英砂研磨，取上清液检测。

6.2、样本检测

使用前将试纸恢复至室温（15-30℃），取 500 微升研磨上清液至微量离心管中，将检测试纸垂直插入微量离心管中，样品端淹没入样品液的深度约为 0.5cm。10 秒钟后，取出放平阅读检测结果。

6.3、结果判断

检测线及对照线一般可在 3-5min 内出现（图 2）。

阳性结果：在检测条上出现两条紫红色条带，一条检测线和一条质控线。

阴性结果：在检测条上仅出现一条紫红色质控线。

无效结果：在质控线位置未出现一紫红色条带，表明操作不正确或试纸变质。

7、转 *Bt Cry1Ac-M* 基因玉米植株田间抗虫性鉴定

转基因玉米植株具有抗玉米螟特性，其叶片中含有 *Bt* 杀虫蛋白。未转基因的对照植株不能合成 *Bt* 杀虫蛋白，喂食针尖大小玉米螟幼虫后基本死亡。转基因植株的叶片有 *Bt* 杀虫蛋白是由于转入了 CaMV35S 启动子启动的 *Bt* 基因的表达。

于玉米 8 叶期将已经黑头的、即将孵化的玉米螟卵块接于玉米心叶中。每株接 2-3 个中等大小的卵块，于接虫后 20-25 天调查食叶级别。食叶级别的记载方法按国际玉米螟协作组制定的 9 级分级标准。

1 级：虫孔针状，稀少分散 2 级：虫孔针状，数量中等 3 级：虫孔针状，数量大

4 级：虫孔火柴头大，稀少分散 5 级：虫孔火柴头大 数量中等 6 级：虫孔火柴头大 数量大

7 级：虫孔更大 稀少分散 8 级虫孔更大 数量中等 9 级 虫孔更大 数量大

其中：1-2.9 级为高抗；3-4.9 级为抗；5-6.9 级为感；7-9 级为高感。

根据上述标准，我们对含有 *Bt Cry1Ac-M* 基因及不含有 *Bt Cry1Ac-M* 基因的玉米株系进行田间接虫，结果含有 *Bt Cry1Ac-M* 基因的株系表现为高抗，而不含有 *Bt Cry1Ac-M* 基因的株系表现为高感（图 3）。

SEQ ID NO 1 (CaMV35S 启动子序列)

CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAAGCTCGCCGTAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGAC
AAGAAGAAAATCTTCGTC AACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAA
TTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAA
GGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGG
ATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACT

SEQ ID NO2 (Adh1 intron 增强子序列)

CCATGGGATCAAGTGCAAAGGTCCGCCTTGTTTCTCCTCTGTCTCTTGATCTGACTAATCTGGTTTATGATTGTTGAGTAATTTGGGG
AAAGCTAGCTTCGTCCACAGTTTTTTTTTCGATGAACAGTGCCGAGTGGCGCTGATCTTGTATGCTATCCTGCAATCGTGGTGAACCTTAT
TTCTTTTATATCCTTCACTCCCATGAAAAGGCTAGTAATCTTTCTCGATGTAACATCGTCCAGCACTGCTATTACCGTGTGGTCCATCCGA
CAGTCTGGCTGAACACATCATACGATATTGAGCAAAGATCTATCTTCCCTGTTCTTTAATGAAAGACGTCATTTTCATCAGTATGATCTAA
GAATGTTGCAACTTGCAAGGAGGCGTTTCTTTCTTTGAATTTAACTAAGTTCGTTGAGTGGCCCTGTTTCTCGGACGTAAGGCCCTTGTCTGC
TCCACACATGTCCATTTCGAATTTTACCGTGTTTAGCAAGGGCGAAAAGTTTGCATCTTGATGATTTAGCTTGACTATGCGATTGCTTTCCT
GGACCCGTGCAGCTGCGGTGGCAACTAGT

SEQ ID NO 3 (*Bt CryIac-M* 基因编码区域序列)

ATGGACAACAATCCCAACATCAACGAGTGCATTCCCTACAAGTCCCTTTCCAATCCCGAGGTGGAGGTGCTTGGTGGTGAGAGGATCGAGA
CCGGTTACACTCCCATCGACATCTCCCTTTCCCTTACCCAGTTCCTTCTTTCCGAGTTCGTGCCCGGTGCCGGTTTCGTGCTTGGTCTTGT
GGACATCATCTGGGGCATCTTCGGTCCCTCCAGTGGGACGCCTTCCTTGTGCAGATCGAGCAGCTTATCAACCAGAGGATCGAGGAGTTC
GCCAGGAACCAGGCCATCTCCAGGCTTGAGGGTCTTTCCAACCTTTACCAGATCTACGCCGAGTCTTCAGGGAGTGGGAGGCCGATCCCA
CCAATCCCGCCCTTAGGGAGGAGATGAGGATCCAGTTC AACGACATGAACTCCGCCCTTACCACCGCCATCCCACTGTTCCCGGTGCAGAA
CTACCAGGTGCCACTGCTGTCCGTGTACGTGCAGGCCCAACCTTCACCTTCCGTGCTTAGGGACGTGTCCGTGTTCCGGTCCAGAGGTGG
GGTTTCGACGCCGCCACCATCAACTCCAGGTACAACGACCTTACCAGGCTTATCGGTAACCTACACCGACTACGCCGTGAGGTGGTACAACA
CCGGTCTTGAGAGGGTGTGGGGTCCCGACTCCAGGGACTGGGTGAGGTACAACCAGTTCAGGAGGGAGCTTACCCTTACCGTCTTGACAT
CGTGGCCCTGTTCCCTAACTACGACTCCAGGAGGTACCCTATCAGGACCGTGTCCAGCTTACCAGGGAGATCTACACCAACCCAGTGCTT
GAGAACTTCGACGGTTCCTTCCGCGGTTCCGCCAGGGTATCGAGAGGTCCATCAGGAGCCACACCTTATGGACATCCTTAACTCCATCA
CCATCTACACCGACGCCACCGCGGTTACTACTACTGGTCCGGCCACCAGATCATGGCCAGCCAGTGGGTTTCTCCGGTCCCGAGTTCAC
CTTCCCACTTTACGGTACCATGGGTAACGCGCTCCACAGCAGAGGATCGTGGCCAGCTTGGTCAGGGTGTGTACAGGACCCTTCTCTCC
ACCCTTACAGGAGGCCCTTCAACATCGGTATCAACAACCAGCAGCTTTCGTGCTTGACGGTACCGAGTTCGCCTACGGTACCTCCTCCA

ACCTTCCCTCCGCCGTGTACAGGAAGTCCGGTACCCTGGACTCCCTTGACGAGATTCCACCACAGAACAACAACGTGCCACCAAGGCAGGG
 TTTCTCCCACAGGCTTTCCCACGTGTCCATGTTCCAGGTCCGGTTTCTCCAACCTCCCGTGTCCATCATCAGGGCTCCAATGTTCTCCTGG
 ATCCACAGGTCCGCCGAGTTCAACAACATCATCGCTCCGACTCCATCACCCAGATCCCAGCCGTGAAGGGTAACTTCTGTTCACCGTT
 CCGTGATCTCCGGTCCCGTTTACCAGGTGGCGACCTTGTGAGGCTTAACTCCTCCGGTAAACAACATCCAGAACCAGCGTTACATCGAGGT
 GCCATCCACTTCCCATCCACCTCCACCAGGTACAGGGTGAGGGTGAGGTACGCCTCCGTGACTCCAATCCACCTTAACTGAACTGGGGT
 AACTCCTCCATCTTCTCAACACCGTCCCCGCCACCGCCACCTCCCTTGACAACCTTCCAGTCCCTCCGACTTCCGGTACTTCGAGTCCGCCA
 ACGCCTTCACTCCTCCCTTGGTAACATCGTGGGTGTGAGGAACTTCTCCGGTACCGCCGGTGTGATCATCGACAGGTTCGAGTTCATCCC
 AGTGACCGCCACCCTTGAGGCCGAGTACTGA

SEQ ID NO 4 (nos 终止子序列)

CGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAAATTCTGTTGAATTACGTTA
 AGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGGAT
 AGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGATCGGG

SEQ ID NO 5 (密码子改变前 *CryIac* 基因及氨基酸序列)

1 ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA AGT AAC CCT GAA
 61 GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG
 121 TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA
 181 GTT GAT ATA ATA TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT
 241 GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC ATT TCT AGA TTA
 301 GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT
 361 CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC
 421 CTT ACA ACC GCT ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA
 481 TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA GTG TTT GGA CAA
 541 AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT
 601 GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA
 661 CCG GAT TCT AGA GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA
 721 TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA ATT CGA ACA GTT
 781 TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT
 841 CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT
 901 AAC AGT ATA ACC ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA

961 ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG CTA TAT GGA ACT
1021 ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA
1081 ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA
1141 TCT GTT CTT GAC GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA
1201 TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG AAT AAC AAC GTG
1261 CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT
1321 AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA AGA GCT CCT ATG TTC TCT TGG ATA CAT CGT AGT GCT
1381 GAA TTT AAT AAT ATA ATT GCA TCG GAT AGT ATT ACT CAA ATC CCT GCA GTG AAG GGA AAC
1441 TTT CTT TTT AAT GGT TCT GTA ATT TCA GGA CCA GGA TTT ACT GGT GGG GAC TTA GTT AGA
1501 TTA AAT AGT AGT GGA AAT AAC ATT CAG AAT AGA GGG TAT ATT GAA GTT CCA ATT CAC TTC
1561 CCA TCG ACA TCT ACC AGA TAT CGA GTT CGT GTA CGG TAT GCT TCT GTA ACC CCG ATT CAC
1621 CTC AAC GTT AAT TGG GGT AAT TCA TCC ATT TTT TCC AAT ACA GTA CCA GCT ACA GCT ACG
1681 TCA TTA GAT AAT CTA CAA TCA AGT GAT TTT GGT TAT TTT GAA AGT GCC AAT GCT TTT ACA
1741 TCT TCA TTA GGT AAT ATA GTA GGT GTT AGA AAT TTT AGT GGG ACT GCA GGA GTG ATA ATA
1801 GAC AGA TTT GAA TTT ATT CCA GTT ACT GCA ACA CTC GAG GCT GAA TAT AAT CTG GAA AGA
1861 GCG CAG AAG GCG GTG AAT GCG CTG TTT ACG TCT ACA AAC CAA CTA GGG CTA AAA ACA AAT
1921 GTA ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTG TCC AAT TTA GTT ACG TAT TTA TCG GAT GAA TTT
1981 TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT
2041 GAA CGC AAT TTA CTC CAA GAT TCA AAT TTC AAA GAC ATT AAT AGG CAA CCA GAA CGT GGG
2101 TGG GGC GGA AGT ACA GGG ATT ACC ATC CAA GGA GGG GAT GAC GTA TTT AAA GAA AAT TAC
2161 GTC ACA CTA TCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA AAA ATC GAT
2221 GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA
2281 GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT
2341 ACG GGT TCC TTA TGG CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT
2401 CGA TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG GAT GGA GAA
2461 AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA
2521 AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA
2581 CTA GGG AAT CTA GAG TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG
2641 AAA AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA ACA AAT ATC

2701 GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA
2761 TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT
2821 CGA GAA GCT TAT CTG CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA
2881 GAA TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT GTC ATT AAA
2941 AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA
3001 GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA
3061 GAA GTT CGT GTC TGT CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA
3121 TAT GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA CTG AAG TTT
3181 AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT
3241 GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT
3301 CCT TCC GTA CCA GCT GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA
3361 AGA GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA CCA GTT GGT
3421 TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA
3481 GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG 3537

SEQ ID NO 6 (密码子改变后 *CryIAc-M* 基因及氨基酸序列)

1 ATG GAC AAC AAT CCC AAC ATC AAC GAG TGC ATT CCC TAC AAC TGC CTT TCC AAT CCC GAG
61 GTG GAG GTG CTT GGT GGT GAG AGG ATC GAG ACC GGT TAC ACT CCC ATC GAC ATC TCC CTT
121 TCC CTT ACC CAG TTC CTT CTT TCC GAG TTC GTG CCC GGT GCC GGT TTC GTG CTT GGT CTT
181 GTG GAC ATC ATC TGG GGC ATC TTC GGT CCC TCC CAG TGG GAC GCC TTC CTT GTG CAG ATC
241 GAG CAG CTT ATC AAC CAG AGG ATC GAG GAG TTC GCC AGG AAC CAG GCC ATC TCC AGG CTT
301 GAG GGT CTT TCC AAC CTT TAC CAG ATC TAC GCC GAG TCC TTC AGG GAG TGG GAG GCC GAT
361 CCC ACC AAT CCC GCC CTT AGG GAG GAG ATG AGG ATC CAG TTC AAC GAC ATG AAC TCC GCC
421 CTT ACC ACC GCC ATC CCA CTG TTC GCC GTG CAG AAC TAC CAG GTG CCA CTG CTG TCC GTG
481 TAC GTG CAG GCC GCC AAC CTT CAC CTT TCC GTG CTT AGG GAC GTG TCC GTG TTC GGT CAG
541 AGG TGG GGT TTC GAC GCC GCC ACC ATC AAC TCC AGG TAC AAC GAC CTT ACC AGG CTT ATC
601 GGT AAC TAC ACC GAC TAC GCC GTG AGG TGG TAC AAC ACC GGT CTT GAG AGG GTG TGG GGT
661 CCC GAC TCC AGG GAC TGG GTG AGG TAC AAC CAG TTC AGG AGG GAG CTT ACC CTT ACC GTG
721 CTT GAC ATC GTG GCC CTG TTC CCT AAC TAC GAC TCC AGG AGG TAC CCT ATC AGG ACC GTG
781 TCC CAG CTT ACC AGG GAG ATC TAC ACC AAC CCA GTG CTT GAG AAC TTC GAC GGT TCC TTC

841 CGC GGT TCC GCC CAG GGT ATC GAG AGG TCC ATC AGG AGC CCA CAC CTT ATG GAC ATC CTT
901 AAC TCC ATC ACC ATC TAC ACC GAC GCC CAC CGC GGT TAC TAC TAC TGG TCC GGC CAC CAG
961 ATC ATG GCC AGC CCA GTG GGT TTC TCC GGT CCC GAG TTC ACC TTC CCA CTT TAC GGT ACC
1021 ATG GGT AAC GCC GCT CCA CAG CAG AGG ATC GTG GCC CAG CTT GGT CAG GGT GTG TAC AGG
1081 ACC CTT TCC TCC ACC CTT TAC AGG AGG CCC TTC AAC ATC GGT ATC AAC AAC CAG CAG CTT
1141 TCC GTG CTT GAC GGT ACC GAG TTC GCC TAC GGT ACC TCC TCC AAC CTT CCC TCC GCC GTG
1201 TAC AGG AAG TCC GGT ACC GTG GAC TCC CTT GAC GAG ATT CCA CCA CAG AAC AAC AAC GTG
1261 CCA CCA AGG CAG GGT TTC TCC CAC AGG CTT TCC CAC GTG TCC ATG TTC AGG TCC GGT TTC
1321 TCC AAC TCC TCC GTG TCC ATC ATC AGG GCT CCA ATG TTC TCC TGG ATC CAC AGG TCC GCC
1381 GAG TTC AAC AAC ATC ATC GCC TCC GAC TCC ATC ACC CAG ATC CCA GCC GTG AAG GGT AAC
1441 TTC CTG TTC AAC GGT TCC GTG ATC TCC GGT CCC GGT TTC ACC GGT GGC GAC CTT GTG AGG
1501 CTT AAC TCC TCC GGT AAC AAC ATC CAG AAC CGC GGT TAC ATC GAG GTG CCC ATC CAC TTC
1561 CCA TCC ACC TCC ACC AGG TAC AGG GTG AGG GTG AGG TAC GCC TCC GTG ACT CCA ATC CAC
1621 CTT AAC GTG AAC TGG GGT AAC TCC TCC ATC TTC TCC AAC ACC GTG CCC GCC ACC GCC ACC
1681 TCC CTT GAC AAC CTT CAG TCC TCC GAC TTC GGT TAC TTC GAG TCC GCC AAC GCC TTC ACC
1741 TCC TCC CTT GGT AAC ATC GTG GGT GTG AGG AAC TTC TCC GGT ACC GCC GGT GTG ATC ATC
1801 GAC AGG TTC GAG TTC ATC CCA GTG ACC GCC ACC CTT GAG GCC GAG TAC TGA 1851

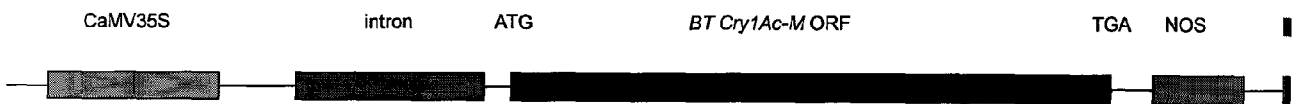


图 1

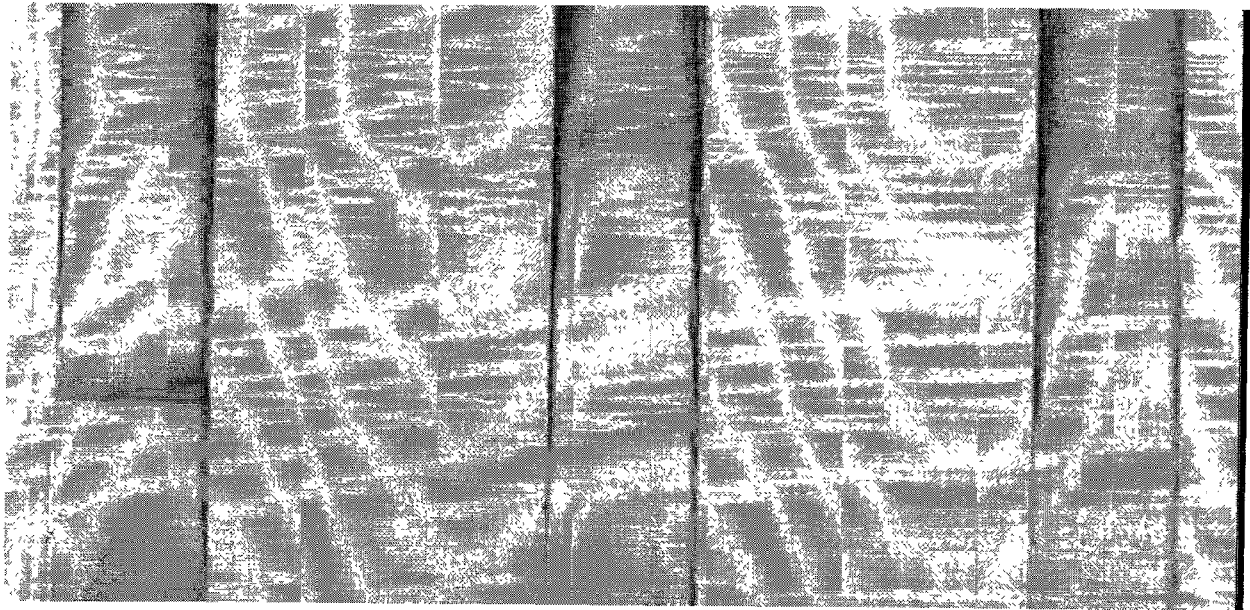


图 2

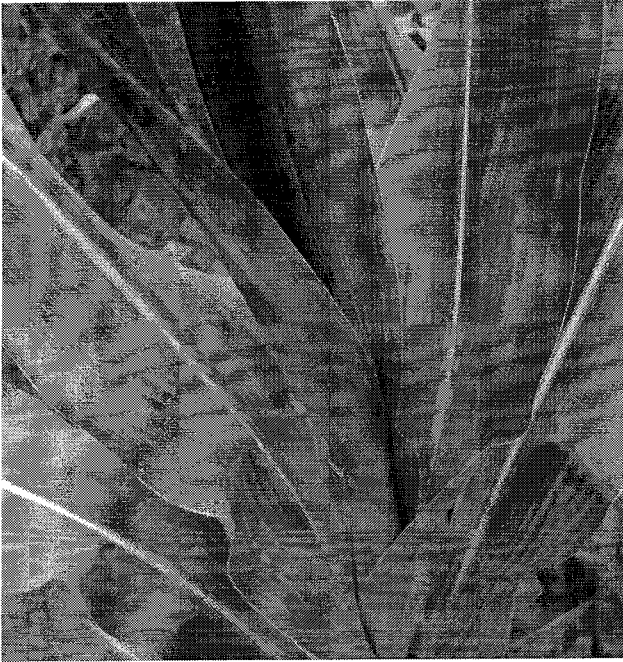


图 3a



图 3b