

外源蛋白基因对棉籽营养成分影响的研究

唐茂芝, 黄昆仑, 唐小革, 周 可, 罗云波*
(中国农业大学食品科学与营养工程, 北京 100083)

摘 要: 本研究通过对转 Bt 毒蛋白棉花的各种营养成分、矿物质含量、氨基酸含量以及抗营养因子成分的检测与分析, 评价 Bt 等外源基因对棉籽营养成分的影响, 为转基因产品的安全评价提供依据。通过检测证明, 转基因棉籽和非转基因棉籽在营养学方面具有实质等同性。

关键词: 转基因; 抗虫棉; 营养成分; 影响

Effect after Introducing Bacillus thuringiensis Gene on Nutritional Composition Changes in Cottonseed

TANG Mao-zhi, HUANG Kun-lun, TANG Xiao-ge, ZHOU Ke, LUO Yun-bo*
(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Compositional analyses including protein, oil, fiber, moisture mineral content were performed on the cottonseed to assess the effects on compositional components change after introducing Bacillus thuringiensis gene. The results demonstrated that the transgenic cottonseed was comparable to the nontransgenic cottonseed within the established ranges for commercial cotton varieties. Anti-nutrients were also measured and comparisons again showed no material difference with respect to the control. The results of numerous analytical assay of the compositions demonstrated that the transgenic cottonseed was compositionally equivalent to the conventional one.

Key words: transgenic pest-resistant cotton nutritional composition effect

中图分类号 R151.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0055-04

收稿日期 2005-02-22

*通讯作者

基金项目: 国家科技部 863 计划(2001AA212291)

作者简介: 唐茂芝(1966-), 女, 工程师, 博士, 研究方向为生物安全。

析测定这些有机硒的形态对研究硒在植物体内的代谢机理是具有重要意义的。此外, 由于培养液中的有机硒总量远大于进入藻体的硒总量, 因此, 分离提取培养液中的有机硒是急需解决的问题, 当然, 对于培养液中的无机硒, 也应考虑对培养液的重复利用, 这些对富硒螺旋藻的培养提供了重要的参考。

参考文献:

- [1] 郑文杰, 欧阳政. 植物有机硒的化学及其医学应用[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2001. 261-263.
- [2] Li ZY, Guo SY, Li L. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(2): 171-176.
- [3] 黄峙, 向军俭, 郑文杰. 钝顶螺旋藻富集转化硒及硒在藻体中分布[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 17(1): 12-14.
- [4] 郑文杰, 贺鸿志, 黄峙, 等. 螺旋藻富集转化硒研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(1): 57-60.
- [5] 郑文杰, 余景, 杨芳, 等. 两种螺旋藻在不同生长阶段的硒胁迫和生物有机化效应[J]. *生态科学*, 2004, 22(4): 305-309.
- [6] 瞿进文, 吴应亮, 蔡端仁, 等. 富硒生物样品中硒的价态和形态分析[J]. *天然产物研究与开发*, 1994, 6(1): 96-98.
- [7] Watkinson JH. Fluorimetric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene[J]. *Anal Chem*, 1966, 38: 92-97.
- [8] 徐辉碧, 黄开勋. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1994. 104-135.

近年来,随着生物技术的飞速发展,人们将Bt毒蛋白杀虫基因导入棉花植株从而获得高抗虫的转基因抗虫棉品系的开发研究取得飞速进展。我国2003种植转基因棉花6.9万亩,转基因棉花种植面积占总面积的58%,比2002年增长33%,占全球转基因作物的4%。棉籽含有丰富的蛋白质、脂肪等营养物质,其含量之高可与大豆相媲美,是人类宝贵的营养资源。棉籽占皮棉质量的60%,棉籽含油20%。据统计,棉籽是目前我国居油菜、大豆、花生之后的第四大食用植物油生产原料,也是第五大消费量的食用植物油品种,达94.8万吨。随着抗虫棉种植面积不断扩大,抗虫棉棉籽的产量逐年增加。然而,转抗虫棉籽中含有外源基因,是否会引引起棉籽中各种营养成分发生变化,能否与常规棉籽一样用于食品和饲料,成为倍受关注的问题^[1~3]。本研究旨在明确含Bt等外源基因对棉籽营养成分的影响,评价转基因棉籽和非转基因棉籽在营养学方面是否具有实质等同性,为转基因产品的安全评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

转Bt基因抗虫棉籽15985、转基因棉花品系DPH37B和非转基因棉花5415棉籽(由美国孟山都公司生产)。15985和棉花品系DPH37B棉籽中均含有的共同外源基因有:来自苏云金芽孢杆菌的Cry1Ac,可以产生 δ -内毒素,产生杀虫蛋白;新霉素磷酸转移酶II(NPTII)来自大肠杆菌Tn5转座子,在基因工程操作过程中,作为抗性筛选标记基因;氨基糖苷腺苷酰转移酶(amdS)基因,来源于大肠杆菌的Tn7转座子,其产物可以分解奇霉素和链霉素,其作用与新霉素磷酸转移酶II一样,作为抗性筛选标记基因存在,主要用于对转化细菌的筛选。该基因受到细菌启动子的调控,在棉花中不表达产物。另外15985为Cry1Ab和Cry1Ac连锁基因,可延长昆虫对毒蛋白产生抗性的时间。

1.2 外源基因的遗传稳定性检测

1.2.1 模板DNA的提取

改良的CTAB法提取。0.5g棉籽中,加入2ml的提取缓冲液(3% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 100mmol/L Tris HCl, 20mmol/L EDTA, pH8.0, 6% PVP),充分摇匀后,于65℃水浴30℃, 12000r/min离心10min,上清转入另一干净管中,加入酚、氯仿异戊醇抽提,加入2/3体积的异丙醇沉淀30 min, 12000r/min离心10min,沉淀DNA后,70%的乙醇,室温晾干,加入300 μ l的TE(10mmol/L Tris HCl, 1mmol/L EDTA)并加入1 μ l RNAase(10mg/ml), 37℃保温2h,加入300 μ l等体积的氯仿异戊醇抽提,吸取上清,加入1/10体积的NaAc和两倍体积的乙醇, -20℃放置1h, 12000r/min离心10min,

弃上清,将液体尽量吸干,加入30~50 μ l双蒸水溶解沉淀。

1.2.2 PCR反应体系和条件

反应体系: 10 \times PCR buffer 5 μ l; dNTP(各2.5mmol/L)1 μ l; 引物10mmol/L各1 μ l; Taq酶(2U/ μ l)1 μ l; 模板DNA 2 μ l; 加ddH₂O至50 μ l。PCR反应程序: (1)94℃预变性5min; (2)94℃变性30s, 54~60℃退火30s, 72℃延伸60s, 40个循环; (3)72℃延伸10min。除扩增Bt基因时退火温度为60℃外,其余为54℃。空白对照不加任何DNA模板,以质粒DNA作为阳性对照,以非转基因植株DNA作阴性对照。用1.5%琼脂糖,溴化乙锭浓度为1 μ g/ml,将5~8 μ l PCR扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样。9V/cm恒压,电泳10~20min。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

1.2.3 蛋白质含量检测 根据国标GB/T5009.5-1985检测。

1.2.4 脂肪含量的检测 根据GB/T5009.6-1985检测。

1.2.5 纤维素含量检测 GB/T5009.7-1985检测。

1.2.6 矿物质 Na Mg Ca P K Cu Zn Mn Fe含量用电感耦合等离子质谱检测。

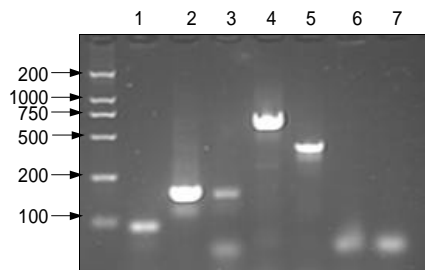
1.2.7 氨基酸测定 根据AOAC982.30/45.3.05方法测定。

1.2.8 抗营养因子分析 按中国农业部行业标准检测和分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增结果见图1。

转基因棉花15985、DPH37B均能扩增出35S(195bp)、nptII(700bp)、Cry1Ac(409bp)、NOS(180bp)相应大小的片断,采用棉花硬脂酰脱饱和酶基因SadI(90bp)作为内参照基因,三个棉花品种均有相应的内源基因条带出现,说明提取的DNA质量符合PCR要求,



1, sad1 (90bp) 2, 35s (195bp) 3, NOS (180bp) 4, nptII (700bp) 5, Cry1Ac (409bp) 6. PCR control 7. 37B(non GMO)

图1 15985棉籽外源基因的PCR扩增结果

Fig.1 PCR amplification of extraneous genes in 15985

外源基因扩增结果说明外源基因已稳定地插入转基因棉籽的染色体中, 主要的转基因性状遗传稳定。

2.2 转基因棉籽和非转基因棉籽营养组份分析

转基因棉花 37B 和 15985 棉籽的蛋白质显著高于对照非转基因棉花 DP5415 (表 1)。在目前的研究报道中, 棉花种子中的蛋白质含量变化范围在 21.76%~28.15% 之间, 因此, 转基因棉花 37B 棉籽和对照非转基因棉花 5415 棉籽中的蛋白质含量在棉花通常变化范围以内。两品种的水分、纤维素、脂肪含量也在文献报道的范围

表 1 转基因棉籽和非转基因棉籽的营养组份分析

Table 1 Compositional analysis of nutrients

	水分(%) of fw ^[a]	蛋白(%) of dw ^[b]	纤维(%) of dw ^[b]	脂肪(%) of dw ^[b]
DPH37B	6.43	22.8	17.0	20.7
15985	6.50	20.85	19.2	17.8
DP5415	6.50	18.6	20.7	18.0
文献报道的范围 ^[8]	4.0~8.7	21.8~28.2	15.4~28.2	15.4~23.8

a: fw=湿重(fresh weight); b: dw=干重(dry weight)。

2.3 转基因棉籽和非转基因棉籽矿物质含量分析

表 2 转基因棉籽和对照矿物质含量 (g/100g)

Table 2 Mineral analyses of the cottonseed (g/100g)

	DPH37B	15985	DP5415	Commercial reference range ^[9]
Na(%dw)	0.20	0.11	0.084	0.0054~0.30
Mg(%dw)	0.43	0.44	0.37	0.37~0.49
Ca(%dw)	0.09	0.11	0.10	0.12~0.33
P(%dw)	0.65	0.72	0.59	0.61~0.88
K(%dw)	1.09	1.26	0.94	1.08~1.25
Cu(mg/kg dw)	10.14	10.76	8.70	4.39~10.35
Zn(mg/kg dw)	34.2	36.8	27.2	27.39~51.20
Mn(mg/kg dw)	13.4	15.4	11.9	11.7~18.31
Fe(mg/kg dw)	49.4	46.9	37.9	41.84~72.15

注: 矿物质是干重基础上的 dw= 干重(dry weight)。

从表 2 可以看出, 在检测的各种矿物质中, 抗虫棉 15985 和 37B 的 Na、Mg、P、K、Cu、Zn、Mn、Fe 离子都显著高于非转基因品种 5415, 变化值都在文献报道的范围内。

2.4 转基因棉籽和非转基因棉籽氨基酸含量分析 结果见表 3。

在棉花种子中, 谷氨酸、精氨酸、天(门)冬氨酸是主要的氨基酸, 经过比较转基因棉籽 15985 和 DPH37B 棉籽与非转基因棉籽 DPH5415 的精氨酸、谷氨酸无显著差异。其它氨基酸甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、亮氨酸差异不显著, 天冬氨酸、组氨酸、脯氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、丙氨酸的含量有差异。根据法国 AGPM 的标准, 氨基酸测定中 10% 的波动被认为是可以接受的。因此这些差异是可以接受的。表明

表 3 转基因棉籽和对照的氨基酸含量

Table 3 Amino acid analyses of the cottonseed

	DPH37B	15985	DP5415	文献报道的氨基酸含量 ^[6]
天冬氨酸	10.35	8.61	8.60	8.8~9.5
丝氨酸	5.53	4.60	4.97	3.9~4.4
谷氨酸	22.54	20.19	20.67	20.5~22.4
甘氨酸	4.74	4.62	4.40	3.8~4.5
组氨酸	3.33	2.82	3.09	2.6~2.8
精氨酸	11.01	10.94	11.32	10.9~12.3
苏氨酸	4.25	3.70	3.95	2.8~3.2
丙氨酸	4.74	4.03	4.28	3.6~4.2
脯氨酸	4.47	3.70	4.11	3.1~4
半胱氨酸	2.17	1.75	2.45	2.3~3.4
酪氨酸	2.96	2.63	2.84	2.8~3.3
缬氨酸	4.06	3.99	4.24	4.3~4.7
蛋氨酸	1.36	0.99	1.03	1.3~1.8
赖氨酸	2.79	2.38	2.40	4.2~4.6
异亮氨酸	3.61	3.37	3.52	3~3.4
亮氨酸	5.00	5.90	5.82	5.5~6.1
苯丙氨酸	4.96	6.14	6.16	5~5.6

注: 氨基酸的含量为每 100g 蛋白中的氨基酸含量。

外源蛋白基因 CryIAb 和 CryIAc 没有影响氨基酸的组成和表达水平。

2.5 转基因棉籽和非转基因棉籽抗营养因子的检测 见表 4。

表 4 棉籽中抗营养因子含量测定

Table 4 Anti-nutrients analyses of the cottonseed

	DPH37B	15985	DP5415	参考值
丹宁(%)	0.068	0.053	0.039	***
游离棉酚(%)	0.49	0.50	0.47	0.22~0.58 ^[5]
总酚(%)	1.06	0.97	1.02	0.71~1.24 ^[6]

在转基因棉花 15985 和 37B 棉籽里, 棉酚的含量与非转基因亲本棉花 5415 棉籽无显著差异。抗营养因子中, 游离棉酚含量, 三个品种的含量接近, 总棉酚含量有差异, 但都在文献报道的含量范围内。

3 讨论

食物成分分析是评估转基因产品的非期望效应的基础, 是转基因食品进行安全性评价和营养学评价的重要内容^[10], 转基因作物被修饰过的基因是否导致食物、饲料和工业产品的营养及功能特性的改变一直是人们所担心的问题, 也是目前在食品生产中运用 DNA 重组技术所引发的焦点问题之一。本研究对蛋白质、脂肪、纤维、矿物质、氨基酸等营养成分进行了全面分析, 结果显示, 转连锁抗虫基因基因的 15985 棉籽、转 Bt 基因的 DP37B 棉籽与非转基因对照没有显著差异。说明抗虫棉棉籽仁的营养成分并不因 Bt 基因的导入而发生明显的变化。

本研究同时对固有毒素和抗营养素棉酚和丹宁在转

刺梨 SOD 活力测定研究

吴素玲, 张卫明, 孙晓明*, 金敬宏, 史劲松, 顾龚平
(南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘 要: 本文建立了邻苯三酚自氧化对刺梨 SOD 测活方法的改进条件; 并对不同方法提取的刺梨 SOD 样液进行测试。结果表明: 刺梨果中含有丰富的 SOD, 但加工过程中温度对 SOD 活力影响很大。测得的 SOD 活力数据低的约 100U/g, 高的则约 5000U/g, 数值相差几十倍。为刺梨加工方法的选择提供参考。

关键词: 刺梨; 超氧化物歧化酶; 邻苯三酚; 提取方法

Studies on Determination of SOD Activity in *Rosa roxburghii* Tratt

WU Su-ling, ZHANG Wei-ming, SUN Xiao-ming*, JIN Jing-hong, SHI Jin-song, GU Gong-ping
(Nanjing Research Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

Abstract: The superoxide dismutase (SOD) assay in *Rosa roxburghii* Tratt by Pyrogallol Pyrogallol Acid self-oxidization method was studied. The SOD activities of *Rosa roxburghii* Tratt samples by using different extraction methods were determined. The results indicated the fruit of *Rosa roxburghii* Tratt contained rich SOD, but the process temperature could have much effect on the SOD activity. The minimum SOD activity measured was 100U/g and the maximum was 5000U/g. Lower temperature during storage and processing could preserve the activity. This paper could provide some reference to the choice of processing methods

收稿日期 2004-11-29

*通讯作者

基金项目: 国家农业科技成果转化基金课题(02EFN217201287)

作者简介: 吴素玲(1963-), 女, 副研究员, 研究方向为农副产品综合利用和食品分析。

基因杂合体和未转基因杂合体之间进行了检测, 结果显示并没有显著性差异。说明转基因棉花 15985 和 DPH37B 在作为食品和动物饲料方面与其他棉花和非转基因品种具有实质等同性。营养品质与传统的棉籽实际等同, 与常规棉籽一样, 可作为人类食品和畜禽饲料资源。

参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.
- [2] Gideon Lack Clinical risk assessment of GM food [J]. Toxicology Letters, 2002, 127: 327-340.
- [3] Harry A. Kuiper comparative safety assessment for biotech crops [J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(10).
- [4] John R Holl, H Jaster. Feedstuffs, 1999. 12-13.
- [5] Park W, Waldrup. Nutrient composition of cottonseed meal surveyed[J]. Feedstuffs, 2002, (11): 11-12.
- [6] Lawhon, et al. Evaluation of the food use potential of sixteen varieties of cottonseed[J]. J Am Oil Chem Soc, 1977, 54:75-80.
- [7] Monsanto 2000, Safety, Compositional and nutritional aspects of bollgard II cotton event [S] 15985. U.S. FDA/CFSAN. BNF 74.
- [8] OECD 2004. Environment, health and safety publications series on the safety of novel foods and feeds. No. 11 Consensus document on compositional consideration for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*) [C]: Key Food and Feed Nutrients and Antinutrients.
- [9] Xing C Z, et al. The spatial temporal distribution of Bt insecticidal protein in Bt transgenic cotton and its effect on Bt transgenic cotton resistance to bollworm [J]. Cotton Sci, 2001, 13(1): 11-15.
- [10] Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1089-1125.