

新型食品添加剂卡那霉素抗性基因编码蛋白的安全性评价

徐茂军 杭州商学院 食品、生物与环境工程学院 310035

摘 要 卡那霉素抗性基因是转基因植物中广泛使用的一类标志基因。近年来越来越多的转基因植物被批准商业化应用,由此衍生而来的含卡那霉素抗性基因及其编码产物的转基因食品也逐渐增多,因而其安全性受到普遍关注。FDA已批准卡那霉素抗性基因编码蛋白 APH(3')-II 可为一类食品添加剂使用。本文对卡那霉素抗性基因的特性及其编码蛋白的安全性进行了综述评价。

关键词 卡那霉素抗性基因 APH(3')-II 安全性 食品添加剂

Abstract The neomycin phosphotransferase gene has been widely used in transgenic plants as a type of marker genes. Since more and more genetically modified plants has been released for commercial use in recent years, the amount of transgenic foods containing neomycin phosphotransferase gene and its products will be increasing which leads to the public concern. FDA has allowed aminoglycoside 3' - phosphotransferase II to be used in food plants for human consumption as a kind of food additives in 1994. The safety of neomycin phosphotransferase gene and aminoglycoside 3' - phosphotransferase II in transgenic food plants has been extensively reviewed in this paper.

Key words Safety Aminoglycoside 3' - phosphotransferase II Transgenic food plants

现代生物技术已使人们可以有目的的将外源基因转入植物细胞基因组中,从而对植物性状时行定向改良。目前世界上已有许多转基因植物被批准商业化推广应用,对提高产量和改善产品品质等方面起到重要作用^{[1][2]}。随着商业化应用的转基因植物越来越多,由此衍生而来的转基因食品也在不断增加,对其安全性也受到普遍关注^{[3][4][5]}。转基因食品与传统食品的最大区别在于前者含有用 DNA 重组技术构建的外源基因及其编码产物。转基因植物食品中的外源基因主要包含目的基因和标志基因。目的基因含有所需要的性状特征的遗传信息,转基因研究目标不同,所使用的目的基因的种类亦不相同^[6]。标志基因是帮助对基因工程生物体进行筛选和鉴定的一类外源基因,包括选择标记基因和报告基因。在选择压下,不含标志基因及其编码产物的非转化细胞和组织死亡,转化细胞由于有抗性,因而可以继续存活。常用的选择标志基因有抗生素抗性基因和除草剂抗性基因,常用的报告基因有荧光素酶、氯霉素乙酰转移酶及荧光蛋白基因等^[7]。有时标志基因本身就是目的基因,如除草剂抗性基因。卡那霉素抗性基因是第一个被使用的标志基因,世界上首例被批准商业应用的由 Calgene 公司研制的延熟番茄 FLAVR - SAVRTM 中就含有该基因^[8]。目前,卡那霉素抗性基因仍然是转基因植物研究中最常使用的标志基因。由于转基因植物中有 90% 以上都使用卡那霉素抗性基因作为标志基因,因此其安全性受到了普遍关注。FDA 已经批准卡那霉素抗性基因编码蛋白 APH(3')-II 可作为一种食品添加剂使用^[9]。本文对卡那霉素抗性基因的特征及其编码蛋白的安全性等进行综述分析。

1 卡那霉素抗性基因

目前,至少克隆了 16 个编码氨基糖苷类修饰酶并提供卡那霉素抗性的基因:4 个为乙酰转移酶 [AAC(3')-III, AAC(3')-IV] 3 个为腺苷基转移酶 [ANT(2')-I], 9 个为磷酸转移酶 [APH(3')-I, APH(3')-II, APH(3')-III, APH(3')-IV, APH(3')-V, APH(3')-VI, APH(3')-VII], 其中 aph(3')-IIa 编码氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 II [H(3')-II] 是最常用的显性标志基因,即卡那霉素抗性基因。

自然界中的卡那霉素抗性基因主要来自细菌。aph(3')-IIa 基因只存在于真细菌中,且多数是革兰氏阴性菌。最常用的 aph(3')-IIa 基因是从抗卡那霉素的大肠杆菌中分离,如转基因延熟番茄 FLAVR - SAVRTM 中所使用 aph(3')-IIa 标志基因就是从含 ColE1::Tn5 的大肠杆菌 K12 中分离出来的^[7]。

2 aph(3')-IIa 基因的食品安全性

2.1 aph(3')-IIa 基因的直接毒性

任何基因都由四种碱基与磷酸和脱氧核糖组合而成,生物性食品中都含有 DNA,历史证明,食品中的 DNA 及其降解产物对人体无害。目前所使用的 aph(3')-IIa 标志基因在 DNA 组成上并无异常,其分子和化学组成特性与普通基因无差别。aph(3')-IIa 基因在转基因植物食品中的含量甚微。在转基因延熟番茄 FLAVR - SAVRTM 中,aph(3')-IIa 基因的拷贝数在每一个细胞中不超过 10⁶ 个,由此可以推算出食用该番茄而摄入人体

内的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因不超过 $3.3 \times 10^{-4} \sim 10 \times 10^{-4} \text{ng/d}$ 。而正常情况下,每天进入人体消化道的真核 DNA 在小肠中为 $200 \sim 500 \text{mg}$,在结肠中有 $20 \sim 50 \text{mg}$ 。可见通过食用转基因植物食品而摄入体内的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的数量与消化道中来源于其他生物性食品中的 DNA 数量相比是微不足道的^[8]。由此也可以得出结论,转基因植物中的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因本身对人体无直接毒害作用^[8,10]。

2.2 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的水平转移问题

人们对转基因食品安全性的疑虑除受外源 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因是否具有直接毒性外,另一个关注的焦点是 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 在人体内能否水平转移至肠道微生物或上皮细胞,从而对人体产生不利的影响。目前的结论是这种可能性非常小。

首先,由于生物体内含有多重降解 DNA 的酶类, $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因进入人体后,很快被降解,因此在小肠下段、盲肠及结肠中已不可能有完整 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因存在。其次,即使有完整的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因 DNA 存在,由于外源 DNA 转移并结合到受体细胞是一个非常复杂的过程,如受体细胞必须呈特定的感受态;外源 DNA 必须穿过受体细胞膜进入,并且不被受体细胞内的核酸酶及修饰系统降解;受体细胞的基因组必须至少有一段 20bp 的 DNA 与外源 DNA 完全同源。因此,到目前为止,尚未发现在消化系统中有植物性食品的 DNA 转移至肠道微生物的机制。即便 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因能发生水平转移,但由于上皮细胞的新陈代谢快,半衰期短,因此不可能保存下来,而转移到肠道微生物细胞中的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因也只有在特定的调控系统中才能进行表达,而且这种表达只能在口服卡那霉素抗生素后才有优势。总之,转基因植物性食品中的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因在人体内发生水平转移并产生不利影响的机率很低^[9]。

3 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白的食品安全性

3.1 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白的直接毒性

影响食品中某蛋白质食用安全性的因素主要有该蛋白的化学组成、含量、每天摄入量及其在消化道中的稳定性等。

根据 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 的化学组成判断其毒性的常用方法是将该蛋白与已知的毒性蛋白进行同源性比较,可以通过 GenBank、EMBL、PIR 及 SwissPort 等数据库中查找氨基酸序列源性。现有的结果表明, $\text{APH}(3')\text{-II}$ 在转基因植物食品中的含量很小。例如转基因番茄中 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的最高表达量不超过总蛋白的 0.1%,而 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白占番茄果实总蛋白的 0.08% 以下。据此,可以推算出人体的每天摄入量不超过 $25 \sim 74 \text{ng/kg 体重} \cdot \text{d}$ 。而小白鼠急性毒性试验表明, $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白饲喂剂量达 500mg/kg 体重 时,无不利影响^[11]。

体外模拟试验证明, $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白稳定性较差。Western 杂交结果表明,在模拟胃的条件下(pH1.2 的胃蛋白酶溶液, 37°C) $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白在 10s 内即被降解^[12]。而目前亦无证据说明 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白降解形成的多肽比其他蛋白降解后的多肽毒性大。

3.2 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白的过敏性

过敏蛋白具有对 T-细胞和 B-细胞的识别区,产生专一性的免疫球蛋白 E(IgE)抗体。因此,过敏原含有两类抗原决定簇,即 T-细胞抗原决定簇和 B-细胞抗原决定簇^[13]。

现有资料表明 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 与已知的过敏原无明显的同源性。由于 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 在肠道很快被降解,人体直接吸收该蛋白的可能性极小。正常肠道中存在的卡那霉素抗性细菌可以产生 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白,因此对人体来说 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 并不是一种新蛋白,基于上述理由,认为 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 不是人体过敏原^[14]。

3.3 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白的功能与抗药性

$\text{APH}(3')\text{-II}$ 可催化卡那霉素及其他氨基糖苷类抗生素的氨基己糖上的 3'-羟基进行磷酸化,从而改变卡那霉素等抗生素的分子结构与性质。因此 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因编码蛋白 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 对卡那霉素、新霉素等抗生素具有抗药性。

由于卡那霉素、新霉素等抗生素在临床应用中毒副作用大,因此在人医上已被其他安全有效的抗生素药物取代,目前只在兽医上应用。由于 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白在肠胃中很快就被降解,因此即使服用卡那霉素类抗生素亦不会因食用含 $\text{APH}(3')\text{-II}$ 蛋白的转基因食品而产生抗药性。

4 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的次生效应

外源基因的次生效应是指由于外源基因的插入而对宿主体内某些基因的表达所产生的影响。目前的科学技术水平无法准确控制外源基因在宿主染色体中的插入位点,由于基因整合的随机性,外源基因可以插入宿主基因组的非编码区、结构基因区或调控区,引起插入突变。最常见的外源基因的次生效应有两种,一是由于外源基因的插入引起宿主体内某一基因的失活。一般来说,这种情况比较常见,因为通常基因在转录活跃区的整合机率大于静止区。另外一种情况是由于外源基因的插入,引起宿主体内某一基因激活。当外源基因的插入位点使抑制基因失活,则可以使原来沉默的基因激活。由于目前的科学技术水平还难以准确预测一个外源基因在新的遗传背景下会发生什么样的相互作用。因此对外源基因的次生效应还无法进行控制和预测。

关于外源基因的次生效应可能对转基因食品食用安全性方面产生的影响,一般采用“实则等同性”原则进行评价分析^[15]。^[16]该原则的基本出发点是假定与转基因食品相对应的传统食品可以安全食用,通过对转基因食品中的各种主要营养成分,主要的营养拮抗物质、毒性物质及过敏性成分等物质的种类与含量进行分析测定,并与对应的传统食品进行比较。若二者之间无差异,则认为转基因食品与传统食品在食用安全性方面具有实则等同性,不存在安全性问题。

$\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的次生效应已在茄科、十字花科及锦葵科等植物中进行过仔细研究,结论是未发现次生效应^[9]。虽然目前尚未见到有关 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因次生效应的报导,但是由于与其他外源基因一样, $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的多效性是一个

十分复杂的问题,因此不能将一种材料上的试验结果轻易地套用到其他材料上,对 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因次生效应的评价必须按照‘个案处理’(Case-by-Case)的原则进行逐个分析。

5 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的环境安全

转基因植物中的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因环境安全性分析主要包括含 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因的植物是否会转化为不可控制的杂草及 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因是否会漂流扩散至其他亲缘野生种中从而破坏自然生态平衡。由于自然条件下难以形成 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因表达优势所需的选择压,所以含该基因的植物不会转化为不可控制的杂草^[17]。此外,转基因植物与其亲缘野生种之间的可交配性一般较低,因此自然条件下发生 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因漂流扩散的可能性很小。即使发生转基因植物中的 $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ 基因扩散到亲缘野生种中,也因缺乏相应的选择压,不会对自然生态环境产生不利的影响。

参考文献

- 1 Beringer, J. E. and M. J. Bale. The release of genetically engineered plants and microorganisms. J. Chem. Tech. Biotechnol, 1988, 43: 29 ~ 32.
- 2 Neibling, K. Agricultural biotechnology companies set their sights on multi-billion markets. Genetic Engineering News, 1995, July, 1 ~ 20.
- 3 Alh Goy P. and J. H. Duesing. From pots to pots: Genetically modified plant on trail. Biotechnol, 1995, 13: 454 ~ 458.
- 4 Edwards, R. A. N. and G. H. Fleet. Food legislation and products of biotechnology In: Biotechnology and food Industry, P. L. Rogers and G. H. Fleet Eds, New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1989, 279 ~ 289.
- 5 Anderson, D. and W. F. J. Cuthbertson. Safety testing of novel food products generated by biotechnology and genetic manipulation. Biotech. Genetic Eng. Reviews, 1987, 5: 369 ~ 395.
- 6 De Lumen, B. D. Krenz, D. Z. and Revilleza, M. J. Molecular strategies to improve the proteic quality of legumes. Food Technol, 1997, 51: 61 ~ 70.
- 7 贾士荣. 转基因植物中标志基因的安全性评价. 中国农业科学, 1997, 2: 1 ~ 15.
- 8 Redenbaugh, K. Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables: A Case Study of the FLAVR - SAVRTM Tomato Florida: CRC Press, 1992, 263 ~ 271.
- 9 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. Federal Register, 1994, 59: 26700 ~ 26711.
- 10 WHO. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of a Joint FAO/WHO Consultation Geneva: World Health Organization, 1991, 5 ~ 71.
- 11 Fuchs R. L. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase - II (NPT II) protein. Bio/Technology, 1993, 11: 1543 ~ 1547.
- 12 Fuchs R. L. Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase - II protein and its equivalence to the plant expressed protein. Bio/Technology, 1993, 11: 1537 ~ 1542.
- 13 Hill D. J. C. S. Hosking and M. E. Howden et al. Transgenic foods and food allergy. In: Commercialisation of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Consideration. G. D. Mclean, P. M. Waterhouse and G. Evans et al Eds, Australian Government Publishing Service, 1977, 399 ~ 408.
- 14 WHO Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of a WHO Workshop. WHO Food Safety Unit. WHO/FUN/FOS/93. 6, 1993.
- 15 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology: Concepts and principles. Paris: OECD, 1993.
- 16 WHO. Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of food components from plants derived by modern biotechnology. Report of a WHO Workshop. WHO Food Safety Unit. WHO/FUN/FOS/95. 1, 1995.
- 17 莽克强. 转基因植物的生物安全性的商榷. 生物工程进展, 1996, 16: 2 ~ 6.