

转基因抗虫棉凝集素的检测

周晓静, 白素芬*, 李 欣, 闫凤鸣

(河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为探讨外源杀虫基因导入对棉花重要防御物质凝集素的影响, 同时建立棉花凝集素的灵敏检测方法, 采用血凝法检测转基因 (*Bt*, *CpTI* 和外源凝集素基因) 棉花中凝集素的变化, 并经胰蛋白酶处理鸡血红细胞、不同温度处理和比色法测定棉花的凝集素活性。结果表明, 棉花叶片中凝集素水平随棉花生长而发生变化, 不同外源基因的导入使棉花凝集活性升高或降低。采用经胰蛋白酶修饰后的鸡血红细胞检测, 棉花凝集活性明显提高, 最高是未经处理检测的 64 倍。棉花凝集素具有一定的抗热性, 在 45 °C 以下很稳定, 但随温度的升高和处理时间的延长活性下降。血凝反应和比色法均能直观、定量地反映棉株中凝集素活性, 但后者精度更高。以上研究结果表明, 外源杀虫基因的导入引起棉花凝集素水平发生改变, 比色法可以作为检测棉株中自身和外源凝集素基因表达后凝集活性的重要手段。

关键词: 棉花; 凝集素; 外源杀虫基因; 转基因棉

中图分类号: Q78 S435. 622 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)09-0091-04

Detection of Lectin in Transgenic Insect-resistant Cotton

ZHOU Xiao-jing, BAI Su-fen*, LI Xin, YAN Feng-ming

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the effects of trans-exogenous insect-resistant genes on cotton lectin as a defense protein and establish a sensitive method for detection of the hemagglutination (HA) activity of cotton lectin, the HA reaction was used to detect the changes of HA activity in transgenic cottons, and a trypsin-induced HA assay, treatment by different temperatures and colorimetry were used to detect HA activity in cotton. The results showed that the HA activity of cotton lectin changed during the vegetative growth period of cotton. The HA activity increased or decreased after the introduction of some exogenous insect-resistant genes including *Bt*, *CpTI* or agglutinin genes with different insect-resistant mechanisms into cotton genome. The HA activity was 64 times that of the control when detected with trypsinized chicken red cells. The cotton lectin showed a certain resistant to heat treatment, stable below 45 °C, but its activity decreased as a result of high temperature or long treatment time. The contents of cotton lectin could be detected easily using the methods of both HA reaction and colorimetry, but the latter was of higher accuracy. It is concluded that trans-exogenous insect-resistant genes can induce changes of lectin level in transgenic cottons, and the colorimetry can be used as an important method to evaluate the HA activity in cotton.

Key words: cotton; lectin; exogenous insecticidal genes; transgenic cotton

凝集素广泛分布于植物、动物和微生物中, 尤以在植物种子和储藏器官中最为丰富, 是具有至少 1 个

非催化结构域并能可逆结合特异性单糖或寡糖的蛋白或糖蛋白^[1]。它是参与有机体生命活动过程的重

收稿日期: 2012-03-22

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08012-007B)

作者简介: 周晓静 (1986-), 女, 河南巩义人, 在读硕士研究生, 研究方向: 昆虫生理生化。E-mail: zhouxiaojingzj2@163.com

* 通讯作者: 白素芬 (1968-), 女, 山西平遥人, 副教授, 博士, 主要从事昆虫生理生化与害虫生物防治研究。

E-mail: sfbai68@yahoo.com.cn

要物质,功能多样,具有抗肿瘤,免疫调节,抗真菌、病毒、细菌和线虫及昆虫的功能^[2-3]。对棉花凝集素的研究表明,凝集素水平与品种的抗病性呈正相关,抗病品种中凝集素的含量比感病品种高 4 倍以上,凝集活性强的棉花品种抗枯萎病能力强,能显著抑制棉花枯萎病菌的生长和分生孢子的萌发^[4-5]。而其他植物来源的凝集素,如雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)、半夏凝集素(*Pinellia ternata* agglutinin, PTA)、麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)等则杀虫效果明显,尤其对飞虱、蚜虫、叶蝉等危害极强的刺吸式害虫具有延缓发育、降低生殖力、增加死亡率的作用^[6-9]。因为在防御植物病虫害方面的突出效果,植物凝集素成为当前转基因抗虫作物研究的首选。利用转基因技术将外源杀虫基因导入农作物,增强作物的抗虫性,在棉花上的运用最成功,如获得了抗棉铃虫等鳞翅目害虫的转 *Bt*、*CpTI* 基因棉和抗棉蚜的转外源凝集素基因棉^[10-11]。但值得注意的是,当这些外源杀虫基因导入棉株基因组后,打破了棉株原有基因的连锁群,势必造成其生理生化过程发生变化,如对棉花自身凝集素水平可能产生影响,而这将关系到棉花的抗性水平。为此,选取 3 种不同类型的杀虫基因(*Bt*、*CpTI* 和外源凝集素基因),研究其导入棉花后对重要抗性物质凝集素活性的影响,并建立棉花凝集素的灵敏检测方法,以此作为检测和监测棉株中自身和外源凝集素基因表达后凝集活性的重要手段。

1 材料和方法

1.1 供试棉花

供试棉花材料 10 个,即转 *Bt* 基因抗虫棉 H2 及其亲本中棉 12、转 *Bt* 和 *CpTI* 基因抗虫棉中 41 及其亲本中 23、转凝集素基因抗虫棉 8008 及其亲本苏 006、转凝集素基因抗虫棉 8009 及其亲本苏 011、转基因抗虫杂交棉晋棉 34 和常规棉太 8。10 个棉花材料均在室内同期播种于花盆中,栽培、管理措施一致,苗期用于试验。

1.2 棉花凝集素的提取

取棉花苗期(子叶期、1~3 片真叶期、4~6 片真叶期)叶片,称取 4 g,液氮研磨,加入 2 mL pH 值 7.4 的 PBS 提取溶剂,以 4 °C、5 000 r/min 离心 20 min,取上清液即为棉花凝集素粗提液。

1.3 血凝反应

在 96 孔“V”型血凝板中,分别加入 30 μ L pH 值 7.4 的 PBS 磷酸缓冲液,再加入 30 μ L 棉花凝集素提取液,将其按 $2^{-1} \sim 2^{-12}$ 的比例进行倍比稀释,

然后各孔加入 30 μ L 0.5% 的鸡红细胞。30 min 后观察凝集反应。

1.4 胰蛋白酶处理鸡红细胞

取胰蛋白酶(3 U/mg, Sigma 公司产品),以 0.01 mol/L 的 PBS 磷酸缓冲液配制成 3、1.5、0.75、0.375、0.188 U/mL 的酶液。用胰蛋白酶液处理鸡红细胞,在 37 °C 培养箱中温育 15 min,之后以 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,用于检测棉花叶片中的凝集活性。

1.5 不同温度和时间处理对棉花凝集素的影响

将提取的棉花凝集素样品分别在 4、25、45、65 °C 下处理 15、60、120 min 后,于 4 °C、8 000 r/min 下离心 5 min,取上清在“V”型血凝板上进行血凝反应,测血凝活性。

1.6 比色法测定血凝活性

取 2 mL 棉花凝集素提取液,加入 2 mL 0.5% 的鸡红细胞悬浮液,静置 30 min 后,取上清,用 Spectrum 756 型紫外可见分光光度计,于 620 nm 波长下测定吸光度值。重复 3 次,取平均值作为最终测定结果。

2 结果与分析

2.1 棉花生长期叶片中凝集素的变化

结果表明,从供试的 10 个棉花材料的叶片中均检测出凝集素活性(表 1)。随棉花生长时期的变化(如子叶期、1~3 片真叶期和 4~6 片真叶期),不同品种叶片的凝集素含量有升有降,在子叶期,以常规棉太 8 的血凝活性最高,血凝滴度达 2^6 ;到了 4~6 片真叶期时,其血凝滴度降至 2^3 。1~3 片真叶期和 4~6 片真叶期,则分别以抗虫杂交棉晋棉 34 和中 23 的凝集素含量最低,血凝滴度均为 2^2 ,低于它们在子叶期时的凝集素水平。

表 1 棉花生长不同时期叶片中凝集素水平

棉花品种	血凝滴度		
	子叶期	1~3 片真叶期	4~6 片真叶期
中棉 12	2^4	2^4	2^4
H2	2^5	2^5	2^3
中 23	2^5	2^5	2^2
中 41	2^4	2^5	2^3
苏 006	2^5	2^4	2^4
8008	2^5	2^3	2^3
苏 011	2^4	2^3	2^6
8009	2^5	2^5	2^6
晋棉 34	2^5	2^2	2^3
太 8	2^6	2^5	2^3

从表 1 还可以看出,不同类型杀虫基因的导入对棉花叶片中凝集素水平产生影响。如外源 *Bt* 基因导入后,在子叶期,转基因棉 H2 与其受体亲本中棉 12 相比,血凝活性提高了 1 倍。与之相反,转 *Bt* 和 *CpTI* 基因棉中 41 的血凝活性却只有亲本中 23 的 1/2。同样,外源凝集素基因的导入也使相应转基因棉的凝集活性发生了变化,如 8009 的凝集活性在子叶期和 1~3 片真叶期均比受体亲本苏 011 明显提高。这说明外源基因的导入对棉花凝集素的生物合成产生影响,或因基因表达产物的生成使凝集活性升高或降低。

2.2 胰蛋白酶修饰后棉花叶片中凝集活性的变化

胰蛋白酶是一种蛋白水解酶,采用不同剂量胰蛋白酶处理后的鸡血红细胞,均使棉花凝集素的血凝滴度升高(表 2)。3 U/mL 和 1.5 U/mL 的胰蛋白酶处理可使其凝集活性达到最大,是未经胰蛋白酶处理的凝集活性的 64 倍,当胰蛋白酶剂量低至 0.188 U/mL 时,凝集活性最低,相比 CK 仅提高了 3 倍。

表 2 胰蛋白酶处理对棉花叶片中凝集活性的影响

胰蛋白酶/(U/mL)	血凝滴度
未处理(CK)	2 ⁵
3	2 ¹¹
1.5	2 ¹¹
0.75	2 ⁹
0.375	2 ⁹
0.188	2 ⁷

采用经胰蛋白酶修饰后的鸡血红细胞检测棉花凝集素,增加了血红细胞的敏感性,明显提高了凝集素活性检测的灵敏度。这表明鸡血红细胞的细胞膜上具有与棉花凝集素分子中糖结合部位构象相吻合的糖基,但该糖基可能位于膜的脂质双分子层中,被细胞膜的外周蛋白或与之连接的糖蛋白所遮挡,抑制或降低了该糖基与凝集素的结合,经由胰蛋白酶对这些蛋白或糖蛋白的温和水解,可使此种遮挡得以解除,从而使凝集活性增强。

2.3 温度和处理时间对棉花叶片中凝集素的影响

在不同温度和时间处理后,检测棉花叶片中凝集素提取液的血凝活性,结果见表 3。4℃低温和室温 25℃处理最长时间(120 min)不影响血凝活性。而在 45℃下,随处理时间的延长血凝活性降低,处理 120 min 血凝滴度由 2⁵ 降至 2⁴。65℃仅处理 15 min,与 25℃时相比,血凝活性就下降了 1/2。

表 3 不同温度和时间处理后棉花叶片中的血凝滴度

温度/℃	处理时间/min		
	15	60	120
4	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵
25	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵
45	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁴
65	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴

以上结果表明,棉花凝集素具有一定的热稳定性,但处理时间不宜过长,常温提取不影响其活性。

2.4 比色法测定棉花凝集素结果

与血凝反应的检测结果相对应,经比色法测定的 3 个棉花材料的叶片凝集素提取液的吸光度值显示,血凝效价高的,因相应的红细胞沉积量最多,因而上清液的吸光度值低,以此建立血凝效价与吸光度的对应关系,两者呈负相关性,即血凝效价高的,如 8009 为 2⁶,其吸光度值就低,仅为 0.072;与之相反,中 23 血凝效价最低,为 2²,其对应的吸光度值却最高,达 1.143(表 4)。

表 4 棉花凝集素血凝滴度与吸光度的相关性

棉花品种	血凝滴度	吸光度
中 23	2 ²	1.143
H2	2 ³	0.623
8009	2 ⁶	0.072

通过比色法测定凝集素活性具有定量、准确、灵敏的特点,特别是对于凝集素水平相近的材料,因血凝反应只能以血凝滴度 2ⁿ 表示,即便血凝效价相同,未必表明它们的凝集素含量完全一致,而采用比色法则能精确反映它们之间的差异。如表 4 所示,H2 和中 23 的血凝活性以血凝滴度表示比值为 2,反之,相应的吸光度比值为 1.83,精度更高。对于有外源凝集素基因导入的材料 8009 而言,它的血凝效价为 2⁶,相应的吸光度值仅为 0.072。

3 结论与讨论

棉花抗枯萎病能力与棉花凝集素水平的高低呈正相关,这是基于抗病品种中凝集素能识别枯萎病菌分生孢子表面的甘露糖和葡萄糖外被,经凝集使其失去或降低侵染能力;而感病品种因为缺乏凝集素或凝集素含量低,枯萎病菌分生孢子可以自由侵染,摄取棉株养分,导致棉花枯萎。经证实,分子量为 13.4 kD 的棉花凝集素能凝集枯萎病菌分生孢子,并抑制分生孢子萌发^[5]。既然棉花凝集素含量与抗病性有关,那么其与抗虫性关系如何,尚未见相关报道。基于此,本研究在前人所做的棉花凝集素

动态规律的基础上,重点对昆虫取食的主要部位——叶片进行了凝集素含量的检测,特别是对外源杀虫基因导入后凝集素的变化进行了监测。结果发现,棉花苗期的不同生长阶段凝集素水平发生变化,有的棉花材料在子叶期含量最高,有的却在 1~3 片真叶期或 4~6 片真叶期最高。而外源杀虫基因的导入,可使凝集活性升高或降低,说明外源基因的导入对棉花自身的生理生化 and 代谢过程产生了一定的影响,导致凝集素的生物合成发生改变。而 these 与植物抗性相关的物质水平的监测也应成为转基因棉花安全性评价的重要组成部分。

采用经胰蛋白酶水解后的鸡血红细胞检测棉花凝集活性,发现其凝集活性明显上升,说明酶促反应使鸡血红细胞表面的糖基如 D-半乳糖、N-乙酰-D-氨基葡萄糖或 D-葡萄糖暴露,提高了与这些能被棉花凝集素识别的糖基的结合能力,增强了棉花的凝集活性^[12]。经胰蛋白酶处理后,棉花凝集素的血凝滴度是未经处理的 64 倍,这使得提取少量的试材即能测定其凝集活性,从而可以方便检测外源凝集素基因是否导入以及表达量的高低。

棉花凝集素具有较高的抗热性。蔡马等^[12]研究棉花凝集素的热稳定性时发现,在 70℃ 和 75℃ 分别处理 15、10 min,血凝活性不变;在 75℃ 和 80℃ 条件下分别处理 15、5 min 时,血凝活性略有下降,在 80℃ 加热 10 min,其血凝活性基本丧失^[12]。本研究结果表明,棉花凝集素在 45℃ 以下处理时间长达 60 min 不影响其活性,但是,随着加热处理时间的延长和温度的升高,凝集活性下降。综合棉花凝集素在不同温度下处理不同时间后的活性变化,为其进一步的分离、纯化条件的建立奠定了基础。

用比色法能准确反映待测凝集素凝集能力的差异,特别是对于“V”型板血凝反应后,较难确定血凝滴度的样品,能定量反映凝集活性的大小,具有准确、定量的特点,尤其适用于转凝集素基因材料中凝集素表达水平的检测。如外源雪花莲凝集素 *gna* 基因导入小麦后,转化植株的叶片蛋白提取液中的凝集素可使鸡血红细胞发生凝集反应,用比色法证实叶片蛋白提取液上清液的吸光度值随凝集沉降程度增强而下降。经检测呈阳性的植株,OD₆₂₀ 值均显著低于对照,表明 *gna* 基因在各转化植株中均有不同程度的表达,其中吸光度值最低的植株具有较高的血凝活性。该检测结果表明,外源雪花莲凝集素 *gna* 基因可能在受体小麦内已完成正常的翻译后修饰,在小麦的叶片中表达,并具有一定的生物学活

性^[13]。由此可见,利用血凝反应的原理,采用比色法可以反映外源凝集素基因在受体植株中的表达水平,从而为研究人员提供检测和监测植株中自身和外源凝集素基因表达后凝集活性的重要手段。

参考文献:

- [1] Peumans W J, van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins[J]. *Plant Physiology*, 1995, 109(2): 347-352.
- [2] Lam S K, Ng T B. Lectins: Production and practical applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(1): 45-55.
- [3] 于小清, 陈段芬. 中国水仙凝集素基因的克隆及性质预测[J]. *华北农学报*, 2009, 24(2): 47-50.
- [4] 李琼芳, 江怀仲, 文巧. 棉花凝集素的形成与抗枯萎病性关系的研究[J]. *植物病理学报*, 1992, 22(3): 283-288.
- [5] 刘士庄, 施承禄, 张昊洁, 等. 棉花凝集素的分离纯化及其对棉花枯萎病菌的影响[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(4): 311-315.
- [6] Powell K S, Gatehouse A M R, Hilder V A, et al. Different antimetabolic effect of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1995, 75: 61-65.
- [7] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu I C, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(7): 1399-1405.
- [8] Yao J H, Zhao X Y, Qi H X, et al. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12(6): 715-722.
- [9] Kanrar S, Venkateswari J, Kirti P, et al. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20(10): 976-981.
- [10] 肖松华, 刘剑光, 吴巧娟, 等. 转外源凝集素基因棉花对棉蚜的抗性鉴定[J]. *棉花学报*, 2005, 17(2): 72-78.
- [11] 张林水, 朱祯, 吴霞, 等. 转三价抗虫基因彩色棉花的获得[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(6): 1126-1131.
- [12] 蔡马, 刘士庄, 陈毓荃. 棉花凝集素的抽提和专一性结合糖的测定[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 1996, 9(2): 55-59.
- [13] 高泽发, 陈绪清, 杨凤萍, 等. 人工合成 *gna* 基因在小麦中的表达及其抗蚜虫效果研究[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 559-564.