

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)01-0006-04

转基因马铃薯 PPO、CAT 活性变化及同工酶分析

陈亚兰¹, 王清^{1*}, 张健²

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省定西市旱农科研推广中心, 甘肃 定西 743000)

摘要: 采用生理生化方法对转基因马铃薯纯合四倍体甘单花9号(GD-9-qc)系列的试管苗进行了PPO活性检测、同工酶分析及CAT活性检测和POD同工酶分析。结果表明:反义PPO基因对大多数转基因马铃薯试管苗PPO的活性产生了明显的抑制效果,其中GD-9-qc-10与GD-9-qc-11的PPO活性比对照降低89.06%和83.98%,且相应转基因品系的PPO同工酶也被明显抑制。实验同时发现,转基因马铃薯不同品系中的过氧化氢酶和过氧化物酶的活性也受到不同程度的影响,表现为有的高于对照,有的低于对照;而POD同工酶所示结果与POD活性检测相一致。

关键词: 马铃薯; 多酚氧化酶(PPO)活性; 过氧化氢酶(CAT)活性; 过氧化物酶(POD)同工酶; PPO同工酶

随着人们对马铃薯加工产品需求的迅速增长,马铃薯加工业得到了长足发展。然而,马铃薯在加工过程中的酶促褐变严重影响了马铃薯的加工生产与销售^[1]。通常,人们在加工过程中采用传统的物理与化学方法来降低褐变程度,这些方法主要有:采用不锈钢产品作为加工机械,利用热烫与蒸汽等物理方法来驱除氧的渗入,使用亚硫酸盐与柠檬酸等化学抑制剂来抑制酶活性^[2]。这些方法尽管从一定程度上减轻了褐化,但不能从根本上解决褐化问题。因此,培育低褐化品种显得尤为重要。然而,作为基因分离复杂,又是无性繁殖的四倍体马铃薯来说,进行常规育种所需的年限长,获得的品种还未推广,就开始退化,跟不上市场经济的步伐。因此,快速获得抗损伤褐化的马铃薯品种就显得更为重要。

利用反义RNA技术对现有加工品种进行改良,有目的的修饰转基因植株中多酚氧化酶的表达,可以从根本上解决产品加工过程中的酶促褐化问题,也是选择低酶褐变马铃薯加工品种的首选途径^[3]。但导入反义PPO基因的马铃薯抗损伤褐化的能力

究竟如何,马铃薯生长过程中其它生理活性是否仍然维持原有状况,至今尚未见到相关报道,本实验就此问题进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

已转入反义PPO基因的纯合四倍体马铃薯“GD-9-qc”系列及对照“GD-9”品系。此材料目前由甘肃农业大学生物工程研究所保存,采用双节切段繁殖,并于25℃左右,3000 lx光照下培养。待试管苗生长30 d左右进行相关生理活性检测。

1.2 生理活性测定

1.2.1 PPO活性测定

取样及粗酶液制备:称取“GD-9-qc”系列各品系试管苗0.5 g置于研钵中(用前需在冷冻室中冷冻4 h),加入1 mL(pH=6.00)磷酸缓冲液进行研磨,研好的样品分装于1.5 mL的离心管中,于12000 r·min⁻¹(4℃)的条件下冷冻离心15 min,取上清液即为不同品系试管苗的PPO粗酶液。

比色液的制备与比色:吸取50 μL不同材料PPO粗酶液,200 μL(pH=5.5)磷酸缓冲液加入到10 mL试管后,用蒸馏水定容至4.6 mL。放入25℃水浴锅中,待反应液温度稳定在25℃时,加入400 μL邻苯二酚(0.2%),保温10 min后,并立即加入20 μL 0.2 r·min⁻¹的氢氧化钠终止反应。于721型

收稿日期:2004-10-28

作者简介:陈亚兰(1979-),女,甘肃农业大学硕士研究生,研究方向:基因工程在遗传育种中的应用。

项目基金:甘肃省自然科学基金项目资助 项目编号:3ZS041-A25-047

*通讯作者:Email:wangqing@gsau.edu.cn

分光光度计检测读取 OD₅₂₅ 吸光度, 重复 3 次。PPO 活性的计算以每 min 内 OD₅₂₅ 值变化 0.01 为一个酶活力单位。

1.2.2 CAT 活性测定

取样及粗酶液制备: 称取转基因“GD-9-qc”的 9 个品系试管苗 0.5g 置于冰预冷并加有 1 mL 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH=7.8) 的研钵中进行研磨, 然后将研磨好的匀浆转移到 1.5 mL 离心管内, 于 4℃下, 12000 r·min⁻¹ 冷冻离心机离心 15 min。吸取上清液作为检测 POD 活性的粗酶液。

CAT 活性测定: 取 50 mL 三角瓶, 加入 100 μL 上述粗酶液; 对照瓶中加入煮沸失活的酶液或去离子水 100 μL, 然后在每测定瓶中加入 0.1 mol·L⁻¹ 双氧水 2.5 mL, 并在 30℃恒温水浴中保温 10 min, 随后立即加入 10% 硫酸 2.5 mL, 用 0.1 mol·L⁻¹ 高锰酸钾标准液滴定, 至出现粉红色 (30 s 内不消失) 为终点, 记录滴定所用的高锰酸钾 mL 数。酶活性用每 g 鲜重样品 1 min 内分解双氧水的 mg 数来表示。

1.2.3 同工酶分析

1.2.3.1 PPO 同工酶分析

取样: 剪取 0.5 g 马铃薯试管苗于加有 1 mL Tris-Gly 提取缓冲液 0.1 mol·L⁻¹, pH 8.3, 含 200 g·L⁻¹ 蔗糖) 的冰浴冷研钵中充分研磨, 研磨后的匀浆于 4℃下离心 15 min (15000 r·min⁻¹), 取上清液作为电泳样品液。

PPO 同工酶电泳: 采用聚丙烯酰胺不连续凝胶缓冲系统垂直电泳。分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 3%, 电极缓冲液为 0.005 mol·L⁻¹ 的 Tris-Gly (pH8.3) 溶液。每样品孔点样 20 μL。以 0.05% 溴酚蓝为前沿指示剂。电泳开始 30 min, 溴酚蓝前沿在浓缩胶位置时, 用 100 V 电压。当溴酚蓝进入分离胶时, 改用 150 V 恒压。

染色: ①PPO 显色液 A 液: 取 2 g 对苯二胺加入预热的 18 mL 醋酸中溶解。②PPO 显色液 B 液: 取 1% 的间苯二酚 1.5 mL, 2% 的双氧水 0.3 mL (染色时再加入), 去离子水 60 mL。染色时, 取 7 mL A 液混于 B 液中, 摇匀。电泳结束后取下凝胶板, 放入 PPO 显色液中染色。在室温显色完毕后, 用蒸馏水冲洗并拍照。

1.2.3.2 POD 同工酶分析

取样: 取待测植物材料 0.5 g, 放入预冷的研

钵中; 于研钵中加入预冷的 0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液 1 mL 进行研磨, 匀浆移入 1.5 mL 离心管内, 在 4℃下 12000 r·min⁻¹ 冷冻离心机下离心 15 min, 上清液为粗酶液。电泳过程同 PPO 电泳。

POD 同工酶染色: 称取抗坏血酸 70.4 mg 加入到 20 mL 联苯胺溶液 (2 g 联苯胺溶于 18 mL 温热冰醋酸中, 再加蒸馏水 72 mL), 再将 20 mL 0.6% H₂O₂ 与 60 mL 去离子水分别加入染色液中。电泳结束后, 置于大培养皿中, 倒入染色液染色数分钟, 显色完毕, 倒掉染色液, 用蒸馏水洗数次, 为使色带清晰, 可用脱色液脱去凝胶的底色, 脱色液可用 7% 醋酸, 脱色时应随时观察脱色进程, 以防脱色过度而影响颜色深度。

2 结果与分析

2.1 转基因马铃薯品系 PPO 活性的变化

将转基因品系“GD-9-qc”系列以及对照“甘单花 9 号”双节茎段在试管中无菌培养 30 d 后, 检测叶片与茎段混合物的 PPO 活性。测验结果表明: 大部分试管苗 PPO 活性低于对照品系, 其中 GD-9-qc-10、GD-9-qc-11 的 PPO 活性仅为 2.8 和 4.1 (0.01 ΔOD·min⁻¹), 比对照 PPO 活性降低了 89.06% 和 83.98%。而少数转基因品系如 GD-9-qc-12 和 GD-9-qc-38 的 PPO 活性高于对照 (见表 1)。

2.2 转基因马铃薯试管苗 CAT 活性的变化

反义 PPO 基因的导入也使不同转基因品系的 CAT 活性发生了变化。在供试的 9 个品系中, 7 个品系的 CAT 活性低于对照, 其中 GD-9-qc-6, GD-9-qc-23, GD-9-qc-45, GD-9-qc-28 的 CAT 活性分别比对照降低 43.60%, 68.15%, 83.03%, 84.05%。而 GD-9-qc-26, GD-9-qc-18 的 CAT 活性分别比对照升高 40.01%, 19.19% (表 2)。

2.3 PPO 同工酶分析

检测转基因品系试管苗 PPO 活性的同时, 我们也对其 PPO 同工酶进行了分析。结果表明, 无论是对照还是转基因马铃薯试管苗的 PPO 同工酶均显现出 6 条谱带。其中第二条带色浓且宽为 PPO 主带, 而其他几条带的颜色及宽度随品系的不同而不同。其中 GD-9-qc-10, GD-9-qc-11, GD-9-qc-27, GD-9-qc-49 的谱带颜色明显淡于对照, 而这 4 个品系的 PPO 活性均明显低于对照, 说明与这些谱带相对应的基因表达有可能受到反义 PPO

表 1 GD-9-*qc* 转基因植株 PPO 活性的变化 (0.01 ΔOD·min⁻¹)

转基因品系	PPO 活性	与对照差异的百分比 (%)	转基因品系	PPO 活性	与对照差异的百分比 (%)
CK	25.6	0	CK	25.60	0
GD-9- <i>qc</i> -1	8.50	-27.70	GD-9- <i>qc</i> -27	7.80	-69.53
GD-9- <i>qc</i> -2	10.20	-60.10	GD-9- <i>qc</i> -28	10.20	-60.10
GD-9- <i>qc</i> -9	11.20	-56.25	GD-9- <i>qc</i> -33	9.90	-61.32
GD-9- <i>qc</i> -10	2.80	-89.06	GD-9- <i>qc</i> -38	36.40	42.18
GD-9- <i>qc</i> -11	4.10	-83.98	GD-9- <i>qc</i> -44	24.60	-3.90
GD-9- <i>qc</i> -12	29.80	16.40	GD-9- <i>qc</i> -42	21.70	-15.23
GD-9- <i>qc</i> -13	4.60	-82.03	GD-9- <i>qc</i> -49	10.10	-60.50
GD-9- <i>qc</i> -55	11.60	-54.60	GD-9- <i>qc</i> -19	20.90	-18.36

表 2 转基因马铃薯 GD-9-*qc* 品系的 CAT 活性比较 (mL·min⁻¹)

转基因品系	CAT 活性	与对照差异的百分比 (%)	转基因品系	CAT 活性	与对照差异的百分比 (%)
CK	0.0672	0	CK	0.0672	0
GD-9- <i>qc</i> -6	0.0179	-43.60	GD-9- <i>qc</i> -33	0.0606	-12.10
GD-9- <i>qc</i> -14	0.0401	-40.32	GD-9- <i>qc</i> -49	0.0711	5.80
GD-9- <i>qc</i> -18	0.0801	19.19	GD-9- <i>qc</i> -33	0.0606	-12.10
GD-9- <i>qc</i> -23	0.0214	-68.15	GD-9- <i>qc</i> -45	0.0144	-83.03
GD-9- <i>qc</i> -26	0.9408	40.01	GD-9- <i>qc</i> -28	0.0104	-84.50

基因的抑制。而 GD-9-*qc*-12, GD-9-38 的谱带颜色比较深, 这与它们相应的 PPO 同工酶活性较强相一致 (见图 1)。

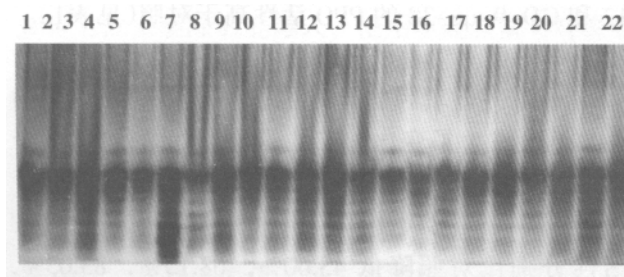


图 1 转基因马铃薯叶、茎 PPO 同工酶谱

注: 其中第 1、13 泳道为对照, 第 22、6 泳道分别为 GD-9-*qc*-12, GD-9-38, 第 7、15、14、16 泳道分别为 GD-9-*qc*-10、GD-9-*qc*-11、GD-9-*qc*-27、GD-9-*qc*-49。

2.4 POD 同工酶分析

对不同品系试管苗的 POD 同工酶分析结果表明: POD 同工酶谱在转基因品系间具有较大的差异。未转基因品系 (对照) 仅表现出 4 条同工酶谱带, 以第二条谱带色泽最深。转基因品系 GD-9-*qc*-14、GD-9-*qc*-10、GD-9-*qc*-32 的谱带颜色比对照深。而品系 GD-9-*qc*-28、GD-9-*qc*-45 与对照相比具有较大变异, 其副带数少且颜色浅。

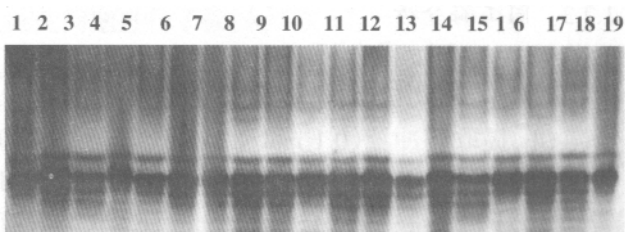


图 2 转基因马铃薯试管苗 POD 同工酶谱

注: 其中第 1、12 泳道为对照, GD-9-*qc*-14、GD-9-*qc*-10、GD-9-*qc*-32、GD-9-*qc*-28、GD-9-*qc*-45 分别是第 8、9、11、14、19 泳道, 第 5 和 13 泳道分别是 GD-9-*qc*-28、GD-9-*qc*-45。

3 讨论

马铃薯多酚氧化酶是由多基因家族编码^[4], 目前已经确定的有 6 个基因家族成员, 分别为 POT32、POT33、POT41、POT72、NOR333 和 P2^[5], 它们在不同时期, 不同空间进行特异性表达^[6]。为了有效抑制块茎 PPO 活性, 我们克隆和构建了 POT32 基因和其表达载体^[7]。通过农杆菌介导对纯合四倍体甘单花 9 号进行遗传转化, 并获得转化植株。在进行转化植株的 PPO 活性和同工酶分析后, 发现大部分转基因四倍体品系 PPO 活性明显低于

对照, 证明反义 PPO 基因对 PPO 活性具有负向调节作用, 对降低块茎损伤褐化具有积极的意义。在分析的 16 个转基因品系中, GD-9-qc-1、GD-9-qc-10、GD-9-qc-11、GD-9-qc-28 的 PPO 活性均被明显抑制。

在检测 PPO 活性的同时, 我们还测了试管苗的 CAT 活性。从实验数据中可以看出, 反义 PPO 基因的导入不仅影响了 PPO 活性, 也影响了试管苗的 CAT 活性, 使其活性发生了很大的变异, 如在 GD-9-qc-49 品系中, PPO 活性明显低于对照, 但 CAT 活性明显高于对照。而在 GD-9-qc-28 品系中, PPO 活性与 CAT 活性均低于对照。

分析 PPO 同工酶和 POD 同工酶发现: 大多数转基因材料的 POD 也发生了不定向的变异, 即有些品系如 GD-9-qc-28 与 GD-9-qc-10 的 PPO 活性低于对照且同工酶谱带的色泽浅于对照, 但其相对应的 POD 同工酶谱带却发生了不同方向的变化。利用农杆菌介导将反义多酚氧化酶基因定向插入载体分子的目的是降低 PPO 的活性^[8], 但这一系列实验表明, PPO 基因的表达受到抑制的同时, CAT、POD 的表达出现了不同程度和不同方向的变化。虽然, 我们寄希望将外源基因定向插入到染色体的某一区域^[9], 但是, 现有的转基因方法还不能达到这个水平, 这就预示着我们需对获得的大量转

基因品系进行有目的的选择。

[参 考 文 献]

- [1] 赵萍, 张宗舟, 谢恩波. 马铃薯淀粉深加工研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1991, 26(1): 91.
- [2] 彭世清. 植物多酚氧化酶的研究进展. 热带农业科学[J], 2000, 8(3): 61-66.
- [3] 王清, 王蒂. 加工型马铃薯多酚氧化酶活性的变化规律[J]. 作物遗传品种资源学报, 2003, 1: 143-147.
- [4] 张学杰, 屈冬玉, 金黎平, 等. 马铃薯酶褐变机理及其控制途径[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 158-160.
- [5] Peter W T, B D Lan, P R Simon. Polyphenol oxidase in potato. Plant Physiol, 1995, 109: 525-531.
- [6] Chris C, C Dennis, L Steve, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. Agric Food Chem, 2001, 49: 652-657.
- [7] 王清, 王蒂. 马铃薯多酚氧化酶基因克隆及反义表达载体构建 [J]. 西北植物学报, 2003, 10: 1745-1794.
- [8] Waldbauer G P. The consumption and utilization of food by insects. Adv Insect Physiol, 1968, 5: 229-288.
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程技术原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998, 598.

Physical Activity of Transgenic Homozygous Triploid of Potatoes

CHEN Ya-lan¹, WANG Qing¹, ZHANG Jian²

(1. The College of Life Scientific Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China;

2. Dingxi Extension Center for Dry Farming, Dingxi 74300, Gansu, China)

Abstract: Sixteen transgenic potato plants *in vitro* of " Gandanhua No.9" were used to test the PPO and CAT activity and to analyze the PPO and POD isozyme. The results showed that the PPO activity of most samples was repressed by anti-sense PPO gene. The PPO activity of " GD-9-qc-10" and " GD-9-qc-11" was only 2.8 and 4.1 (0.01 OD·min⁻¹), decreasing by 89.06 and 83.98 percent, respectively, compared with the control. Meanwhile, the PPO isozyme was depressed significantly also in above strains. It also showed that antisense PPO gene not only repressed PPO activity but also put an wide influence on activity of POD and CAT. It is resumed that because of the insertion of anti-sense PPO gene randomly, it may lead to wide changes of physiological activity of transgenic plants.

Key Words: potato (*Solanum tuberosum* L); PPO activity; CAT activity; PPO isozyme; POD isozyme