

转 PRSV 复制酶基因番木瓜食品安全性的初步评价*

阮小蕾¹ 侯 燕² 李华平^{1* *}

1. 华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642; 2. 深圳动植物检验检疫局, 深圳 518067

摘要 应用生物信息学的方法对转基因番木瓜进行实质等同性分析。将复制酶基因与多个数据库中的花生、大豆、坚果、牛奶、鸡蛋、鱼类、贝类和小麦等 8 类过敏源序列进行比对分析, 结果未发现连续 8 个相同的氨基酸, 据此可初步认为转入的复制酶蛋白不是已知的致敏源。将复制酶基因进行原核表达, 并纯化复性表达蛋白, 再通过模拟胃肠液消化试验, 结果发现纯化的变性蛋白与复性蛋白均能在 15 s 内降解, 表明复制酶蛋白能在人的消化系统内降解, 使人体发生过敏的可能性不大。通过液相萃取法, 提取转基因与非转基因番木瓜中的一种内源毒物苜蓿基异硫氰酯 (benzyl isothiocyanate, BITC), 将浓缩后的样品进行气相色谱分析, 结果表明 BITC 的含量在转基因与非转基因番木瓜中差异不显著。

关键词 番木瓜; 番木瓜环斑病毒; 复制酶基因; 食品安全

中图分类号 S 667.9; TS 201.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0381-06

迄今为止, 全世界已有 40 多个可能作为食品来源的转基因植物获得批准上市, 其中有些已进入商业化生产阶段或处于中试阶段^[1-3]。传统食品原料遗传性状的改变, 可能影响其细胞内蛋白质的组成, 结果可能导致有毒物质的产生或引起人的过敏症状。不自然的食物成分还可能引起损害健康的其他后果, 由此便引发了有关转基因食品安全性的争议^[3]。转基因植物食品安全性的考虑原则是其食品成分是否与目前市场上销售的食品具有实质等同性。若某一产品与市售食品具有实质等同性, 则应认为它与市售食品一样安全, 不需作进一步的安全性分析^[2-3]。

番木瓜 (*Carica papaya*) 是我国南方的重要果树, 由番木瓜环斑病毒 (papaya ringspot virus, PRSV) 引起的番木瓜环斑病毒病是一种毁灭性病害。笔者所在课题组采用转华南地区 PRSV 优势株系 Ys 的复制酶 (replicase, Rep) 基因方法防治番木瓜环斑病毒病。通过调查 T1~T5 代转基因植株的田间抗病性, 发现转 Rep 基因的番木瓜高抗华南地区 PRSV, 而且这种抗病性可以稳定遗传^[4-5]。笔者以 T5 代转基因番木瓜为材料, 从食品致敏性、模拟胃肠液消化试验、天然有毒物质等方面观察转基因与非转基因番木瓜是否具有实质等同性, 并对转

PRSV 复制酶基因的番木瓜食品安全性的部分指标进行了评价, 旨在为转 PRSV 复制酶基因的番木瓜实现商品化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

转复制酶基因番木瓜的 T5 代植株由笔者所在实验室提供; 胃蛋白酶、胰蛋白酶购自华美生物工程有限公司; 液体苜蓿基异硫氰酯 (benzyl isothiocyanate, BITC) 标准品购于美国 Sigma 公司, 色谱纯; 其余常规分析纯试剂分别购自广州化学厂、汕头化学试剂厂和上海化学试剂一厂。

1.2 数据来源

过敏源蛋白数据主要来源于美国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的核酸及蛋白数据库; The PIR-International Protein Sequence Data (<http://pir.georgetown.edu>), Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot>), EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) 等蛋白数据库。

1.3 序列比对分析

利用 DNAMAN 软件的 Fast alignment, 将转

收稿日期: 2009-10-09; 修回日期: 2009-11-17

* 国家自然科学基金项目 (30370929) 资助

* * 通讯作者. E-mail: huaping@scau.edu.cn

阮小蕾, 女, 1973 年生, 博士, 讲师. 研究方向: 植物病理学. E-mail: ruanxl@scau.edu.cn

入番木瓜的复制酶蛋白序列与过敏源数据库中的过敏源序列(主要包括花生、大豆、坚果、牛奶、鸡蛋、鱼、贝类和小麦等 8 类过敏源)进行比对,看其是否有连续 8 个氨基酸相同。

1.4 PRSV Rep 基因的原核表达

将 PRSV 的 Rep 基因构建到原核表达载体 pET-28b(+)上,得到重组质粒 pET-Rep,再将其转化到表达宿主菌 BL21(DE3)中。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 37 °C 进行诱导表达。

1.5 融合蛋白的纯化

按照 Novangen 公司的 His. tag 融合蛋白纯化手册进行操作。用 SDS-PAGE 电泳检验蛋白纯化效果。将已纯化好的蛋白洗脱液收集后,参照 Bradford^[6]的方法,取少量蛋白进行定量检测,其余蛋白置于冷冻干燥机干燥后收集备用。

1.6 蛋白复性

参照曹轶梅等^[7]的方法并略加改进。将纯化的蛋白洗脱液用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)的溶液缓慢稀释至终质量浓度为 50 g/mL,先用 50 倍体积的含 0.1 mmol/L DTT 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 4 °C 透析 3 h 以上,并换液 1 次,继续透析 3 h 以上;用不含 DTT 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 4 °C 透析 3 h 以上,并换液 1 次,除去 DTT。再用 25 倍体积的含 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽、0.3 mol/L L-精氨酸的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 4 °C 透析过夜。将复性所得的蛋白溶液进行浓缩,加入 4 mL 的超滤管中,7 500 r/min 离心 10 min,收集超滤管底部的蛋白溶液。将复性的蛋白溶液置于灭菌的干净培养皿中冷冻干燥,最后用微量的灭菌超纯水溶解,收集复性的蛋白溶液,置于-70 °C 冰箱中保存备用。

1.7 模拟胃肠液消化试验

采用 2001 年 FAO/WHO 生物技术食品致敏性联合专家咨询会议推荐的试验方法并略加改进。取变性蛋白干粉 100 g、模拟胃液 (pH 1.2)和肠液 (pH 7.5) 40 μL 于 37 °C 下水浴振荡反应。分别在处理 0 s、15 s 和 1 min、60 min 后用 4 mol/L NaOH 中和至 pH 7.0 以终止反应,然后加入 2 倍上样缓冲液,沸水中加热 5 min,上样进行 SDS-PAGE。复性蛋白样品采用复性的蛋白溶液,使受试蛋白质量为 100 g,处理过程同变性蛋白。

模拟胃液成分:胃蛋白酶 0.16 g, NaCl 0.1 g,

HCl 调节 pH 至 1.2,定容至 50 mL,0.22 μm 滤膜抽滤除菌;模拟肠液成分:胰蛋白酶 0.5 g, KH₂PO₄ 0.34 g, NaOH 调节 pH 至 7.5,定容至 50 mL,0.22 μm 滤膜抽滤除菌。

1.8 内源毒物 BITC 的提取与含量测定

采取液相萃取法提取 BITC,参照文献^[8-10]中的方法并略加改进。尽量选取生长条件和果实成熟度一致的样品,称取转基因与非转基因番木瓜青果种子、青果果肉、熟果种子、熟果果肉各 30 g,加 50 mL 灭菌去离子水,用组织捣碎机匀浆,真空抽滤除去残渣,尽量收集液体。

将收集的滤液置于分液漏斗中,用 50 mL 二氯甲烷萃取,重复 3 次。收集下层萃取液,将萃取液过无水硫酸钠层析柱除水,收集、旋转蒸发浓缩至体积小于 5 mL,每个处理 3 个重复。将浓缩后的样品送至广州分析测试中心,采用气相色谱法测定 BITC 的含量。

所有数据均进行统计分析,并采用统计软件 SAS V 8.0 进行处理,差异显著水平为 0.05。

2 结果与分析

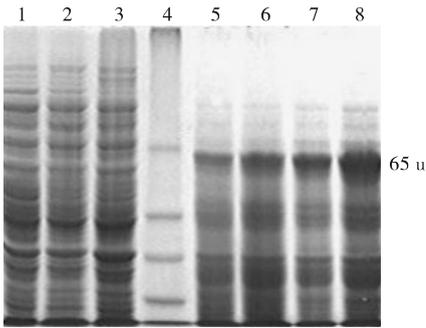
2.1 PRSV 序列与过敏源序列的比对分析

将转入番木瓜的 Rep 序列与 GenBank、EMBL、PIR 及 SwissProt 等数据库中的过敏源序列进行比对,主要比对花生、大豆、坚果、牛奶、鸡蛋、鱼、贝类和小麦等 8 类过敏源。判断同源性的标准是至少要有 8 个连续的氨基酸残基相同^[11]。序列比对结果未发现连续 8 个相同的氨基酸,初步证明转入番木瓜的复制酶基因翻译出的蛋白质不可能是已知的过敏源。

2.2 融合基因的诱导表达和包涵体的纯化及复性

将构建好的 pET-Rep 转化表达宿主菌进行诱导表达。分别收集诱导时间为 1 h、2 h、3 h 和 4 h 的细菌,裂解后上样进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色。结果表明,含 pET-Rep 的宿主菌在 37 °C 进行诱导表达 1 h 后,可产生 1 条 65 u 左右特异蛋白带。这与预期表达的融合蛋白的大小基本相同,且蛋白表达量随着时间的增长而明显增多。而在大肠杆菌 BL21 (DE3)、携带 pET-28b (+) 空载体的 BL21 (DE3) 以及没有诱导的转化细胞对照中,该处都没有明显条带(图 1)。

将表达的融合蛋白进行分析,结果显示融合蛋白主要存在于菌体沉淀物中,而上清中几乎没有蛋

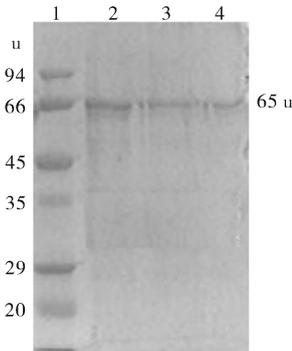


1. IPTG 诱导的 *E. coli* BL21(DE3) BL21(DE3) induction for 1 h; 2. IPTG 诱导的 pET-28b(+) pET-28b(+) induction for 1 h; 3. 未诱导的含有 pET-Rep 的 *E. coli* BL21(DE3) pET-Rep without induction; 4. 蛋白质分子质量标准 Protein marker; 5~8. 分别由 IPTG 诱导 1 h、2 h、3 h、4 h 的含有 pET-Rep 的 *E. coli* BL21(DE3) pET-28b(+) induction for 1 h, 2 h, 3 h, 4 h respectively.

图 1 Rep 基因原核表达的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant Rep protein in *E. coli* BL21(DE3)

白,这可能与诱导的条件有一定关系。在 37 °C、1 mmol/L IPTG 的诱导条件下,融合蛋白主要以包涵体的形式存在。Ni-NTA 树脂对 His 标签具有较强的亲和力。利用融合蛋白中 6 个组氨酸标签,采用亲和层析的方法,将表达于包涵体中的融合蛋白分离、纯化。结果显示亲和层析后仅出现 1 条大小为 65 u 的单一蛋白条带(图 2),表明亲和纯化的效果较好,蛋白纯度较高。



1. 蛋白质分子质量标准 Protein marker; 2~4. 亲和层析收集液 The protein purified by Ni-NTA resin.

图 2 纯化的融合蛋白的 SDS-PAGE

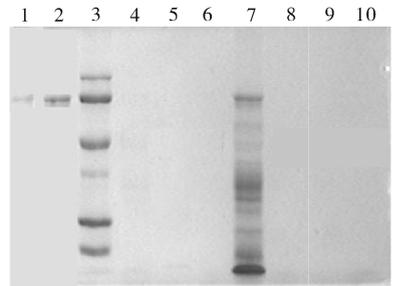
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant Rep protein in *E. coli* BL21(DE3)

将稀释法、透析法与氧化还原法相结合,采用常规的复性方法进行复性。变性蛋白超滤浓缩时,可以观察到白色颗粒状蛋白析出,这是由于变性剂尿素已除去;复性后超滤浓缩时,未见蛋白颗粒析出。

采取冷冻干燥对复性蛋白进行浓缩,干燥后用超纯水可以溶解蛋白,且蛋白的溶解度以及粘度比复性前得到明显的提高。因此,可以将其作为复性的依据,在进行 SDS-PAGE 检测时,能观察到蛋白的特异条带。

2.3 模拟消化试验

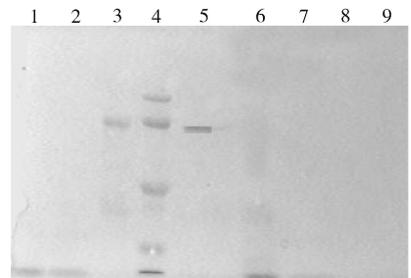
在模拟胃液及肠液的环境下,纯化的变性蛋白以及复性蛋白都能在 15 s 内失去活性(图 3,图 4),表明复制酶基因表达蛋白在模拟的胃肠液环境中不稳定,迅速降解。



1. 复性蛋白 Renatured Rep protein; 2. 变性蛋白 Denatured Rep protein; 3. 蛋白质分子质量标准 Protein marker; 4~6. 分别为消化 15 s、1 min、60 min 的变性蛋白 Denatured Rep protein digested for 15 s, 1 min, 60 min respectively; 7. 包涵体对照 Inclusion bodies; 8~10. 分别为消化 15 s、1 min、60 min 的复性蛋白 Renatured Rep protein digested for 15 s, 1 min, 60 min respectively.

图 3 模拟胃液消化变性性与复性复制酶的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the denatured and renatured Rep protein imitated gastric juice



1,2,6. 分别为消化 15 s、1 min、60 min 的变性蛋白 Denatured Rep protein digested for 15 s, 1 min, 60 min respectively; 3. 复性蛋白 Renatured Rep protein; 4. 蛋白质分子质量标准 Protein marker; 5. 变性蛋白 Denatured Rep protein; 7~9. 消化 15 s、1 min、60 min 的复性蛋白 Renatured Rep protein digested for 15 s, 1 min, 60 min respectively.

图 4 模拟肠液消化变性性与复性复制酶的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the denatured and renatured Rep protein imitated intestinal juice

2.4 内源毒物 BITC 含量的测定与分析

采用液相萃取的方法,从生长条件一致的转基因与非转基因番木瓜植株的青果种子、青果果肉、熟果种子、熟果果肉中提取 BITC,进行气相色谱分析。结果显示,种子中的 BITC 含量远远高于果肉中的 BITC 含量,并且随着果实的成熟,BITC 的含

量在种子、果肉中都有所减少。另外,通过 SAS V 8.0 分析,可以发现转基因与非转基因的番木瓜青果种子之间、青果果肉之间、熟果种子之间、熟果果肉之间 BITC 的含量并不存在显著差异。试验结果表明,在内源毒物 BITC 的含量方面,转基因番木瓜与非转基因番木瓜具有实质等同性(表 1)。

表 1 转基因与非转基因番木瓜不同组织部位 BITC 含量的测定

Table 1 The content analysis of benzyl isothiocyanate(BITC)of transgenic and non-transgenic gene papaya

项目 Items	青果种子 Unripe seeds	青果果肉 Unripe pulp	熟果种子 Ripe seeds	熟果果肉 Ripe pulp
非转基因 Non-transgenic gene	0.053 3±0.001 1	0.001 8±0.000 4	0.040 0±0.002 5	0.000 8±0.000 2
转基因 Transgenic gene	0.056 7±0.001 3	0.001 9±0.000 2	0.043 3±0.000 5	0.001 0±0.000 2
<i>t</i> 测验 <i>t</i> test	<i>t</i> =1.98, <i>P</i> >0.05	<i>t</i> =0.24, <i>P</i> >0.05	<i>t</i> =1.29, <i>P</i> >0.05	<i>t</i> =0.74, <i>P</i> >0.05

3 讨论

根据致敏性评价程序,首先判断基因是否来源于致敏性物种。供试转基因番木瓜中的外源基因有 PRSV 的 Rep 基因、CaMV 35S 启动子、NOS 终止子、卡那霉素抗性标记基因 *npt* II。35S 启动子来源于 CaMV (cauliflower mosaic virus)。这一病毒能侵染多种十字花科植物,而在实际生活中人们每天都在食用各种十字花科蔬菜。据统计,10%的十字花科蔬菜、50%的花椰菜已经被不同株系的 CaMV 感染。每个感染的细胞中都有数千个病毒基因组拷贝,有裸露的 DNA,也有病毒粒子。假如 35S 启动子有危险的话,那么食用这些蔬菜要比食用转基因植物的风险大得多。另外,35S 启动子在哺乳动物中是否有活性还没有任何报道^[12]。NOS 终止子也广泛用于多种已商品化的转基因植物中,如转 PRSV CP 基因的番木瓜品种 55-1 与 63-1、孟山都公司的马铃薯品种 BT6 与 BT10、转草甘膦抗性基因的大豆品种 G94-1、G94-19、G168 等。关于卡那霉素抗性基因 *npt* II, FDA^[13] 认为 *npt* II 基因在番茄(茄科)、油菜(十字花科)和棉花(锦葵科)上的应用是安全的。贾士荣^[14] 也认为 *npt* II 及其产物都曾经做过系统研究,可作为第一个安全使用的标记基因。

笔者课题组所转的 PRSV Rep 基因,来源于番木瓜环斑病毒华南优势株系 Ys,其组成与普通 DNA 并无差异。DNA 本身并无安全性问题^[13,15],而且在自然界中,基本上所有的番木瓜都要被 PRSV 感染,人们在食用番木瓜时,本身包含了 Rep

基因在内的 PRSV,因此,所转入番木瓜的各种基因并不来源于致敏性物种。

由于基因修饰食物通常含有新生蛋白质,故其安全性评价必须包括新生蛋白质的过敏性鉴定。将转入的外源 Rep 蛋白的一级结构与过敏源数据库的 8 类过敏源序列进行序列相似性分析,未发现有连续 8 个相同的氨基酸。因为与 T 细胞结合的肽链最短也要求 8~9 个氨基酸,与 IgE 结合的抗原决定基要求的肽链更长^[16],因此,发现 8 个连续相同的氨基酸这种分析是可信的。因为它分析的是整个蛋白质的序列,而不仅仅是与已知过敏源的已知抗原决定簇相似的氨基酸序列。鉴于目前对过敏源的抗原决定簇的氨基酸序列还未研究清楚,所以较适宜的方法是分析整个肽链长度上氨基酸的同源性。当然,这种分析找到的相似氨基酸,也可能与 IgE 的结合毫不相干,同时它也不能找到不连续的抗原决定簇或取决于蛋白质高级结构的构象抗原决定簇,但食物过敏源的热稳定性说明线性的、连续抗原决定簇有更大的意义。本试验通过序列比较,初步证明转入番木瓜的外源 Rep 基因与已知的过敏源序列没有 8 个连续相同的氨基酸,不太可能引起过敏。

大多数过敏源都有抵御胃酸和消化蛋白酶的能力,因此模拟胃肠液消化试验可以为致敏性评价提供强有力的证据。消化试验必须与与肠道环境吻合的条件下进行。通常采用美国药典提供的配方,试验材料可选用外源基因的原核表达产物,也可以使用转基因食物初提液^[17]。若半衰期小于 5 min,则认为该产物易消化^[17]。

在本试验中,采用 Rep 基因的原核表达产物,

用模拟的胃肠液消化变性与复性的表达蛋白。研究表明蛋白能在 15 s 内降解。另外,阮小蕾等^[18]对转复制酶基因的番木瓜抗性机制的研究发现,病毒接种以前,Rep 基因正常表达,没有发生基因沉默;而接种病毒后,随即启动了基因沉默。这说明这种基因沉默是由病毒侵染后诱导产生的,是一种病毒诱导的基因沉默现象。抗病毒机制表明:在转基因植株中,自然情况下可能不会有 Rep 基因的表达产物,故将其作为食品应该是安全的。综合分析转入基因来源、序列相似性比较、模拟胃肠液消化试验等的结果,可进一步证明本试验供试转入番木瓜的外源 Rep 蛋白不大可能引起过敏。

番木瓜中存在一种内源毒物苜基异硫氰酯(BITC)。本试验通过液相萃取的方法提取转基因与非转基因番木瓜的内源毒物 BITC,检测与分析后发现种子中的 BITC 含量远远高于果肉中的 BITC 含量,并且随着果实的成熟,BITC 的含量在种子、果肉中都有所减少。这与许辅等^[10]的结论是一致的。通过生物统计分析,发现转基因番木瓜与非转基因番木瓜青果种子之间、青果果肉之间、熟果种子之间、熟果果肉之间的 BITC 含量不存在显著性差异。这表明转基因与非转基因番木瓜在 BITC 含量方面具有实质等同性。由于条件有限,提取 BITC 时采用液相萃取的方法,在萃取时容易产生乳化现象^[10],收集萃取液、过无水硫酸钠除水柱时易造成 BITC 的损失,故测得的 BITC 含量可能比番木瓜中实际的 BITC 含量略低。

夏威夷大学和康奈尔大学测定了转 PRSV 外壳蛋白基因的番木瓜中部分营养元素的含量,如维生素 A、维生素 C,并与非转基因番木瓜进行比较,结果发现转基因与非转基因番木瓜中维生素 A、维生素 C 的含量虽略有差别,但不存在显著性差异。魏祥东等^[19]测定了 T4 代转 PRSV 复制酶基因番木瓜中水分、蛋白质、氮、脂肪、还原性糖、维生素 A、维生素 C、类胡萝卜素的含量,结果显示与非转基因对照都无显著性差异。在本研究中,由于时间有限,未对转复制酶基因番木瓜的营养成分进行分析,但关于转基因番木瓜中营养成分是否有所变化还需要进一步研究。

为了进行体外消化试验,必须获得复制酶基因的原核表达产物复制酶蛋白,故本研究采用目前使用较多的原核表达系统(pET 系统)来进行复制酶基因的表达。当目的基因被克隆在 T7 转录和翻译

信号控制的正确相位后,加入 IPTG 进行诱导,使宿主菌表达 T7 RNA 聚合酶,进而诱导目的基因以融合蛋白的形式进行表达。国内学者在大肠杆菌中成功地表达了一些动物病毒的复制酶蛋白^[20-22],但植物病毒复制酶基因的表达报道较少。本试验首次成功地将 PRSV 的复制酶基因构建到 pET-28b(+)表达载体中,SDS-PAGE 的分析结果表明,PRSV 复制酶基因在 BL21(DE3)中能获得较好的表达。

参 考 文 献

- [1] 张启发. 大力发展转基因作物[J]. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2010(1): 1-6.
- [2] 侯喜林, 张增翠. 植物基因工程食品的安全性及其评价[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 109-113.
- [3] 李学静. 转基因植物食品的安全性评价及其分析[J]. 天津商学院学报, 2002, 22(5): 61-64.
- [4] 阮小蕾, 李华平, 周国辉. 转 PRSV 复制酶基因 T2 代番木瓜植株的抗病性测定[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 12-15.
- [5] 冯黎霞, 阮小蕾, 李华平, 等. 转基因番木瓜抗病性测定和纯合系的获得[J]. 仲凯农业技术学院学报, 2005, 18(4): 14-16.
- [6] BRADFORD M A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein utilizing the principle of prote in-dye binding[J]. Anal Biochem, 1970, 72: 248-254.
- [7] 曹铁梅, 卢曾军, 刘在新, 等. 大肠埃希氏菌表达 FMDV 3AB 非结构蛋白的纯化复性与活性检测[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(8): 22-25.
- [8] TANG C S. Benzyl isothiocyanate of papaya fruit[J]. Phytochem, 1971(10): 117-121.
- [9] TANG C S. Location of benzyl isothiocyanate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit[J]. Phytochem, 1973(12): 769-773.
- [10] 许辅, 徐源泰. 利用固相萃取及气相层析法分析番木瓜中苜基异硫氰酯之研究[J]. 药物食品分析, 1996, 4(4): 327-334.
- [11] METCALFE D, ASTWOOD J, TOWNSEND R, et al. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1996, 36: 165-186.
- [12] 张艳华, 季静, 王罡. 转基因植物与生物安全性[J]. 作物杂志, 2003(6): 4-7.
- [13] FDA. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3'-phosphotransferase II [J]. Federal Register, 1994, 59: 26700-26711.
- [14] 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.
- [15] World Health Organization. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology: report of a Joint FAO/WHO Consultation[R]. Geneva: WHO, 1991: 59.

- [16] ROTHBART J B,GEFTER M L. Interactions between immunogenic pep2 tides and MHC proteins[J]. Annual Reviews of Immunology, 1991(9):527-565.
- [17] 张婷. 关注转基因食物的潜在过敏性[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(3):124-126.
- [18] 阮小蕾,王加峰,李华平. VIGS 介导的转复制酶基因番木瓜对 PRSV 的抗性[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4):1-5.
- [19] 魏祥东,蓝崇钰,卢志菁. T4 转基因番木瓜遗传性和果实品质分析[J]. 生态学报, 2005, 25(12):3301-3306.
- [20] 刘家森,陈淑红,刘怀然,等. SARS 冠状病毒复制酶蛋白 nsp8 的原核表达[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9):55-58.
- [21] 孙涛,陆莘. 口蹄疫病毒 RNA 复制酶基因 3D 的克隆、表达及纯化[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(2):119-121.
- [22] 韩凌霞,陈艳,崔尚金,等. 猪 II 型圆环病毒全基因组序列分析及其 ORF1 和 ORF2 基因的克隆与表达[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(1):10-13.

Preliminary Evaluation of Food Safety of Transgenic Papaya with the Replicase Gene of PRSV

RUAN Xiao-lei¹ HOU Yan² LI Hua-ping¹

1. *Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;*

2. *Inspection and Quarantine of Plant and Animal Bureau of Shenzhen, Shenzhen 518067, China*

Abstract Some indexes of food safety of transgenic papaya with the replicase gene of papaya ring-spot virus (PRSV) were evaluated in this thesis. By means of biological informatics, the analysis between the sequence transformed to papaya and the allergen sequences from GenBank, EMBL databases, PIR databases, etc. indicated there were not continuously eight same amino acids compared to the eight classes of allergens, including peanut, soybean, nut, milk, egg, fish, shellfish and wheat. It could be inferred that the rep sequence transformed to papaya did not contain the known allergens. The full-length rep gene of papaya ring-spot virus was cloned into expression vector pET-28b(+) and the specific expression product was purified by Ni-NTA resin. Some protein were attempted to be renatured. Through imitated gastric juice and intestinal juice experiment, it had been further proved the protein product of Rep gene could be degraded in human beings' digestive system, it was unlikely to cause to the human body to be allergic. From the transgenic and no-transgenic papaya, an endogenous poisonous substance called benzyl isothiocyanate (BITC) was respectively extracted by liquid phase extraction, concentrated and sent to China National Analytical Center, Guangzhou. The results of gas chromatography and biological statistical analysis showed that there was no distinct difference in transgenic and no-transgenic papaya.

Key words papaya; papaya ring-spot virus (PRSV); replicase gene; food safety

(责任编辑:陈红叶)