

利用 RNA 干扰技术创制高直链淀粉马铃薯新材料

朱彩云,黄翠香,于 伟,王忠亚,杨金金,徐盼盼,徐 春,季 勤

(淮阴师范学院生命科学学院,江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室,江苏 淮安 223300)

[摘要] 直链淀粉由于其独特的理化性质,在工业上有着广泛的应用.郭志鸿^[1]等利用 RNA 干扰技术抑制马铃薯中两类淀粉分支酶亚基基因 *Sbe1* 和 *Sbe2* 的表达,有效提高了马铃薯的直链淀粉含量.本研究利用 RNA 干扰技术,构建马铃薯 SBE I (the endogenesis starch branching enzyme I) 和 SBE II (the endogenesis starch branching enzyme II) 单基因以及 SBE I 和 SBE II 双基因的 RNA 干扰双元表达质粒载体.采用农杆菌介导法将重组基因转化马铃薯品种 Désirée 后,得到 3 个转化系列.分别对转基因马铃薯植株进行 PCR 鉴定,对转基因淀粉表观直链淀粉含量和凝胶化特性等性质进行分析.结果表明,利用 RNA 干扰技术单独抑制 SBE I 或 SBE II 基因的表达,不能提高直链淀粉含量,甚至会导致其含量降低.而当 SBE I 和 SBE II 基因表达同时受到抑制时,超过 50% 的转基因株系直链淀粉含量高于对照.转化株系表观直链淀粉的含量最高可达到 49.1%,与对照(28.5%)相比提高了 20.6%.

[关键词] 转基因马铃薯,SBE 基因,RNA 干扰,直链淀粉

[中图分类号] Q786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)02-0112-07

Using RNAi Technology to Produce High-Amylose Potato New Material

Zhu Caiyun, Huang Cuixiang, Yu Wei, Wang Zhongya, Yang Jinjin, Xu Panpan, Xu Chun, Ji Qin

(School of Life Sciences, Huaiyin Normal College, Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural and Biotechnology Around Hongze Lake, Huaian 223300, China)

Abstract: Amylose is extensively used in industrial applications because of its unique physicochemical property. Zhihong Guo inhibited expression of two potato starch branching enzyme subunit genes *Sbe1* and *Sbe2* by using RNA interference technology, effectively improved the amylose content in potato. To develop transgenic potato plants with high-amylose starch in tubers, the endogenesis starch branching enzyme I (SBE I) and II (SBE II) genes were, single or simultaneously, targeted for RNA mediated gene silencing by expression of RNA interference genes in potato. In this study, RNA interference was used for gene inhibition of the starch branching enzyme I (SBE I) and II (SBE II) genes. Three SBE-RNA interference plasmids were constructed and transformed into potato cultivar Désirée. Three transformed series were obtained and analyzed by PCR. The level of silencing of SBE I and SBE II in transgenic plants was investigated by analysis of apparent amylose content. The results showed that silencing of SBE I or SBE II alone had yielded a very low frequency of high-amylose lines, and even a reduction in amylose content in most of transgenic starches. However, production of high-amylose potato lines were achieved by simultaneous inhibition of SBE I and SBE II. In this transgenic series, more than 50% of the transgenic lines showed that amylose content was higher than three control. The highest amylose content in one line was 49.1%, increasing 20.6% in comparison with untransformed starch ones (28.5%).

Key words: transgenic potato, SBE gene, RNA interference, amylose

淀粉是马铃薯的主要贮藏物质,它不仅可供人类食用,同时也是重要的工业原辅料.马铃薯淀粉是由 20% ~ 30% 的直连淀粉和 70% ~ 80% 的支链淀粉组成.其中的直链淀粉由于具有聚合度高、成膜性好、胶凝温度低、柔韧性强、不易被人体吸收等突出特性,在胶片制作、光解膜生产、医药、食品、纺织、造纸等众多领域

收稿日期:2013-03-28.

基金项目:国家自然科学基金(30771367).

通讯联系人:季勤,博士,教授,研究方向:分子生物学. E-mail: jiqin@hytc.edu.cn

应用有着其他来源的直链淀粉不可比拟的优势^[2]. 在食品工业中,可以用于膨化食品、低脂食品、食品添加剂等使用. 在环境保护方面,用直链淀粉制成的塑料制品具有生物可降解性,对解决当前的白色污染现象、保护地球环境具有很深远的意义. 直链淀粉还可用于多种胶片和各种胶条的制造,用它制造的胶片具有透明度高、弹性好、抗拉和抗水性强等特点^[3]. 马铃薯淀粉中直链淀粉含量较低,分离纯化后的得率更低. 因此,培育高直链淀粉含量的马铃薯品种对于促进马铃薯生产和满足工业对直链淀粉的需求有着重要意义.

淀粉的生物合成是非常复杂的,有多种酶的参与. 首先是在 1,6-二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)的作用下,葡萄糖-1-磷酸(Glu-1-P)与 ATP 作用生成 ADP-葡萄糖(ADP-Glu),随后 ADP-Glu 在淀粉合成酶(Starch synthase, SS)的作用下进行链的延伸. 当链达到一定长度后,在淀粉分支酶(Starch branching enzyme, SBE)的作用下由 α -1,4-糖苷键连接成的线性链之间引入 α -1,6-糖苷键形成分枝,并进一步在 SS 催化下延长分枝,淀粉去分支酶(Starch debranching enzyme, DBE)对分枝进行修饰,最后合成具有一定结构特性的淀粉结晶体^[4]. 在这些淀粉合成酶中 SBE 是支链淀粉形成过程中的关键酶^[5]. 马铃薯的 SBE 酶又有 SBE I 和 SBE II 两种同功酶之分^[6].

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发展起来的一种高效的基因沉默技术,已广泛应用于多种动植物功能基因组的研究和代谢途径的分析^[7,8],并且在作物改良中也得到了成功的应用^[9-11],Shinjiro Ogita 等对可可碱合成酶进行 RNAi,使咖啡因含量与原来相比降低了 50% ~ 70%,可可碱含量下降 30% ~ 80%^[12]. Jobling 等将反义 *Sbe 2* 基因导入马铃薯,得到了表观直链淀粉含量为 38% 的转基因马铃薯^[13].

本研究是以马铃薯支链淀粉合成中的关键酶 SBE I 和 SBE II^[14,15]基因的编码序列为靶标,构建 SBE I 和 SBE II 单基因以及 SBE I 和 SBE II 双基因的 RNA 干扰载体,利用农杆菌介导法转化马铃薯品种 Désirée 后,通过干扰基因抑制内源 SBE I 和 SBE II 单基因或同时抑制 SBE I 和 SBE II 双基因的表达,从而阻断支链淀粉的合成,获得高直链淀粉马铃薯新材料的目的.

1 材料

1.1 植物材料

马铃薯品种 Désirée 组培苗由淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室保存.

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α , 农杆菌 EHA105, pHannibial 和 pBIN20 质粒载体由淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室保存.

1.3 主要试剂

Taq DNA Polymerase 和 DNA marker 购自南京天为生物公司;各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;PCR 扩增引物由上海生工合成、DNA 凝胶试剂盒购自上海生工;DNA 测序由南京金思特生物公司完成.

2 方法

2.1 马铃薯总 RNA 的提取

取 4 g 新鲜马铃薯叶片,在液氮中研磨成粉末状后,转移至 50 mL 离心管中,加入 4 mL 异硫氰酸胍(4 mol/L)、3 mL 苯酚、0.3 mL NaAc(2 mol/L, pH 4.8)和 0.6 mL 氯仿混匀,冰浴 30 min. 4 °C、8 000 r/min 离心 13 min 后,将上清液转移到另一个干净的离心管中,加入 2 倍体积无水乙醇,于 -20 °C 放置 1 h. 4 °C、8 000 r/min 离心 13 min,去除上清后,在沉淀中加入 1 mL LiCl(4 mol/L)溶解沉淀. 将溶解液转入 1.5 mL 离心管中,冰浴 2 h. 然后在 13 000 r/min 离心 15 min,去除上清,在沉淀中加入 400 μ L 水,再加入 400 μ L 氯仿混匀,在 13 000 r/min 离心 6 min. 取上清,并加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.0),2 倍体积无水乙醇,于 -20 °C 放置 30 min 后,13 000 r/min 离心 13 min,将离心获得的沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次后,室温干燥,最后加 100 μ L DEPC 水溶解,保存于 -20 °C 备用.

2.2 引物设计及片段扩增

2.2.1 马铃薯 GBSS I 基因启动子片段扩增

依据马铃薯 GBSS I 基因启动子片段两端的序列,设计一对特异性引物 GBSS-F(5'-CCTGATCACGC-

CGAGCTCAATACTAAAAAATGC-3') 和 GBSS-R (5'-TGATGCTCGAGGTGGATGTGTGGTCTACTA-3'), 在 GBSS-F 和 GBSS-R 引物中分别引入 *Sac* I 和 *Xho* I 位点(斜体划线部分), 以 pBIN19/SBD 质粒^[16] DNA 为模板进行 PCR 扩增. 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 29 个循环, 72 °C 10 min. 扩增的 GBSS I 基因启动子片段(Gp) 长度为 685 bp.

2.2.2 SBE I 正义和反义片段扩增

利用 RNA Structure 3.2 软件中的 Oligo Walk 工具, 寻找出与 SBE I RNA 靶标紧密杂交的寡聚体片段. 根据该片段两端的序列, 以马铃薯 SBE I 基因(GeneBank 登陆号: Y08786) 序列为模板设计 2 对引物. SBE I 正义片段(SBE I F) 扩增的一对引物是: SBE I F-F (5'-ATTGAGAAATTC AACATCACCAGAAGGA-ATACC-3') 和 SBE I F-R (5'-GATAACGGTACCTTAGGTTTCTCGTCACTC-3'), 在正向引物和反向引物中分别引入了 *Xho* I 和 *Eco*R I 位点(斜体划线部分). 应用 RT-PCR 试剂盒(RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, 美国), 以马铃薯总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到正义 SBE I cDNA 片段, 长度为 227 bp. SBE I 反义片段(SBE I R) 扩增的一对引物是: SBE I R-F (5'-GTTGAAAGCTTGACATCACCAGAAGGAATACC-3') 和 SBE I R-R (5'-GTTTATACCGAATCGATACGTTTCTCGTCACTC-3'), 在正向引物和反向引物中分别引入了 *Xba* I 和 *Hind* III 位点(斜体划线部分). 以总马铃薯 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到反义 SBE I cDNA 片段, 长度为 230 bp.

2.2.3 SBE II 正义和反义片段扩增

利用 RNA Structure 3.2 软件中的 Oligo Walk 工具, 寻找出与 SBE II RNA 靶标紧密杂交的寡聚体片段. 根据该片段两端的序列, 以马铃薯 SBE II 基因(GeneBank 登陆号: Aj 011890) 序列为模板设计 2 对引物. SBE II 正义片段(SBE II F) 扩增的一对引物是: SBE II F-F (5'-CTTTCACCTCGAGTGCTCGTGTTATC-ATTGG-3') 和 SBE II F-R (5'-TGCTAGTCCGAATTCTTCCTCGTAGTTCCTCCAGTG-3'), 在正向引物和反向引物中分别引入了 *Xho* I 和 *Eco*R I 位点(斜体划线部分). 应用 RT-PCR 试剂盒, 以马铃薯总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到正义 SBE II cDNA 片段, 长度为 223 bp. SBE II 反义片段(SBE II R) 扩增的一对引物是: SBE II R-F (5'-CTTTCACCTCTAGATCTCGTGTTATCATTGG-3') 和 SBE II R-R (5'-AGTCCAAGCTTTTCCTCGTAGTTCCTCCAGTG-3'), 在正向引物和反向引物中分别引入了 *Xba* I 和 *Hind* I 位点(斜体划线部分). 以总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到反义 SBE II cDNA 片段的长度为 219 bp.

2.3 pHannbial 干扰载体构建

2.3.1 pHannbial/Gp 载体的构建

用 *Sac* I 和 *Xho* I 分别切割 pHannbial 质粒(图 1) DNA 和 Gp 启动子的扩增片段, 凝胶电泳分离, 并从胶中回收 *Sac* I -*Xho* I pHannbial 质粒 DNA 片段和 Gp 启动子片段. 用回收片段进行连接得到 pHannbial/Gp 质粒.

2.3.2 pHannbial/Gp-SBE I F-R 载体的构建

用 *Eco*R I 和 *Kpn* I 分别切割 pHannbial/Gp 质粒 DNA 和 SBE I F 片段, 凝胶电泳检测, 并从胶中回收 *Eco*R I -*Kpn* I pHannbial 质粒 DNA 片段和 SBE I F 片段. 用回收片段连接, 得到 pHannbial/Gp-SBE I F 质粒载体; 再用 *Cla* I 和 *Hind* III 分别切割 pHannbial/Gp-SBE I F 质粒 DNA 和 SBE I R 片段, 凝胶电泳检测, 并从胶中回收 *Cla* I -*Hind* III pHannbial/Gp-SBE I F 质粒 DNA 片段和 SBE I R 片段. 用回收片段连接, 得到 pHannbial/Gp-SBE I F-R 质粒载体.

2.3.3 pHannbial/Gp-SBE II F-R 载体的构建

采用与构建 pHannbial/Gp-SBE I F-R 质粒载体同样的策略, 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 分别切割 pHannbial/Gp 质粒 DNA 和 SBE II F 片段, 得到 pHannbial/Gp-SBE II F 质粒载体; 再用 *Hind* III 和 *Xba* I 分别切割 pHannbial/Gp-SBE II F 质粒 DNA 和 SBE II R 片段, 连接后得到 pHannbial/Gp-SBE II F-R 质粒载体.

2.3.4 pHannbial/Gp-SBE II / I F-SBE I / II R 载体构建

用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切 pHannbial/Gp-SBE I F-R 质粒 DNA, 凝胶电泳检测. 从胶中回收 *Xho* I -*Eco*R I 质粒 DNA 片段, 用回收的质粒 DNA 片段与 SBE II 的 *Xho* I -*Kpn* I 正义片段(SBE II F) 连接, 得到 pHannbial/Gp-SBE II / I F-SBE I 质粒载体; 再用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切上述质粒, 凝胶电泳检测, 并从胶中回收 *Hind* III -*Xba* I 质粒 DNA 片段. 用回收片段与 SBE II 的 *Hind* III -*Xba* I 反义片段(SBE II R) 连接,

得到 pHannbial/Gp-SBE II/I F-SBE I/II R 质粒载体。

2.4 RNA 干扰表达载体的构建与验证

用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切 pBIN 20(带有/OCS 终止子)和 2.3 中获得的 3 个 pHannbial 干扰载体的质粒 DNA,分别回收 pBIN20 质粒 DNA 片段和 3 个 Gp-SBE 基因的干扰片段,连接后,分别得到 pBIN20/SBE I F-R、pBIN20/SBE II F-R 和 pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 3 个干扰表达载体。

2.5 RNA 干扰载体的农杆菌转化

分别将 5 μ L 质粒 DNA 加入 100 μ L 农杆菌 EHA105 细胞中,采用电击法^[16]进行转化。

2.6 马铃薯遗传转化

马铃薯外植体的准备、农杆菌菌液的制备以及农杆菌介导的遗传转化和植株再生操作参照文献[17]的方法。

2.7 转基因马铃薯植株 PCR 检测

用改良的 CTAB 法^[18],分别从 3 个转基因系列的株系中提取基因组 DNA,根据 pBIN20 表达载体中干扰片段两端的序列分别设计 3 对特异性引物。分别以提取的基因组 DNA 为模板,利用 *Taq* 聚合酶进行 PCR 扩增验证。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.8 转基因马铃薯薯块淀粉性质分析

2.8.1 表观直链淀粉含量的测定

表观直链淀粉的含量采用双波长法测定。样品处理:精确称量淀粉样品 2 mg,充分溶于 150 μ L 的 40% (W/V) 高氯酸溶液里,完全溶解 10 min 后,加水 850 μ L 定容至 1 000 μ L。取 25 μ L 的样品溶液加入 50 μ L 碘试剂,用 925 μ L 水定容至 1 mL。空白对照:150 μ L 的 40% (W/V) 高氯酸,加水 850 μ L 定容至 1 000 μ L。取 25 μ L 的空白溶液加入 50 μ L 碘试剂,用 925 μ L 水定容至 1 mL。得到的淀粉溶液分别用 TURNER 分光光度计 (Metertech Inc, 美国) 在波长 550 nm 和 618 nm 下测定其吸收光度值,将得到的测定值代入标准曲线的回归方程,求得直链淀粉含量,然后根据 $P = (3.5 - 5.1R) / (10.4R - 19.9)$ 公式计算直链淀粉含量。公式中, P 表示样品表观直链淀粉含量(%); R 表示查双波长直链淀粉标准曲线得样品液中直链淀粉含量的比率。

2.8.2 淀粉凝胶化性质测定

用美国 Perkin-Elmer 公司 DSC27 型差示扫描量热仪对淀粉的凝胶化性质进行测定。具体操作步骤如下:精确称取 10 mg 淀粉样品,加 30 μ L 蒸馏水,置于铝盒中,用配套的铝盖密封铝盒,平衡 24 h 后,以 10 $^{\circ}$ C/min 的加热速率使铝盒温度由 25 $^{\circ}$ C 上升到 140 $^{\circ}$ C。以密封空白铝盒作为对照。采用配套分析程序 PC Series DSC7 Multitasking Software Version 2.1 记录和计算吸热曲线上的起始温度(T_o)、峰值温度(T_p)、终止温度(T_c)和糊化吸收热焓值(ΔH)。

3 结果与分析

3.1 RNA 干扰表达载体的构建

3.1.1 pHannbial 干扰载体构建

分别扩增的 Gp 启动子片段、SBE I 和 SBE II 的正义和反义片段分步插入 pHannbial 质粒(图 1)的相应酶切位点间,得到 pHannbial/Gp-SBE I F-R、pHannbial/Gp-SBE II F-R 以及 pHannbial/Gp-SBE II/I F-SBE I/II R(质粒图谱未给出)3 个中间质粒载体。质粒的测序结果表明,构建在 pHannbial 质粒载体中的 3 个重组的 SBE 干扰基因序列与预期的完全一致。

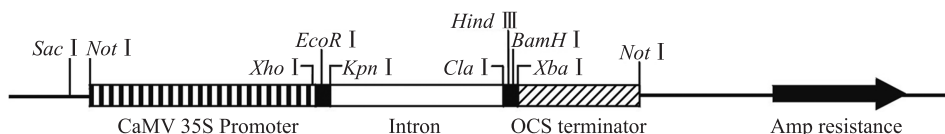


图 1 pHannbial 质粒结构图

Fig. 1 Schematic representation of pHannbial plasmid

3.1.2 RNA 干扰表达载体构建与验证

用 *Sac* I 和 *Xba* I 分别切割 pHannbial 中间载体的质粒 DNA 后,将获得的 3 个 Gp-SBE 基因的干扰片段分别插入 pBIN 20 质粒载体的相应位点,得到 pBIN20/SBE I F-R、pBIN20/SBE II F-R 和 pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 3 个干扰表达载体(图 2). 这 3 个干扰表达质粒载体,分别用于对 SBE I、SBE II 单基因以及 SBE I 和 SBE II 双基因表达抑制的研究.

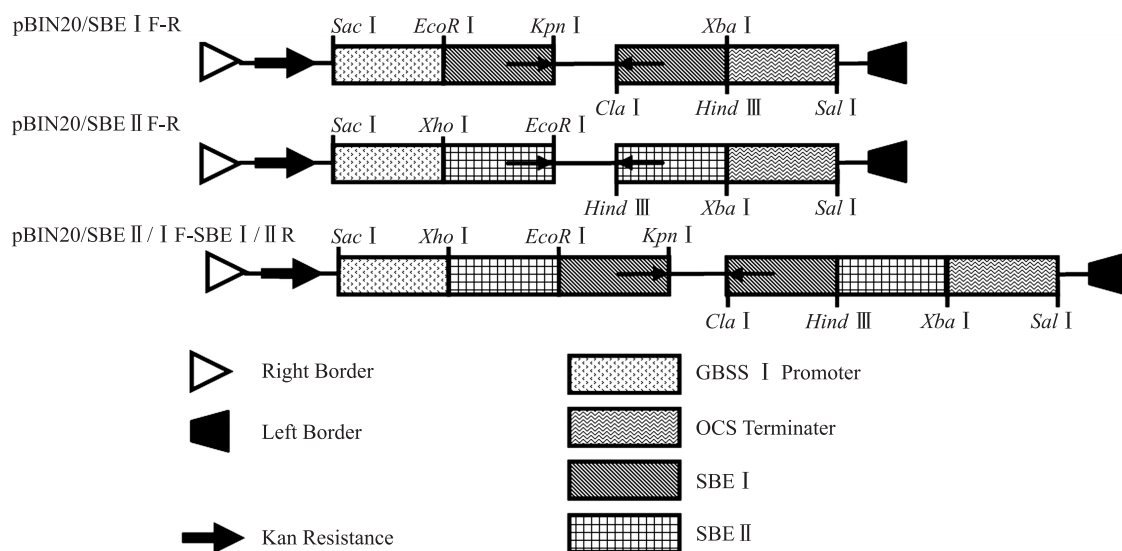


图 2 RNA 干扰植物表达载体结构示意图

Fig. 2 Schematic representation of RNAi plasmid used for expression in potato plants

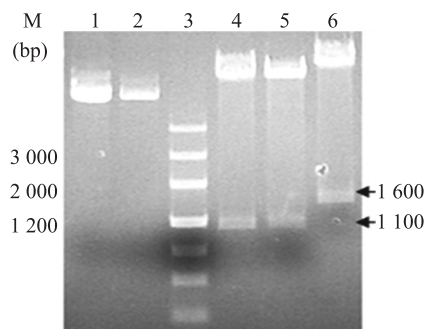
3 个干扰表达质粒载体转化大肠杆菌后,对提取的质粒 DNA 用 *Eco*R I 单酶切进行验证,结果如图 3 所示。从图中可以看出, pBIN20/SBE I F-R, pBIN20/SBE II F-R, pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 质粒经 *Eco*R I 单酶切后分别释放出 1 100 bp、1 100 bp 和 1 600 bp 的片段,这些片段和预期释放片段的大小一致。结果表明,3 个正确的 RNA 干扰载体已经获得。

3.2 马铃薯遗传转化及植株再生

将 3 个 RNA 干扰植物表达载体分别转化农杆菌后,用带有 pBIN20/SBE I F-R、pBIN20/SBE II F-R 和 pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 质粒的农杆菌转化马铃薯品种 Désirée。经 Kan 抗性筛选得到了 RNAi-SBE I、RNAi-SBE II 和 RNAi-SBE I + II 3 个转化系列。RNAi-SBE I 系列的株系被命名为 Ri-SBE I_{xx},其中的 Ri 代表 RNA 干扰,SBE I 代表 SBE I 基因,xx 代表该系列中的株系号;Ri-SBE II 系列的株系被命名为 Ri-SBE II_{xx},其中的 Ri、xx 代表的含义和前一个系列相同,SBE II 代表 SBE II 基因。RNAi-SBE I + II 系列中的株系被命名为 Ri-SBE I + II_{xx},其中的 Ri、xx 的含义和上 2 个系列相同,SBE I + II 代表 SBE I 和 SBE II 双基因。3 个转化系列分别获得了 45、48 和 35 个转化株系。

3.3 转基因植株的 PCR 分析

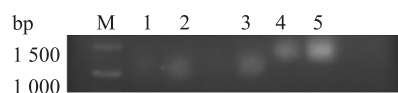
用 PCR 扩增技术对 SBE 干扰基因在 3 个系列所有转化植株的基因组 DNA 中整合的情况进行了分析。图 4 是 RNAi-SBE I、RNAi-SBE II 和 RNAi-SBE I + II 3 个系列中代表性转化植株即 Ri-SBE I -12、Ri-



1. pBIN20/SBE I F-R 质粒 DNA; 2. pBIN20/SBE II F-R 质粒 DNA; 3. DNA Marker; 4-6. pBIN20/SBE I F-R、pBIN20/SBE II F-R、pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 质粒的 *Eco*R I 酶切图谱

图 3 RNA 干扰质粒载体 *Eco*R I 酶切图谱

Fig. 3 Map of RNAi plasmid DNA digested with *Eco*RI



M. DNA Mark; 1. 阴性对照非转基因马铃薯植株; 2. RNAi-SBE I 系列中的转基因植株; 3. RNAi-SBE II 系列中的转基因植株; 4-5. RNAi-SBE I+II 系列中的转基因植株

图 4 转基因马铃薯的 PCR 分析

Fig. 4 PCR analysis of transgenic potato

SBE II-9、Ri-SBE I + II-22 的 PCR 扩增图谱。

RNAi-SBE I 系列目的基因为 1 220 bp 左右, RNAi-SBE II 系列目的基因为 1 240 bp 左右, RNAi-SBE I + II 系列目的基因为 1 400 bp 左右。从图中可以看出, 3 个转基因系列中被检测的植株中均扩增出与预期大小一致的条带。而阴性对照植株未扩增出相应的条带。结果表明, SBE 干扰基因已经整合到这些转化马铃薯基因组 DNA 中。将 PCR 检测呈阳性的转化株系同时扩繁 5 株后, 移入温室继续生长, 以非转基因马铃薯(UT-WT)为对照。3 个系列的转化植株在整个生长期其表现型与对照相似(结果未给出)。

3.4 转基因马铃薯淀粉分析

3.4.1 表观直链淀粉含量的测定

用分光光度法对转基因淀粉中表观直链淀粉的含量进行了分析, 图 5 中给出了对照及每个转基因系列中表观直链淀粉含量最高的 4 个株系。由图可知: 对照马铃薯表观直链淀粉的含量为 28.5%。Ri-SBE I 系列的 4 个株系中, 仅有 Ri-SBE I-16 的直链淀粉含量和对照相同, 其他 3 个株系均低于对照; Ri-SBE II 的 4 个株系除 Ri-SBE II-2 为 30.2%、略高于对照外, 其他株系也都低于对照; 而在 Ri-SBE I + II 系列中有超过 50% 的株系表观直链淀粉含量高于对照, 图 5 中仅给出了这个系列中直链淀粉含量最高的 4 个株系, 在这 4 个植株中, Ri-SBE I + II-53 株系的含量最高, 为 49.1%, 比对照提高了 20.6%。

3.4.2 淀粉凝胶化性质测定

从转基因株系中, 选择了 2 个直链淀粉含量提高的淀粉样品 Ri-SBE II-2 和 Ri-SBE I + II-53, 采用差示扫描量热法(DSC)对淀粉的凝胶化性质进行了分析, 以非转基因淀粉为对照, 结果见表 1。为了分析淀粉的凝胶化性质与直链淀粉含量之间的关系, 对照以及被检测的 2 个转基因株系表观直链淀粉含量也列入表 1 中。由表 1 可以看出, Ri-SBE II-2 和 Ri-SBE I + II-53 转基因淀粉与对照相比, 糊化起始温度、峰值温度和终止温度差异不是非常明显, 但糊化的热焓值却发生了很大的变化, 对照淀粉糊化的热焓值是 700.86 J/g, 而 Ri-SBE II-2 和 Ri-SBE I + II-53 淀粉的热焓值分别为 208.39 J/g 和 210.95 J/g, 大幅度下降。这是因为淀粉中直链淀粉含量增加从而导致结晶度下降, 热焓值下降。

表 1 转基因和对照马铃薯淀粉凝胶特性和表观直链淀粉含量分析

Table 1 Gelatinization characteristics and apparent amylose content measurements of starches from transgenic lines and the control

样品	起始温度 $T_o/^{\circ}\text{C}$	峰值温度 $T_p/^{\circ}\text{C}$	终结温度 $T_c/^{\circ}\text{C}$	热焓值 $\Delta H/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	表观直链淀粉含量 AM/%
UT-WT	81.48	106.43	130	700.86	28.5
Ri-和 SBE II-2	79.57	111.04	138	208.01	30.2
Ri-SBE I + II-53	78.42	108.17	139	210.95	49.1

4 讨论

为了获得高直链淀粉含量的马铃薯材料, 本研究以马铃薯支链淀粉合成中的关键酶 SBE I 和 SBE II 的基因编码序列为靶标, 利用 RNA 干扰技术, 构建了 pBIN20/SBE I F-R、pBIN20/SBE II F-R 和 pBIN20/SBE II/I F-SBE I/II R 3 个干扰植物表达载体, 分别用于干扰马铃薯内源 SBE I、SBE II 单基因以及 SBE I 和 SBE II 双基因表达的研究。从转基因马铃薯表观直链淀粉含量的数据分析来看, 单独抑制 SBE I 或 SBE II 基因的表达很难得到高直链淀粉含量的马铃薯, 这与前人研究的结果是一致的。主要是因为马铃薯中 SBE I 和 SBE II 两类淀粉分支酶亚型之间存在相对较强的代偿作用, 单独抑制其中一种酶的活性, 另一种酶能够全部或部分地补偿其作用^[1]。而同时抑制 SBE I 和 SBE II 的表达, 则可以有效提高转基因马铃薯的直链淀粉含量^[19]。郭志鸿等^[1]将 SBE I 和 SBE II 的 RNA 干扰基因转化马铃薯品种陇薯 3 号、甘农薯 2 号

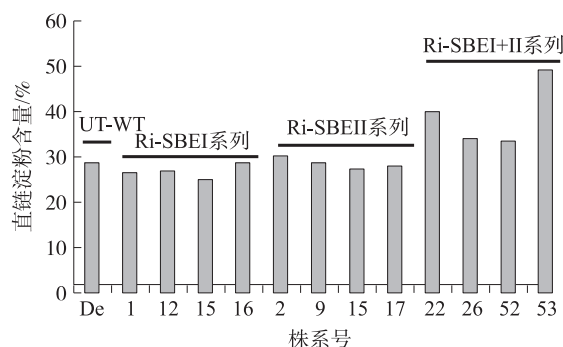


图 5 转基因马铃薯薯块中直链淀粉含量分析

Fig. 5 Analysis of amylose content of the individual transformants for three transgenic potato series

和大西洋后,转基因株系的表观直链淀粉含量介于 59.31%~87.14%,比对照平均提高了 3.2 倍。而在本研究中得到的高直链淀粉含量转基因植株的表观直链淀粉含量为 49.1%,比对照仅提高了近 1.8 倍。在不同研究中,直链淀粉含量提高幅度的差异可能是由所选用的 SBE 基因干扰片段的序列及长度不同而导致的。采用 RNAi 干扰技术,虽然在干扰片段的选择上存在很大的可塑性,长度在 120 bp~1 000 bp 的片段都可以有效抑制靶标基因的表达^[20],但是获得较好的抑制效果应和干扰片段与靶标杂交的紧密程度有关,这一点在选择 RNA 干扰片段时应考虑到。

[参考文献]

- [1] 郭志鸿,张金文,王蒂,等.用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J].中国农业科学,2008,41(2):494-501.
- [2] Englyst H N, Andersen V, Cummings J H. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods[J]. J Sci Food Agric, 1983,34:1 434-1 440.
- [3] 宋同明.发展我国特用玉米产业的意义潜力与前景[J].玉米科学,1996,5(4):6-11.
- [4] Alan M M, Matthew K M, Steven G, et al. Progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal[J]. Plant Physiology, 2000,122(4):989-997.
- [5] Fernie A R, Willmitzer L, Trethewey R N. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology[J]. Trends in Plant Science, 2002,7(1):35-41.
- [6] Abad Marta C, Binderup K, Rkos S J, et al. The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002,277:42 164-42 170.
- [7] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing[J]. Nature Reviews Genetics, 2002(4):29-38.
- [8] Mattew L. RNAi for plant functional genomics[J]. Comparative and Functional Genomics, 2004(5):240-244.
- [9] Ogita S, Uefuji H, Yamguchi Y, et al. Producing decaffeinated coffee plants[J]. Nature, 2003,423(6 942):823.
- [10] Kusaba M, Miyahara K, Lida S, et al. Low lutein content 1: a dominant mutation that suppresses the glutenin multigene family via RNA silencing in rice[J]. The Plant Cell, 2003,15:1 455-1 467.
- [11] Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. A single copy of a virus derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus[J]. Molecular Plant Pathology, 2000,1(6):347-356.
- [12] Ogita S, Hirotaka U, Masayuki M, et al. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties[J]. Plant Molecular Biology, 2004,54:931-941.
- [13] Jobling S A, Schwall G P, Westcott R J, et al. A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterization of multiple forms of SBE A[J]. The Plant Journal, 1999,18(2):163-171.
- [14] Rydberg U, Andersson L, Andersson R, et al. Comparison of starch branching enzyme I and II from potato[J]. European Journal of Biochemistry, 2001,268(23):6 140-6 145.
- [15] Larsson C T, Hofvander P, Khoshnood J, et al. Three isoforms of starch synthase and two isoforms of branching enzyme are present in potato tuber starch[J]. Plant Science, 1996,117:9-16.
- [16] Ji Q, Vincken J P, Suurs L C, et al. Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis[J]. Plant Molecules Biological, 2003,51:789-801.
- [17] 黄翠香,季勤,张云峰,等.不同启动子对禽流感病毒 H5HA 基因在马铃薯体中表达的影响[J].南京师大学报:自然科学版,2012,35(1):75-79,83.
- [18] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980,8(19):4 321-4 325.
- [19] Schwall G P, Safford R, Westcott R J, et al. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B[J]. Nature Biotechnology, 2000,18:551-554.
- [20] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. The Plant Journal, 2001,27(6):581-590.

[责任编辑:黄敏]