

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)01-039-03

# sAGP 基因增强表达对马铃薯淀粉和还原糖的影响及安全性评价

宋波涛, 田振东, 杨文杰

(华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 本文主要介绍了转 sAGP 马铃薯株系中淀粉和还原糖含量的变化, 以及 sAGP 基因超量表达对淀粉理化性质的影响, 同时介绍了马铃薯转基因安全性评价的相关研究及转 sAGP 基因马铃薯安全性评价中间试验的进展

**关键词:** 马铃薯; 转基因; sAGP; 安全性; 评价

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP- glucose pyrophosphorylase, AGPase) 是植物淀粉生物合成过程中的限速酶<sup>[1]</sup>, 催化 G-1-P 与 ATP 作用, 形成 ADPG 和 焦磷酸(G-1-P+ATP → ADPG + PPi), ADPG 则是淀粉合成的葡萄糖基供体。前人研究表明, AGPase 对淀粉合成的一般控制系数在 0.3~0.6, 而且马铃薯淀粉合成的曲线与 AGPase 的积累曲线基本一致<sup>[2]</sup>, 抑制 AGPase 的活性将导致淀粉合成的部分或全部终止<sup>[3-4]</sup>, 这些结果为调控淀粉代谢提供了依据。马铃薯 AGPase 为异源四聚体, 由 2 个小亚基和 2 个大亚基组成, AGPase 大亚基只起调节作用, 而活性则由小亚基控制<sup>[5-6]</sup>。为了通过增强 sAGP 基因的表达的方法, 提高马铃薯块茎中 AGPase 的活性、淀粉含量和降低还原糖含量, 达到改良马铃薯加工品质的目的, 本研究克隆马铃薯 AGPase 小亚基基因 (sAGP), 构建植物正义表达载体, 通过转化马铃薯, 研究 sAGP 的表达与马铃薯块茎淀粉和还原糖含量间的关系, 并揭示 sAGP 在马铃薯块茎抗“低温糖化”方面的功能, 同时研究了 sAGP 增强表达对马铃薯淀粉结构的影响, 并在此基础上按《农业转基因生物安全管理条例》和《农业转基因生物安全评价管理办法》的要

求对转 sAGP 基因马铃薯作了安全性评价。

## 1 sAGP 基因的增强表达对马铃薯淀粉—糖代谢影响

用 RT-PCR 结合 RACE 的方法, 从低温处理的抗“低温糖化”马铃薯品系 JH 块茎 cDNA 中, 克隆得到全长 sAGP (Genbank accession no. AY186620)<sup>[7]</sup>, 并构建植物表达载体, 通过农杆菌介导法将 sAGP 导入鄂马铃薯 3 号 (E3), 一共得到转化 54 个转化植株, 2003 年和 2004 年对其中的 39 个株系结果分析表明, 与对照相比, 所有转基因株系的 AGPase 酶活性平均酶活性平均上升约 10%, 淀粉含量增加 13%, 还原糖含量下降 35% 以上<sup>[8]</sup>。根据测定分析结果和植株的综合性状, 初步筛选出 CA-11、CA-12、CA-21 等 3 个转 sAGP 基因的株系用于马铃薯加工品质改良的进一步研究, 其共同特点是低温贮藏条件下 AGPase 酶活性有不同程度上升, 还原糖积累速度慢, 经 60 d 4 贮藏后还能基本满足加工要求 (还原糖含量小于 0.4 g·100 g<sup>-1</sup> FW), 植株保持了受体品种的其他特征, 具体结果将另文发表。

## 2 sAGP 基因增强表达对马铃薯淀粉结构的影响

通过反义抑制减少 AGPase 数量和活性, 减少

收稿日期: 2005-09-12

作者简介: 宋波涛 (1975-), 男, 讲师, 主要从事马铃薯加工品质改良工作。

合成淀粉的前体物质 ADPG, 发现尽管淀粉晶体形态未变, 但直链淀粉含量大大减少, 支链淀粉含量大量增加, 但淀粉链的长度变短, 淀粉粒变小。为了明确增强 sAGP 的表达对淀粉结构的影响, 我们将以上候选株系和对照块茎提供给华中农业大学食品科技学院进行淀粉理化性质分析。在 90% DMSO 水溶液中的特性粘度测定表明, 在超量表达 sAGP 基因的株系中马铃薯淀粉分子量增加近 10%, 同时通过测定对不同溶剂中淀粉粘度分析表明, 转基因马铃薯淀粉分子间的氢键相互作用变少, 分子间的相互作用变小, 使得淀粉的螺旋结构减少。X 射线衍射分析转基因淀粉中可能较多较弱的晶区 (可能主要以支链结晶为主), 淀粉分子结晶度较小, 可能是由于淀粉分子中有更多的无规链穿插于螺圈中间, 形成了多晶区, 而淀粉的热分析显示转基因马铃薯淀粉更稳定一些。所有相关分析均证实, 转基因马铃薯淀粉结构与其对照存在明显的不同, 显示出非针对淀粉结构的基因操作对淀粉结构带来的影响不可忽略。因此, 在评价马铃薯等作物品质改良的效果时, 淀粉结构的变化以及由于淀粉结构变化带来的影响应该同时纳入考虑范围之内。

### 3 转 sAGP 基因马铃薯的安全性评价

基因产品的安全性的问题一直是人们关注的重要问题, 特别是美国的斑蝶事件<sup>[9]</sup>和英国转雪花莲外源凝集素 (GNA) 基因马铃薯损害大鼠的内脏器官的报道<sup>[10-11]</sup>出现后, 人们对转基因基因产品的安全性更加疑虑。生物安全仅指现代生物技术的研究、开发、应用以及转基因生物的转移可能会对生物产生潜在的不利影响, 特别是各类转基因活生物体释放到环境中可能对生物构成潜在风险与威胁。FAO 和 WHO 分别于 1990 和 1996 年召开了生物技术与食品安全咨询会, 深入研究转基因生物及其产品的安全性评估方法和要求, 提出了“物质实质相当 (或大体等同)”的原则。该原则主要从转基因作物对非目标生物的影响、增加目标害虫的抗性、杂草化、引起新病原菌产生、对生物多样性和生态环境的影响、对人体健康的威胁和影响等方面作了阐述<sup>[12]</sup>。

关于转基因马铃薯的安全性方面的研究很早就开始了, 主要从目标基因和标记基因的安全性和基因逃逸两方面。目标基因和标记在马铃薯体内的表

达产物对人体是否产生毒害是人们首先关心的问题, Dommelen 等<sup>[10]</sup>用转雪花莲外源凝集素 (GNA) 基因马铃薯喂食大鼠发现, 大鼠的免疫系统能造成伤害, 而且大鼠的肠道肝脏和其他的一些脏器也出现了一定的影响。虽然这些实验设计和实验结果马上遭到多方质疑批评<sup>[13-15]</sup>, 但它说明对转基因生物作安全评价的必要性。

基因逃逸包括外缘基因通过花粉扩散和外缘基因表达产物通过食物链传递等方式。Dale 等<sup>[16]</sup>研究发现, 当转基因马铃薯与非转基因马铃薯直接接触时, 传粉率为 24%, 在隔离 3 m、10 m、20 m 时, 传粉率分别为 2%、0.017%、0%。虽然有 39 个同属种, 但马铃薯与其近源野生种如野生龙葵 (*Solanum nigrum*)、欧白英 (*Solanum dulcamara*) 等即使花期相遇也不能杂交<sup>[17-18]</sup>。由于马铃薯的花粉传播距离短, 又与其近缘种不能杂交, 因此, 马铃薯生殖隔离方面比较容易控制, 在欧洲只要求 5 m 的隔离区和 15 m 的测控区, 且花和浆果也不要求摘除<sup>[19]</sup>。关于食物链的传递 Birch<sup>[20]</sup>通过对转 Bt 基因马铃薯、蚜虫、瓢虫的食物链分析发现, 以转基因马铃薯为食物雌蚜虫所产生的卵比对照少 1/3, 且其受精卵在未孵化前死亡率比对照高 3 倍, 已转基因马铃薯蚜虫为食物的雌瓢虫比对照少一半。尽管 Birch 的实验是在试验室完成, 有许多人为因素的影响, 其结果并不能代表田间的实际结果, 但在转基因安全性评价时也值得考虑。

为了评价转 sAGP 基因马铃薯的安全性, 2003 年 6 月向农业部转基因生物安全管理办公室申请对转 sAGP 基因马铃薯在湖北省的中间实验, 并于 2003 年 9 月得到批准。根据前人的研究结果, 为了防止基因的扩散, 安全性评价中间试验按要求在隔离良好的网室内进行。依照《农业转基因生物安全管理条例》和《农业转基因生物安全评价管理办法》规定的内容对转 sAGP 基因马铃薯进行了遗传稳定性、环境适应能力和生存竞争能力、外援基因在马铃薯各个组织器官的表达水平及其功能现状等指标的检测, 结果表明转 sAGP 基因马铃薯环境适应能力和生存竞争能力与受体马铃薯无差异, 两年来遗传稳定性, 且外援基因按预计要求表达。同时为了评价转基因马铃薯的食品安全性, 还委托湖北省疾病预防控制中心对转 sAGP 基因马铃薯进行了急性和亚急性毒性试验, 急性毒性试验表明转

sAGP 基因马铃薯与对照无差异, 亚急性毒性试验正在进行中。

[ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Sweetlove L J, Müller-Rieber B T, Willmitzer L, et al. The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers [J]. *Planta*, 1999, 209: 330-337.
- [ 2 ] Sweetlove L J, Burrell M M, Rees T. Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADP-Glucose pyrophosphorylase [J]. *Biolchem J*, 1996, 320: 493-498.
- [ 3 ] Müller-Rieber B T, Sonnewald U, Willmitzer L. Inhibition of AGPase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber-storage protein genes [J]. *EMBO J*, 1992, 11:1229-1238.
- [ 4 ] Müller-Rieber B T, Kobmann J, Hannah C, et al. One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose [J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 224: 136-146.
- [ 5 ] Iglesias A A, Barry G F, Meyer C, et al. Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *E. coli* [J]. *J Biolchem*, 1993, 268: 1081-1086.
- [ 6 ] Ballicora M A, Laughlin M J, Fu Y B, et al. Adenosine 5'-diphosphate glucose pyrophosphorylase from potato tuber [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 245-253.
- [ 7 ] 宋波涛, 柳俊, 谢从华, 等. 马铃薯腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶小亚基基因 sAGP 的克隆及其在毕赤酵母中的表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(3): 281-287.
- [ 8 ] 宋波涛, 柳俊, 谢从华. 马铃薯 sAGP 基因表达对块茎淀粉和还原糖含量的影响 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(7): 1439-1446.
- [ 9 ] Losey J E, Rayer L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae [J]. *Nature*, 1999, 399: 214-216.
- [ 10 ] Dommelen A Van. Scientific requirements for the assessment of food safety [J]. *Biotechnology and Development Monitor*, 1999, 38: 2-7.
- [ 11 ] Ewen S W B, Pusztai A. Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing Galanthus nivalis lectin on rat small intestine [J]. *The Lancet*, 1999, 354: 1353-1354.
- [ 12 ] 朱守一. 生物安全与防止污染 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999: 30-53.
- [ 13 ] Fenton B, Stanley K, Fenton S, et al. Differential binding of the insecticidal lectin GNA to human blood cells [J]. *The Lancet*, 1999, 354: 1354-1355.
- [ 14 ] Horton R. Genetically modified foods: "absurd" concern or welcome dialogue [J]. *The Lancet*, 1999, 354: 1314-1315.
- [ 15 ] Kuiper H A, Noteborn H P J M, Peijnenburg A A C M. Adequacy of methods for testing the safety of genetically modified foods [J]. *The Lancet*, 1999, 354: 1315-1316.
- [ 16 ] Dale P J, Mcpartlan H C. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 585-591.
- [ 17 ] Conner A J, Christey M C. Plant-breeding and seed marketing options for the introduction of transgenic insect resistant crops [J]. *Biocontrol Sci Technol*, 1994, 4: 463-473.
- [ 18 ] Conner A J, Jacobs J M E, Genet R A. Transgenic potatoes versus "traditional" potatoes: What's the difference [M]// Mclean G D, Waterhouse P M, Evans G, et al. Commercialisation of transgenic crops: risk, benefit and trade considerations. Canberra, Australia: Cooperative Research Centre for Plant Science and Bureau of Resource Sciences, 1997: 23-36.
- [ 19 ] Tynan J L, Williams M K, Conner A J. Low frequency of pollen dispersal from a field trial of transgenic potatoes [J]. *J Genet and Breed*, 1990, 44:303-306.
- [ 20 ] Birch A N E. Interaction between plants resistance genes, pest aphid populations and beneficial aphid predators [R]. *Scottish Crops Research Institute Annual Report*, 1997: 70-72.

## 欢迎订阅《中国马铃薯》杂志

《中国马铃薯》杂志是由中国作物学会马铃薯专业委员会和东北农业大学主办的国内唯一马铃薯专业科技期刊。它以繁荣我国马铃薯事业为办刊宗旨, 报道我国有关马铃薯的学术研究、科研成果, 介绍本专业的实用技术及最新进展。该刊设有学术园地、研究简报、经验交流、综述、薯类加工、病害防治、知识介绍、新品种介绍等栏目。

本刊国内外公开发行人, 双月刊, 大 16 开本, 彩色封面, 每期定价 6.00 元, 全年 36.00 元, 哈尔滨市邮局发行, 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 14-167。为了减少中间环节, 请读者直接汇款至编辑部。本刊承揽广告业务, 欢迎各界广为利用。

通讯地址: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部

邮 编: 150030 电 话: 0451-55190003 55190739