

转 Bt 基因抗虫棉与常规棉中几种同工酶的比较——转基因植物安全性评价生理指标初探

丁志勇, 许崇任*, 王戎疆

(北京大学 生命科学学院环境生物学与生态系, 北京 100871)

摘要:转基因改造的转基因抗虫棉在我国已开始进入大规模商业化应用, 对此进行安全性评价是一个十分重要的生态学问题。本文比较了抗虫棉和常规棉中过氧化物酶、多酚氧化酶、酯酶等几种重要同工酶的酶活和酶谱的差异, 发现在一定生长期中, 抗虫棉的可溶性过氧化物酶活性显著高于常规棉, 酯酶的酶活和酶谱在两种棉花中也存在着差异。认为这些差异可能影响抗虫棉的次生代谢, 进而导致一些综合的生态学效应, 提出植物生理上的改变也是转基因植物安全性评价研究的重要内容。

关键词:抗虫棉; 同工酶; 安全性评价

Comparison of several important isoenzymes between Bt cotton and regular cotton

DING Zhi-Yong, XU Chong-Ren, WANG Rong-Jiang (Department of Environmental Biology and Ecology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal crystal protein is being commercialized in a large scale in China. Several important isoenzymes, including Peroxidases (POD), Polyphenoloxidases (PPO) and Esterases (EST), were compared between two Bt cotton lines and regular cotton. The activity of Peroxidase in Bt cotton was higher than that in regular cotton. There were also differences between Bt cotton and regular cotton in the Electrophoretic Patterns of Peroxidase and the activity of Esterase isoenzyme. These physiological differences, maybe caused by genetic manipulation and tissue culture, could induce changes in secondary metabolism of Bt cotton and then bring ecological effects to environment. This kind of effect is also an important aspect of ecological risk assessment of transgenic plants released into environment.

Key words: Bt cotton; isoenzyme; risk assessment

文章编号: 1000-0933(2001)02-0332-05 中图分类号: Q754, S332, S562 文献标识码: A

许多植物通过基因工程转入了改造过的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)杀虫蛋白基因, 以获得抗虫的转基因植物^[1]。其中倍受关注的 Bt 抗虫棉在美国已进入商业化种植^[2]。我国在 85 期间, 人工合成了 CryIA 杀虫基因, 进行了棉花的转化和选育, 构建了高效表达外源杀虫蛋白的抗虫棉, 已经开始进行大规模推广种植^[3]。

转基因植物进入自然界可能会对环境及其它生物带来一定风险, 包括外源基因向近源植物或微生物的转移、基因产物对环境及非目标生物的负面效应、引起害虫产生抗性以及一些长期的生态学效应^[1,4]。我

基金项目: 863 资助项目(编号: Z17-02-02)

* 通讯作者

收稿日期: 1998-12-10; 修订日期: 1999-09-30

作者简介: 丁志勇(1971~), 男, 山东沂南县人, 博士。主要从事转基因微生物及转基因植物的分子生物学及安全性评价等研究。

万方数据

国制定了法规,规定转基因生物在释放到环境中前,必须进行必要的安全性评价^[5-6]。现有的风险性评价只局限于对外源的基因和产物进行检测,产物安全就判断转基因生物是安全的,但是这还不能全面评价基因工程植物带来的综合效应。在植物的基因工程操作中,基因的转化和组织培养过程都可能造成植物体形态及生理特性的改变,而这些改变可能带来一些生态环境效应。Donegan^[7]发现美国的几种抗虫棉,除了表达外源的Bt杀虫蛋白之外,其它生理特性也发生了一定的改变,表现在抗虫棉与常规棉组织对土壤微生物区系有显著不同的影响。抗虫棉与常规棉相比,在一定时间内明显不同地改变了土壤中的微生物数量、种类和组成。

转基因生物带着一种新的性状进入自然界,可能带来一些意想不到的效应,所以对转基因生物的风险性进行一种综合的、长期的评价。本研究的目的是在评价抗虫棉的外源基因以及外源蛋白产物之外,比较常规棉和抗虫棉在一定生长阶段其它生理特性的差异,为大规模种植抗虫棉的风险性评价提供依据。本研究选用过氧化物酶(Peroxidase, POD),多酚氧化酶(Polyphenoloxidase, PPO)和酯酶(Esterase, EST)是广泛存在于植物体内的几种同工酶,它们对植物的生长和分化等有重要的作用,从这几种酶的酶活和酶带上可以敏感地反映出植物的生理变化^[8-9]。本实验室首先提出以同工酶变化来检测转基因植物可能的生理变化,进而对其进行安全性评价,类似的工作在国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 棉花的种植与取样

常规棉(冀合321)和两种抗虫棉(96-144、96-172)的棉籽取自山西省运城棉花研究所,两种抗虫棉与冀合321为同一个品系。将棉花种子在80℃的水中泡30min,在温室中种植常规棉和两种抗虫棉,从出芽之日算起,当生长至一定时期,取叶片制备酶提取液,做为酶活测定和同工酶电泳的材料。每次取材均从10株棉花上取顶部数第二片幼叶,以获得一个均匀的群体效应。

1.2 酶液的制备

参考朱广廉等^[8]的方法,取0.5g棉花新鲜叶片,蒸馏水洗净吸干,置于预冷的研钵中,加入5ml预冷的0.05mol/l的磷酸缓冲液(pH5.0),充分研磨后,于4℃离心(8000rpm, 10min),取上清液于-30℃下保存备用,用于同工酶电泳的样品加入20%的蔗糖。

1.3 酶活的测定

过氧化物酶(POD)酶活的测定参考朱广廉等^[10]的方法。酯酶的测定参考胡能书等^[11]的方法。

1.4 同工酶电泳

参考张龙翔等^[12]的方法。

1.5 同工酶染色

过氧化物酶、多酚氧化酶和酯酶的染色参考刘舒芹等^[13]的方法。

2 结果与分析

2.1 可溶性过氧化物酶(POD)活性测定及同工酶酶谱

常规棉和抗虫棉原来为同一品系,在生长期相同,种植条件力求一致,采样亦力求代表一种均匀群体效应的情况下,经过6次重复采样检测,发现在生长期为58d、88d时,常规棉和抗虫棉的可溶性过氧化物酶活性如图1所示,在这两个生长期,冀合321的POD活性显著低于两种抗虫棉96-144和96-172。在生长期为88d时,POD活性在两种抗虫棉之间也存在较大差异。

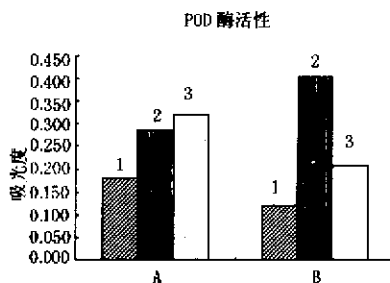


图1 常规棉(冀合321)与两种抗虫棉(96-144和96-172)可溶性过氧化物酶(POD)酶活比较

Fig. 1 Comparison of activity of soluble Peroxidase (POD) between regular cotton (JH321) and Bt cottons (96-144 and 96-172)

1. 常规棉(冀合321) Regular cotton (JH321); 2. 抗虫棉(96-144) Bt cotton (96-144); 3. 抗虫棉(96-172) Bt cotton (96-172)

A. 生长期 58d Samples of 58 d; B. 生长期 88d Samples of 88 d

在生长期为 27、58、88 和 160d 时,常规棉和抗虫棉的可溶性过氧化物酶同工酶谱如图 2 所示,在 27、58d 时,冀合 321 的 POD 带型均与两种抗虫棉 96-144 和 96-172 相似,在 27d 时 3 个样品均只有 1 条带,到 58d 时 3 个样品均增加了 1 条酶带,同时从酶带上也可以看出抗虫棉的 POD 活性高于常规棉,与上面酶活测定一致。在生长期 88d 以后,新增加的酶带在抗虫棉中消失,而在常规棉中仍可见该酶带,在 160d 时该酶带在常规棉中仍可见,但在抗虫棉中消失。

2.2 酯酶活性测定及其同工酶谱

在生长期为 27d 时,常规棉和抗虫棉的酯酶活性如图 3 所示,常规棉与两种抗虫棉 96-144 和 96-172 明显区别。常规棉酯酶活性显著高于两种抗虫棉,96-172 也明显比 96-144 低。

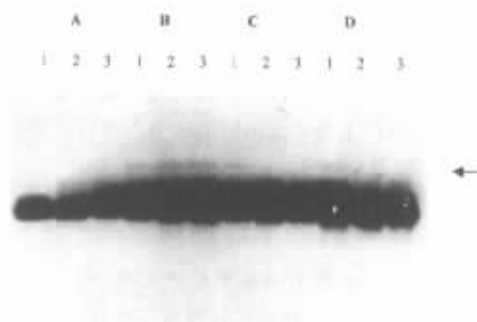


图2 常规棉(冀合 321)与两种抗虫棉(96-144 和 96-172)可溶性过氧化物酶(POD)同工酶谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of soluble Peroxidase (POD) in regular cotton (JH321) and Bt cottons (96-144 and 96-172)

1. 常规棉(冀合 321) Regular cotton (JH321); 2. 抗虫棉(96-144) Bt cotton (96-144); 3. 抗虫棉(96-172) Bt cotton (96-172); A. 生长期 27d; B. 生长期 58d; C. 生长期 88d; D. 生长期 160d

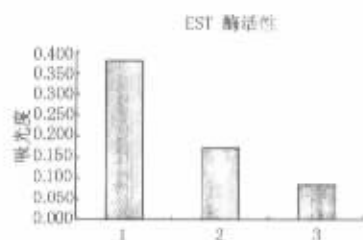


图3 常规棉(冀合 321)与两种抗虫棉(96-144 和 96-172)酯酶活性比较

Fig. 3 Comparison of esterase activities between regular cotton (JH321) and Bt cottons (96-144 and 96-172)

1. 常规棉(冀合 321) Regular cotton (JH321); 2. 抗虫棉(96-144) Bt cotton (96-144); 3. 抗虫棉(96-172) Bt cotton (96-172)

在生长期为 27d 时,常规棉和抗虫棉的酯酶谱如图 4 所示,冀合 321 的酯酶带型与两种抗虫棉 96-144 和 96-172 表现出明显不同,首先是带型不同,冀合 321 表现有 3 条明显的同工酶带,抗虫棉 96-144 可见两条明显的同工酶带,抗虫棉 96-172 只见 1 条酶带。其次是酶活的差异,冀合 321 的 1 条酶带表现出较高的酶活性,而两种抗虫棉 96-144 和 96-172 表现出的酯酶活性明显降低,这与酶活测定的结果是相一致的。生长期 58d 后的样品,由于酶活性的降低,在同工酶电泳中无法呈现出条带。

2.3 多酚氧化酶(PPC)的同工酶谱

在生长期为 27、58、88 和 160d 时,常规棉和抗虫棉的多酚氧化酶(PPC)酶谱如图 5 所示,冀合 321 的多酚氧化酶(PPC)带型均与两种抗虫棉 96-144 和 96-172 相似。在生长期 58d 时,常规棉和抗虫棉均增加了 1 条酶带,但在 88d 后,这条酶带又消失了。

3 讨论和总结

本文选择几种同工酶做了比较,发现在常规棉和抗虫棉之间,过氧化物酶和酯酶的活性和酶带均存在一定差异。常规棉和两种抗虫棉原来为同一品系,在生长期相同,种植条件一致,采样亦代表一种均匀群体效应的情况下,抗虫棉和常规棉在同工酶上表现的差异可能是由基因改造过程或组培引入的。要进一步确定抗虫棉和常规棉在同工酶性状上表现差异的原因,需要对几个抗虫棉株进行回交实验,分析其后代可以进一步明确其原因。

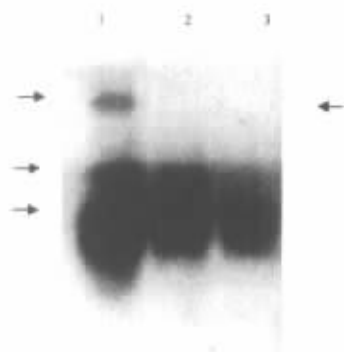


图 4 常规棉(冀合 321)与两种抗虫棉(96-144 和 96-172)酯酶同工酶谱

Fig. 4 Electrophoretic patterns of esterase isoenzyme in regular cotton(JH321)and Bt cottons(96-144 and 96-172)

1. 常规棉(冀合 321) Regular cotton(JH321); 2. 抗虫棉(96-144) Bt cotton(96-144); 3. 抗虫棉(96-172) Bt cotton(96-172)

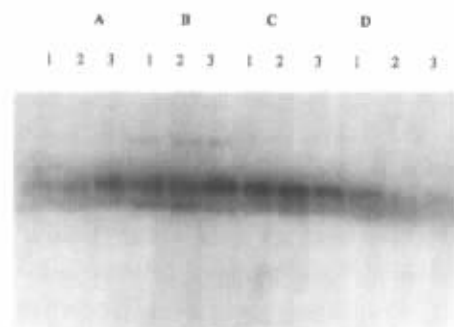


图 5 常规棉(冀合 321)与两种抗虫棉(96-144 和 96-172)多酚氧化酶(PPO)同工酶谱

Fig. 5 Electrophoretic patterns of polyphenoloxidase (PPO) Isoenzyme in regular cotton(JH321)and Bt cottons(96-144 and 96-172)

1. 常规棉(冀合 321) Regular cotton(JH321); 2. 抗虫棉(96-144) Bt cotton(96-144); 3. 抗虫棉(96-172) Bt cotton(96-172)

A. 生长期 27d, B. 生长期 58 d, C. 生长期 88d, D. 生长期 160d

过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和酯酶是广泛存在于植物体内的几种同工酶,它们对植物的生长和分化等有重要的作用^[3-6]。过氧化物酶在植物体内与乙烯的生物合成和吲哚乙酸的氧化作用有关,进而影响植物局部或整个代谢,与植物的生长发育关系密切^[3,6]。多酚氧化酶与植物的抗病性有关,植物在受侵染时会合成大量酚类化合物,参与植物的抗病反应,多酚氧化酶能氧化酚类物质成毒性更大的醌类物质^[3,6],它还参与细胞呼吸及细胞壁木质素合成,增强了细胞壁抗菌的能力^[3,6]。酯酶是植物体内催化酯类化合物水解的酶系,并由此激发或钝化与生长发育有关的酶或生理活性物质,影响植物的生长发育。以这 3 种酶为对象,比较了抗虫棉和常规棉表现出的差异,反映了抗虫棉和常规棉除了外源蛋白上的差异以外,在其生理特性方面尚存在差异。这些差异可能导致棉花生长、抗逆性等方面的不同,也是进行综合生态风险评价中应该考虑的。

本文认为从比较转基因植物与常规植物的生理差异入手,进行转基因植物环境释放的生态风险评价,是风险评价研究的一个新方向。如果转基因植物带着新的性状大规模进入自然界,有可能对整个生态环境带来冲击。在进行生态风险评价时,除了关注转基因植物的外源基因及产物外,基因改造工程可能引入的其他生理改变也是一个重要的方面。基因改造和组培过程可能在一定程度上影响了原有基因的表达,改变了转基因植物的生理特性,尤其是次生物质代谢,进而影响转基因植物抗病、抗旱等性状。这些生理改变也可能会影响该转基因植物与其它动植物或微生物的关系,进而影响原来生态环境的生态系统结构。这些改变在小范围内或没有环境胁迫时可能不会表现出来,但大规模种植转基因植物后,由于环境压力的改变,这些生理变化可能会带来生态学效应。这种生态学效应必须在转基因植物大规模释放前被考虑到,并做出科学的预测。

参考文献

- [1] 钱迎倩, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响. 生态学报, 1998, 18(1): 1~9.
- [2] Hoyle R. EPA okays first pesticidal transgenic plants. *BIO/TECH.*, 1995, 13: 434.
- [3] 第三堆. 植物 Bt 抗虫基因工程研究进展. 农作物遗传工程, 1994, 5: 11~15.
- [4] 张尚通, 许崇任. 转基因微生物生态学及大田释放风险评价研究. 应用生态学报, 1994, 5(3): 325~330.
- [5] 中华人民共和国国家科学技术委员会. 基因工程安全管理办法. 1993.
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业生物基因工程安全管理实施办法. 1996.
- [7] Donegan K K, *et al.* Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2: 111~124.
- [8] Schneider S, Ullrich W R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol Mol. Plant Pathol.*, 1994, 45: 291.
- [9] Ingham L, Parker M, Waldron K. Peroxidase: Changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiologia Plantarum*. 1998, 102: 93~100.
- [10] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [11] 胡能书. 同工酶应用技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生物实验方法和技术. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [13] 刘舒芹, 沈德绪, 林伯平. 龙眼品种过氧化物酶与多酚氧化酶同工酶分析及其亲缘关系. 园艺学报, 1988, 15(4): 217~221.
- [14] Shuban K. Rawal, Atul R. Changes in enzyme activity and isoperoxidases in haploid tobacco callus during organogenesis. *Plant Sci Lett.*, 1982, 24: 67~77.
- [15] Batra G K, Kuhn C W. Polyphenoloxidase and peroxidase activities associated with acquired resistance and its induction by 2-thiouracil in virus-infected soybean. *Physiol. Plant Pathol.*, 1975, 5: 239.
- [16] 汪敏, 郑师章. 凤眼莲体内多酶氧化酶的生理生化特性. 复旦大学学报, 1994, 33(2): 157~164.