

转 TMV-cp 基因烟草对环境影响的 安全性研究

李丽杰¹, 张海霞², 颜培强¹, 万秀清¹, 刘世丰², 郭兆奎¹

1 中国烟草东北农业试验站, 牡丹江市西地明街 63 号, 157011;

2 哈尔滨烟叶公司, 哈尔滨 150001; 3 哈尔滨烟叶公司宾县分公司, 宾县 150400

摘要: 以转 TMV-cp 烟草品种 NC89 为试验材料, 在温室和隔离圃中进行了转基因烟草对环境的安全性评价。试验结果未发现来自转基因材料中的外源基因漂移或整合到杂草、细菌、真菌和病毒上。

关键词: 转 TMV-cp 基因烟草; 环境安全性

中图分类号 S572.035 文献标识码 A 文章编号 1004-5708(2007)06-0041-03

Study on environmental biosafety of transgenic tobacco variety NC89 (TMV-cp)

LI Li-jie¹, ZHANG Hai-xia², YAN Pei-qiang¹, WAN Xiu-qing¹, LIU Shi-feng², GUO Zhao-kui¹

1 Heilongjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang 157011, China;

2 Harbin Leaf Tobacco Company, Harbin 150001, China;

3 Harbin Leaf Tobacco Company Binxian Branch, Binxian 150400, China

Abstract: Environmental biosafety of transgenic tobacco variety NC89 (TMV-cp) and male sterile line variety NC89 were evaluated in greenhouse experiment. Results showed that no foreign genes from transgenic tobacco flew to or integrated with weeds, bacteria, fungi, and virus genome.

Key words: transgenic tobacco variety; NC89; environmental safety

从本世纪 80 年代世界上第 1 例转基因植物的诞生, 到目前全世界大约 2780 万公顷转基因作物以及大量用来生产医用蛋白的转基因动物生物反应器, 转基因技术已经广泛应用于医药、食品、农业等领域。与此同时, 其安全性问题在世界范围内引发广泛争议。目前对转基因植物的安全性评价一方面 是环境安全性, 另一方面是食品安全性。为了解转基因烟草对生态环境的影响, 本研究以转 TMV-cp 烟草品种 NC89 为试验材料, 对转基因烟草外源基因漂移到杂草上以及整合到细菌、真菌、病毒上的可能性进行了研究, 并对烤后烟叶降解情况进行了分析。

作者简介: 李丽杰, 女, 大学。

郭兆奎 (通讯作者), 男, 教授, 高级农艺师, 研究方向为烟草病虫害防治和烟草生物技术。

E-mail: guozhaokui@yahoo.com.cn

基金项目: 国家烟草专卖局项目《我国烟草转基因品种现状调查和安全性评价及对策研究》(981071)

收稿日期: 2007-03-14

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草品种 转 TMV-cp 烟草品种 NC89 由本实验室保存, 非转基因烟草品种 NC89 由本所育种室提供。Taq 酶、dNTPs 为宝生物公司(大连)产品, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 转基因烟草基因漂移到杂草上试验

试验在黑龙江省烟草科学研究所温室中进行, 试验采用盆栽, 首先种植 100 株转 TMV-cp 烟草品种 NC89, 开花期收集花粉晒干后瓶装储存冰箱备用。温室中选择 20 m² 土地种植稗草、鸭跖草、问荆、铁苋菜、香薷、反枝苋、藜、卷茎蓼、苍耳、芥菜、苦苣菜等杂草, 各种杂草开花期在其柱头上涂抹转 TMV-cp 烟草花粉, 生长季节不除草并不施任何药剂。采收种子后次年全部种植在同块地中, 并采用相同方法进行受粉, 连续 3 年试验后, 采集各类杂草各 10 份, 40 °C 烘干后按照“烟草及烟草制品转基因检测方法(YC/T149-2002)”

提取各样品 DNA 并进行 TMV-cp 序列的 PCR 检测, 鉴定各样品是否含有转基因成分。

1.2.2 转基因烟草基因整合到细菌上试验

试验采用盆栽, 种植 50 株转 TMV-cp 烟草品种 NC89, 生长期不施任何药剂。旺长期在叶片上接种烟草野火病、角斑病病原细菌, 当病斑直径长到 0.5 cm 左右时采集 100 个病斑, 在病斑中间用锋利的尖刀切开并迅速投入 40 mL 无菌水中, 25 °C 震荡 20 min 后将叶片过滤出去, 滤液于 5000 r/min 离心 10 min, 沉淀物溶于 200 μ L LB 液体培养基中, 26 °C 温育 4 h。并以转化的大肠杆菌 DH5 α (含 TMV-cp 序列) 为对照, 对菌液 (设置 50 个重复) 进行 TMV-cp 序列的 PCR 检测。10 μ L 的 PCR 扩增体系为 2.5 mM dNTPs 1 μ L, 10 \times PCR buffer 1 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, TMV-cp 检测引物 TV-1 (5'-CTCCATCTCAGTTCGTGTTTC3')/TV-2 (5'-ATGCATCTTGACTACCTCAA3') 各 0.5 μ L, 超纯水 5.8 μ L, 菌液模板 1 μ L。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 40 min, 58 °C 退火 40 min, 72 °C 延伸 1.2 min, 循环 36 次后, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 转基因烟草基因整合到真菌上试验

温室中种植 50 株转 TMV-cp 烟草品种 NC89, 烟株团棵期在叶片上接种烟草灰霉病, 保湿培养。当病斑直径达到 1~2 cm 并长出霉层 (孢子) 时, 剪下 100 个左右病斑, 40 °C 烘干, 用硬毛刷将病原物刷下, 液氮研磨后进行 DNA 提取 (提取方法为 CTAB 法, 同烤后烟叶的 DNA 提取方法^[11]), 并进行 TMV-cp 序列的 PCR 检测 (阳性对照选用转 TMV-cp 烤后烟叶样品, PCR 扩增条件及体系同转基因烟草检测方法^[21])。

1.2.4 转基因烟草基因与病毒发生重组试验

在烟株团棵至旺长期期间采集烟草 PVY 病嫩叶, 采用摩擦接种方法将 PVY 病毒接到温室盆栽的、无病的转 TMV-cp 烟株上, 选择 PVY 症状表现早且严重的转基因烟草嫩叶, 重新将其所含 PVY 病毒接种到常规未感染 TMV 病毒的烟草品种 NC89 烟株上, 重复多次。秋季 (40 d 以后) 采集显症 (PVY 病) 严重的常规 NC89 烟株叶片 10 份以及未感染 PVY 病毒的烟草叶片 1 份, 应用 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取 11 份材料的病毒 RNA (方法略, 按使用说明书), 以上述 RNA 提取物为模板应用 TaKaRa 的 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒合成 cDNA 第一链; 应用 PVY-cp PCR 检测引物 (PVYCP-F: 5'-GAGAATGCCCAAGCAAGG3'; PVYCP-R: 5'-CGCGCTAAACCCATATCCCG3') 对 cDNA 第一链进行 PCR 扩增, 验证病毒提取、RNA 逆转录 cDNA 是否成

功, 以及 PCR 扩增体系及条件是否合适; 应用 TMV 复制酶基因 PCR 鉴定引物 (TMV-REP1: 5'-CAGCTAACT-GAGCCAC3'; TMV-REP2: 5'-AATTGTTGATCTCTGG3') 鉴定 11 份材料是否被 TMV 病毒感染; 利用 TMV-cp 检测引物 (序列同上) 鉴定 11 份 NC89 烟株是否有外源基因 TMV-cp 的表达。试验中均设置阴性样品对照、病毒叶片 DNA 提取物对照、以及阳性对照。25 μ L 的 PCR 扩增体系为: 2.5 mM dNTPs 1 μ L, 5 \times PCR buffer 5 μ L, Ex-Taq 酶 0.25 μ L, 引物各 0.25 μ L, 超纯水 13.25 μ L, C-DNA 模板 5 μ L。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 40 min, 58 °C 退火 40 min, 72 °C 延伸 1.2 min, 循环 36 次后, 72 °C 后延伸 10 min。

1.2.5 转基因烟草烤后基因降解情况分析

提取转 TMV-cp 烟草幼苗、鲜叶、晾干烟叶、晒干烟叶以及烤后烟叶进行 DNA 提取 (提取方法略), DNA 提取物进行浓度测定、凝胶电泳分析, 并利用引物 35s-1 (5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3') 与引物 nos-5 (5'-GTA ACATAGATGACACCGCG-3') 对 DNA 产物进行 PCR 检测。

2 试验结果

2.1 转基因烟草基因漂移到杂草上试验

采集的各杂草样品 DNA 提取的产量及质量存在一定差异, DNA 经过纯化后总体能满足 PCR 检测的需要。检测结果证实所有样品均为阴性, 即转基因烟草的外源基因未整合到杂草基因组上。见图 1。

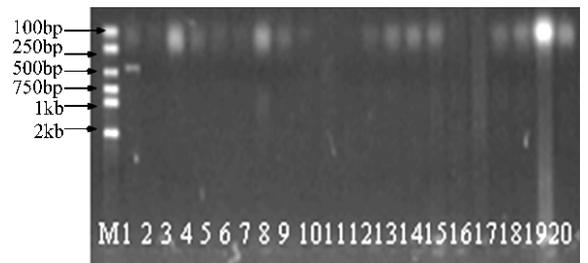


图 1 外源基因漂移到杂草上的 PCR 检测结果
M: DL2000 marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-20: 杂草样品

2.2 转基因烟草基因漂移到细菌、真菌上试验

试验结果表明, 所有筛选的细菌的 TMV-cp 序列检测结果均为阴性, 对照表现正常, 即未发现 TMV-cp 基因整合到细菌基因组上, 部分结果见图 2。

利用 CTAB 方法提取的真菌 DNA 的产量和质量都很理想, 产量在 1.0~2.0 μ g/mg 之间, 纯度在 1.72

~1.90 之间,符合 PCR 检测要求,PCR 检测结果证实所有筛选菌株均为阴性,即未发现有 TMV-cp 基因整合到真菌基因组上。见图 2。

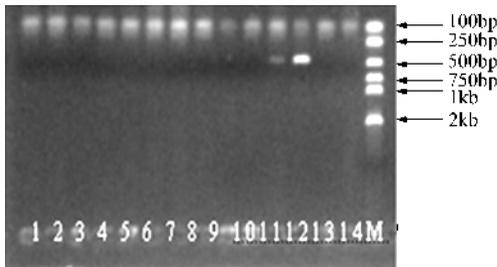


图 2 外源基因漂移到细菌、真菌上的 PCR 检测结果

M :DL2000 marker ;1-10 细菌、真菌样品 ;11-12 阳性对照 ;13-14 阴性对照

2.3 转基因烟草基因与病毒发生重组试验

利用 PVY-cp 序列的 PCR 检测引物对所有病毒 RNA 提取物逆转录的 cDNA 验证结果表明:所有感染 PVY 病毒的烟叶样品均有特异性 PCR 扩增条带,阴性样品对照(未感染 PVY)未出现扩增条带,说明 PCR 体系及其它操作过程中不存在污染;叶片 DNA 提取物对照未出现扩增条带,说明检测样品的特异扩增条带来源于病毒 RNA 的逆转录产物而不是 DNA,即证实病毒 RNA 成功逆转录,阳性对照结果正常(见图 3);TMV 复制酶基因 PCR 检测结果表明试验材料未感染 TMV 病毒(图略);所有样品 TMV-cp 引物检测结果均无特异的扩增条带,说明 TMV-cp 序列未与 PVY 病毒发生重组(见图 4)。

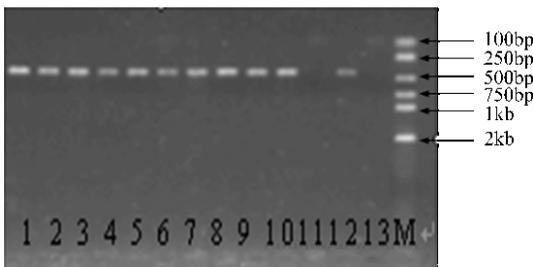


图 3 PVY-cp 序列的 RT-PCR 检测结果

1-10 :PVY 烟叶 RT-PCR 样品 ;11 阴性对照 ;
12 阳性对照 ;13 :TMV 烟叶 DNA PCR 对照

2.4 转基因烟草烤后基因降解情况分析

试验结果表明,各材料 DNA 提取物产量从大到小依次为幼苗、鲜叶、晾干烟叶、晒干烟叶以及烤后烟叶, DNA 降解程度正好相反(见图 5),其中烤后干烟叶虽

然降解最严重,但依然含有大于 2kb 以上的片段(35s-1 引物与 nos-5 引物扩增条带为 1.5kb(含有 35 启动子、TMV-cp 以及部分终止子序列),所有样品均出现特异扩增条带,阴性样品正常(见图 6)。证明从 DNA 水平上来讲烤后烟叶中依然包含从启动子-目的基因-终止子的完整的功能序列,如果这段序列被完整地整合或漂移到其它生物中去,依然有表达的可能性(根据启动子、目的基因而定)。

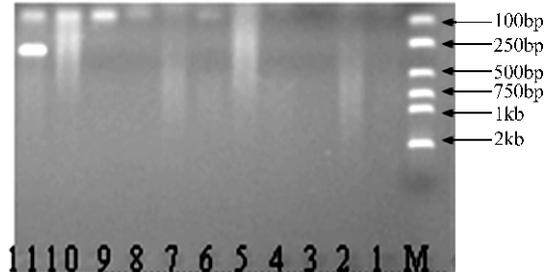


图 4 TMV-CP 序列的 RT-PCR 检测结果

1-10 PVY 烟叶 RT-PCR 样品 ;11 阳性对照 ; M :DL2000 M

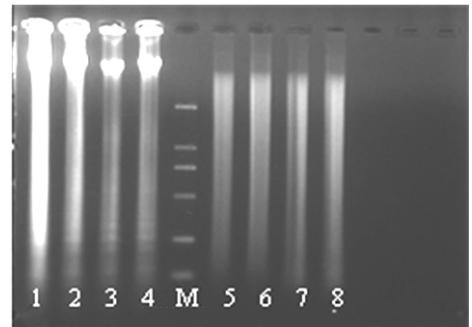


图 5 各种烟草材料 DNA 提取物凝胶电泳分析

M :DL2000 marker ;1 晒干烟叶 2 晾干烟叶

3 鲜烟叶 4 幼苗 5-8 烤后烟叶

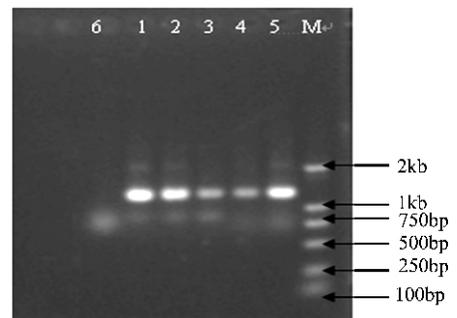


图 6 各种烟草材料 DNA 片段长度 PCR 分析

M :DL2000 marker ;1 鲜烟叶 2 晒干烟叶

3 烤后烟叶 4 晾干烟叶 5 幼苗 6 阴性对照

3 讨论

目前对转基因食品安全性的评价主要包括食用安全性和环境安全性 2 个方面,必须坚持个案评价原则。目前在烟草类的转基因研究中,主要集中在抗病、提高产质量以及抗盐碱等抗逆方面,以此为目的的转基因事件一般不存在导入外源的毒性蛋白,然而却潜在存在转入的外源基因影响并改变烟草基因组的某一基因的表达,在烟叶燃烧过程中产生或增加某有害化学成份的情况,从而对吸食者造成危害,这种几率非常小;在环境安全性评价方面,不同外源基因的表达都潜在存在一定的影响,比如转入耐盐碱基因必将导致烟草对矿物质吸收的改变,从而将改变根际土壤的微环境,对土壤微生物类群及生物量将不可避免产生影响,转 Bt 基因将对取食烟草的昆虫产生影响,并且其代谢产物以及分泌物也可能对根际土壤微生物产生影响^[3-4]。而且这些潜在影响可能不能在短期内被人们发现和注意,有待于长期的跟踪研究。本试验采取的材料为转

TMV-cp 基因烟草,其编码的是病毒的外壳蛋白而非病毒本身,其目的是包裹侵入烟株的 TMV 病毒使其不能复制,从而提高烟草抗 TMV 的能力,试验结果表明:未见有转 TMV-cp 烟草的基因漂移到杂草上,也未发现这些基因整合到细菌、真菌、病毒的基因组中;烟草基因降解情况分析表明:虽然烤后烟叶 DNA 降解严重,但仍然含有足够表达功能的 DNA 片段长度,因此也存在基因飘移问题,不可忽视。

参考文献

- [1] 郭兆奎,万秀清,魏继承,等.适于 PCR 分析的烤后烟叶的 DNA 提取方法研究[J].中国烟草科学,1999(4):5-8.
- [2] 郭兆奎,魏继承,万秀清.烟草转基因检测标准及 PCR 反应体系研究[J].中国烟草学报 2000(3):18-22.
- [3] 王洪兴,陈欣,唐建军,等.转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J].生态学报,2004,24(1):89-93.
- [4] 任馨,吴伟祥,叶庆富,等.转 Bt 基因螟稻秸秆对淹水土壤细菌落的影响[J].环境科学学报,2004,24(5):871-877.