

# 转基因抗虫玉米 MON810 转化事件的研究及应用

杨 双

(辽宁省沈阳市农业科学院, 沈阳 110034)

**摘要:**目前全球被批准商业化的玉米转化事件达 148 个, 转基因抗虫玉米中 MON810 转化事件的商业化程度最高, 全球有 26 个国家和地区批准其用于种植或饲料食品加工。我国从 2002 年开始允许进口 MON810 品系转基因玉米用于饲料食品的加工原料。鉴于 MON810 在中国的专利将在 2020 年过期, 为了进一步应用该转化事件, 本文综述了有关 MON810 转化事件的分子生物学特征、检测方法、杀虫效果、安全评价、国内外应用现状, 供相关从业者参考。

**关键词:**抗虫玉米; 转化事件; MON810

转基因育种技术包括基因分离、基因克隆、载体构建、遗传转化、转化事件筛选、品种选育等环节, 其核心技术是遗传转化, 即将外源基因转入受体基因组中。目前转基因玉米常用的遗传转化方法是基因枪法和农杆菌介导法。转化时外源基因随机插入到受体材料的基因组中, 不同的插入位点产生不同的转化事件, 因此每次转化反应一般产生几十个至上千个转化事件。在品种选育前需要从中筛选出外源基因表达水平和表达模式符合商业化用途的转化事件。同一个转化事件可以通过常规杂交手段导入其他玉米材料中, 进而选育出不同品种, 成为某个转化事件的品系。转化事件不易被修饰改造而被重新申请专利, 所以转化事件具备很难绕过或者规避的技术优势, 因此转化事件是转基因育种知识产权保护的重点, 也是转基因产品检测中鉴定转基因品系的关键<sup>[1]</sup>。目前全球被批准商业化的玉米转化事

件达 148 个, 转基因抗虫玉米中 MON810 转化事件的商业化程度最高, 全球有 26 个国家和地区批准其用于种植或饲料食品加工。鉴于 MON810 在中国的专利将在 2020 年过期, 为了进一步应用该转化事件, 本文综述了有关 MON810 转化事件的分子生物学特征、检测方法、杀虫效果、安全评价、国内外应用现状, 供相关从业者参考。

## 1 MON810 的分子生物学特征及检测技术

MON810 是美国孟山都公司于 1993 年研发成功, 1996 年美国批准其进行商业化种植。其外源基因来源于苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 HD-1 菌种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-1) 的 *CryA b* 基因, 经基因修饰后接入质粒载体 PV-ZMBK07 中, 通过基因枪法实现遗传转化。

**1.1 MON810 的分子生物学特征** MON810 转化事件的插入序列包含 CaMV 35S 启动子 (299bp), 经

江农业科学, 2013 (8): 961-963

[22] 魏良柱, 邢丙聪, 孙瑞泽, 等. 商洛地区丹参种子质量现状分析及评价方法建立 [J]. 种子, 2016, 35 (3): 89-92

[23] 淡红梅, 李先恩. 甘草、丹参、牛膝种子检验规程与质量分级标准的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006

[24] 仇劲, 马利红, 刘政波, 等. 丹参根段繁殖的发芽率试验研究 [J]. 山东农业科学, 2016, 48 (3): 73-75

[25] 李青苗, 张美, 周先建, 等. 种根粗度对丹参出苗及药材产量和质量的影响研究 [J]. 中药与临床, 2011, 2 (4): 8-10

[26] 仇劲, 马利红, 李国清, 等. 不同根段繁殖处理对丹参产量和品质的影响 [J]. 中药材, 2016, 39 (7): 1469-1471

[27] 田伟, 周巧梅, 温春秀, 等. 丹参根段不同处理的对比试验研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20 (3): 18-20

[28] 牛敏, 刘红燕, 刘谦, 等. 4 个栽培年限丹参颜色与 9 种活性成分含量的相关性 [J]. 中成药, 2017, 39 (1): 131-135

[29] 王海, 严铸云, 沈昱翔, 等. 丹参药材的颜色特征与有效成分的相关性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25 (3): 333-338

[30] 姜卫卫, 张永清. 山东地区丹参规范化种植关键技术研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2005

[31] 桑波, 胡晶红, 刘谦, 等. 基于芽头颜色差异的丹参优良品系筛选研究 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34 (2): 131-134

[32] 吕海花, 刘伟, 杨帆, 等. 不同发芽阶段对丹参种苗生物量及活性成分含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28 (6): 1454-1456

[33] 张芳芳, 张永清, 顾正位, 等. 山东地区丹参种苗质量分级标准研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36 (3): 236-239

(修回日期: 2018-03-27)

修饰的抗虫基因 *CryA b* 部分编码区域(2448bp)、玉米热激蛋白基因 *hsp70* 的内含子(804bp)(图1)。在转化前的质粒中 CaMV 35S 启动子的长度是 615bp,外源抗虫基因长度是 3460bp,这是由于基因枪法转化时外源序列会随机产生断裂。MON810 事件中 CaMV 35S 启动子丢失了 5' 端序列,但未影响其功能,能在玉米全植株和全生育期启动外源抗虫基因的表。同样,*CryA b* 基因丢失了 3' 端序列,3' 端起到稳定蛋白结构作用,缺失后并没有影响其杀虫功能。MON810 的 5' 和 3' 端侧翼序列长度分别为 803bp 和 588bp 的玉米基因组序列。侧翼序列及插入序列全长为 5.5kb,位于基因组两个 *Nd I* 酶切位点之间。

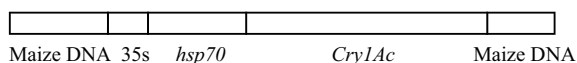


图1 MON810 转化事件示意图

**1.2 检测技术** 转基因检测技术包括筛查检测和品系检测,筛查检测目的是确定是否含有外源插入序列,品系检测是确定转化事件。不同转化事件的插入序列不同,而且插入序列在基因组中还可能存在位置效应,即影响相邻基因或染色体结构,或者相邻基因和染色体结构影响外源基因表达。因此不同的转化事件可能存在潜在未知风险,所以每个转化事件都需要安全评价。转化事件的检测是转基因生物安全管理及进出口贸易必要程序,只有通过安全评价的转基因事件才可以商业化。

目前转化事件的检测主要是根据插入序列与玉米基因组之间的连接区域设计引物,应用 PCR 技术扩增特异条带,进而确认特异的转化事件。我国目前常用的 MON810 转化事件检测标准是农业部 869 号公告 -9-2007 和国家出入境检验检疫行业标准 SN/T 1196-2012。除了上述标准外,武海斌等<sup>[2]</sup>根据 MON810 的 3' 端与基因组相连接序列设计引物,该引物可以实现与 Bt11、TC1507 及玉米内参基因 *zSS II b* 的特异引物进行复合 PCR 检测。易小平等<sup>[3]</sup>报道了新的 MON810 定性 PCR 检测方法,该方法的扩增产物长 325bp,非特异扩增少,不易产生假阳性检测结果,并经过国内 7 家实验室验证了该方法的重复性和灵敏度。陈颖等<sup>[4]</sup>建立了实时荧光定量 PCR 检测技术,能够检测 0.01% 含量的转化事

件。近年来,环介导的等温扩增技术(LAMP)应用于 MON810 的检测,现行检测标准是 SN/T 3767.8-2014。

## 2 MON810 的杀虫效果及安全评价

MON810 表达的杀虫蛋白是苏云金芽孢杆菌(*Bt, Bacillus thuringiensis*)的杀虫晶体蛋白 Cry1Ab,是所有抗虫蛋白中应用最广泛的一种,对欧洲玉米螟、西南玉米螟和亚洲玉米螟等鳞翅目害虫都具有良好抗性<sup>[5]</sup>。该蛋白的杀虫机制是:被昆虫摄入后,在碱性肠道中被活化,专一性与中肠上皮细胞受体结合,形成离子通道或孔洞,引起渗透压失衡,导致昆虫死亡。MON810 事件应用的启动子是 CAMV 35S 启动子,该启动子属于强启动子,没有组织特异性,能强制启动外源基因在玉米各组织中表达,使整个植株都表达杀虫蛋白,一方面全方位防治玉米螟,另一方面其安全性也倍受关注。

**2.1 杀虫效果** MON810 在 1996 年获得美国食品药品监督管理局(FDA)、美国农业部(USDA)和美国环保署(EPA)批准在美国商业化。自商业化至今的 20 多年间,在防治玉米螟方面效果好,受到种植者欢迎。MON810 对心叶期发生的一代欧洲玉米螟和对穗期发生的二代玉米螟防效都高达 96%<sup>[5]</sup>。试验结果显示 MON810 对亚洲玉米螟有明显抗性<sup>[6]</sup>。此外,MON810 对玉米茎夜蛾、玉米禾螟也具有一定的控制效果<sup>[7]</sup>。MON810 的玉米子粒对储粮害虫也有一定的控制作用,研究显示可使印度谷螟和麦蛾的生殖能力下降<sup>[8]</sup>。MON810 在生育期表达量不同,在抽丝期前呈上升趋势,于抽丝期达到最高,之后下降;在各器官中的表达量也不同,叶片的表达量最高,依次为茎、根,在种子和花丝中的表达量很少<sup>[9]</sup>。

**2.2 安全评价** 在食用安全方面,中国疾病预防控制中心将 MON810 玉米以 50% 的比例掺入饲料中,饲喂大鼠 90d,未见异常。MON810 从 1996 年商业化以来,在食用安全方面未发现与常规玉米有差异。

在生态安全方面,玉米外源抗虫基因能够通过基因漂移方式转入到同源的大刍草中,但是中国境内没有野生的大刍草,这方面的影响几乎没有。J. E. Losey 等<sup>[10]</sup>在 Nature 发文称 Bt 玉米花粉能导致帝王斑蝶幼虫死亡,引起广泛关注。D. E. Stanley-Horn 等<sup>[11]</sup>研究显示 MON810 的花粉对帝王斑蝶幼虫存活没有影响。研究显示,MON810 对玉米螟的天敌、非靶标害虫和有

益昆虫都没有显著影响<sup>[5]</sup>。但是抗虫玉米的种植存在对玉米螟抗性风险,这需要在种植过程中采取相应的庇护区等策略避免和延缓玉米螟进化<sup>[12]</sup>。

此外,转基因玉米的外源基因表达产物能够通过根系、秸秆还田及花粉进入土壤生态系统,毒蛋白对土壤生态的影响也是生态安全评价的重要方面。邢珍娟等<sup>[13]</sup>研究了 MON810 转基因玉米在土壤中降解动态,显示最长的 DT<sub>90</sub> (初始毒蛋白含量的 90% 降解所需要的时间)为 368.3d。C.Mulder 等<sup>[14]</sup>的研究显示,Cry1Ab 蛋白对土壤微生物群落组成有影响,但与非转基因参照玉米相比,对土壤中的营养成分没有影响。

### 3 MON810 的应用

玉米螟是玉米生产上的主要害虫,对玉米产量和品质影响很大,主要有欧洲玉米螟和亚洲玉米螟。欧洲玉米螟分布在欧洲、北非、西亚,据统计,美国因欧洲玉米螟造成产量损失及投入费用达 10 亿~25 亿美元。亚洲玉米螟分布在东亚、东南亚及太平洋诸岛,中国每年因亚洲玉米螟为害,导致玉米减产 10% 左右,大发生年份产量损失可达 30% 以上,甚至绝收<sup>[5]</sup>。转 Bt 抗虫基因的应用为防治玉米螟提供了一条新途径。MON810 与 BT176、BT11 都是表达 Cry1Ab 杀虫基因的第 1 代转基因作物,都是在 1996 年开始商业化种植。随着进一步的研究应用,研究人员发现 BT176 的花粉对帝王斑蝶和香芹黑凤蝶幼虫生长缓慢,而且 BT176 控制二代欧洲玉米螟和西南玉米螟效果差,在 2001 年取消了注册登记,在 2003 年之后没有应用。实践证明,MON810 抗虫效果和安全性方面表现突出。

到 2017 年批准种植 MON810 的国家和地区有 14 个,批准进口作为食物的有 21 个,批准进口作为饲料的有 18 个。我国目前没有批准任何转基因玉米商业化种植,只批准进口部分通过安全评价的转化事件作为食品和饲料的加工原料,其中 MON810 品系转基因玉米从 2002 年开始允许进口。我国在转基因抗虫棉方面的研究和应用位居世界前列,为了进一步推进转基因育种发展,我国 2008 年开始启动实施了“转基因生物新品种培育科技重大专项”,在抗虫方面也获得了具有自主知识产权的新基因。自主研发转基因作物的费用约 1.35 亿美元<sup>[15]</sup>,因此利用过期专利可以节省费用,加快应用速度。

孟山都公司在 2000 年将 MON810 转化事件申请中国专利。专利管理是为了保护知识产权,但是为了人类能够共享科技进步成果,一般设置 20 年保护期限。MON810 转化事件经过了 20 多年的实践验证,在其专利保护期以后,可以继续挖掘其价值且无需担忧知识产权陷阱。

### 参考文献

- [1] 刘丽军,宋敏,苏颖昇. 主要农作物转化事件的专利保护及对我国的启示 [J]. 中国生物工程杂志,2010,30 (11): 112-117
- [2] 武海斌,路兴波,孙红炜,等. 转基因玉米转化体特异性 PCR 检测技术研究 [J]. 玉米科学,2009,17 (1): 65-70
- [3] 易小平,贺萍萍,夏启玉,等. 定性 PCR 方法检测转基因玉米 MON810 转化事件的研究 [J]. 热带作物学报,2014,35 (12): 2384-2390
- [4] 陈颖,徐宝梁,苏宁,等. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因玉米检测中的应用研究 [J]. 作物学报,2004,30 (6): 602-607
- [5] 王冬妍,王振营,何康来,等. 转 Bt 基因抗虫玉米在害虫综合治理中的作用及生态风险 [J]. 植物保护学报,2003,30 (1): 97-106
- [6] 何康来,王振营,文丽萍. Bt 玉米在玉米害虫持续控制中的作用、风险问题及对策 [C]// 中国植物保护学会. 面向 21 世纪的植物保护发展战略. 北京:中国科学技术出版社,2001: 344-349
- [7] van Rensburg J B J. Evaluation of Bt-transgenic maize for resistance to the stem borers *Busseola fusca* (Fuller) and *Chilo partellus* (Swinhoe) in south Africa [J]. S Afr J Plant Soil, 1999, 16: 38-43
- [8] Sedlacek J D, Komaravalli S R, Hanley A M, et al. Life history attributes of India meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) and Angoumois grain moth (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic corn kernels [J]. J Econ Entomol, 2001, 94 (2): 586-592
- [9] 吕霞,王慧,曾兴,等. 转基因抗虫玉米研究及应用 [J]. 作物杂志, 2013 (2): 7-12
- [10] Losey J E, Rayor L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae [J]. Nature, 1999, 399: 214-215
- [11] Stanley-Horn D E, Dively G P, Hellmich R L, et al. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 11931-11936
- [12] 刘一杰,薛永常. 植物抗虫基因工程的研究进展 [J]. 浙江农业科学, 2016, 57 (6): 873-878
- [13] 邢珍娟,白树雄,何康来,等. 不同条件下转 cry1Ab 基因玉米植株残体中杀虫蛋白降解动态 [J]. 植物保护学报, 2015, 42 (6): 1025-1029
- [14] Mulder C, Wouterse M, Raubuch M, et al. Can transgenic maize affect soil microbial communities? [J]. PLoS Comput Biol, 2006, 2 (9): 1165-1172
- [15] Clive James. 2015 年全球生物技术 / 转基因作物商业化发展态势 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36 (4): 1-11

(收稿日期: 2018-03-11)