

01 110 101 011 010110 101 01011

01 110 1



转基因产品 溯源

— Zhuanjiyin Chanpin Suyuan —

农业部科技发展中心

刘 信 主 编

01 110 101 011 010110 101 01011

01 110 101 011 010110 101 01011

01 110 101 011 010110 101 01011

011 010110 101 01011

中国物资出版社



转基因产品 溯源

——Zhuanjiyin Chanpin Suyuan——

农业部科技发展中心
刘 信 主编

中国物资出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

转基因产品溯源 / 刘信主编. —北京: 中国物资出版社, 2011. 9

ISBN 978 - 7 - 5047 - 3749 - 6

I. ①转… II. ①刘… III. ①农产品—外源—遗传工程—研究
IV. ①Q943. 2 ②TS201. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 239304 号

策划编辑 刘天一

责任印制 方朋远

责任编辑 刘天一

责任校对 孙会香 梁 凡

出版发行 中国物资出版社

社 址 北京市丰台区南四环西路 188 号 5 区 20 楼 邮政编码 100070

电 话 010 - 52227568 (发行部) 010 - 52227588 转 307 (总编室)

010 - 68589540 (读者服务部) 010 - 52227588 转 305 (质检部)

网 址 [http: //www. ciph. cn](http://www.ciph.cn)

经 销 新华书店

印 刷 北京京都六环印刷厂

书 号 ISBN 978 - 7 - 5047 - 3749 - 6/Q · 0002

开 本 710mm × 1000mm 1/16

印 张 15. 75

版 次 2011 年 9 月第 1 版

字 数 258 千字

印 次 2011 年 9 月第 1 次印刷

印 数 0001—1000 册

定 价 45. 00 元

版权所有 · 侵权必究 · 印装差错 · 负责调换

本书编写委员会成员

主 任 段武德

副主任 刘 平 聂善明 周云龙

主 编 刘 信

副主编 厉建萌 汪其怀 徐俊锋

编 委 (按姓氏笔画排序)

付仲文	厉建萌	卢长明	刘 信	刘培磊
连 庆	孙彩霞	许文涛	李 宁	李飞武
李允静	沈 平	宋贵文	吴 刚	汪其怀
张秀杰	金芑军	杨立桃	杨桂玲	郑蔚然
赵 欣	徐俊锋	崔野韩	黄昆仑	谢家建

前 言

1983 年，世界上第一例含有抗生素类抗体的转基因烟草植株的问世，标志着转基因作物由实验研究向生产应用迈出了坚实的一步。1994 年，转基因延熟番茄首次获准进入商业化生产，拉开了转基因作物商业化应用的序幕。1996 年，转基因作物开始大规模商业化种植，自此转基因作物种植种类和规模迅猛发展。2009 年，全球 25 个国家种植转基因作物 1.34 亿公顷，比 1996 年种植面积 170 公顷增长了 80 倍。

我国是转基因作物研发和应用大国，也是转基因农产品进口和消费大国，已经批准转基因棉花、番茄、番木瓜等商业化生产和转基因大豆、玉米、油菜等进口用作加工原料。随着转基因作物商业化种植规模的不断扩大和转基因农产品国际贸易的日益发展，转基因产品已经进入寻常百姓的日常生活。

与传统农产品一样，转基因产品能否持续健康发展，不仅取决于内在的质量安全，还取决于公众的消费心理。目前，社会各界对转基因产品的认识还存在争议，知情权、选择权的诉求也备受消费者普遍关注。因此，如何实施积极有效的转基因产品溯源和标识管理策略，对促进转基因生物产业健康发展和维护消费者权益意义重大。

我国对转基因产品已经实行了目录范围内的定性标识管理，是否实行溯源管理和如何实施溯源管理也已提到了议事日程。为探索我国实施转基因产品溯源管理的科学依据和完善标识制度的基本对策，2008—2009 年，由农业部科技发展中心立项，我们组织开展了有关转基因产品溯源和标识问题的专题研究，取得了具有重要参考价值的研究成果。根据专题研究报告和相关技术资料，经整理、编辑成这本《转基因产品溯源》一书并出版

发行，希望本书的出版能为提升我国转基因产品溯源和标识管理水平有所裨益。

由于编者水平有限，书中疏漏或错误之处在所难免，敬请读者批评指正。

编 者

2011 年 10 月

目录

第一章 转基因技术研发	1
第一节 转基因技术研究	1
第二节 转基因生物应用现状	8
第三节 转基因生物安全性	11
第四节 转基因生物应用展望	16
第二章 转基因产品溯源管理	21
第一节 转基因生物安全管理	21
第二节 转基因产品溯源管理	37
第三章 转基因产品溯源体系	94
第一节 信息记录系统	95
第二节 信息编码与传递系统	109
第三节 信息查询系统	127
第四节 应急预警系统	133
第四章 转基因产品标识体系	148
第一节 转基因产品标识相关概念	148
第二节 转基因产品标识管理模式	151
第三节 转基因产品标识内容	159

第四节 标识豁免	169
第五章 转基因产品溯源技术	176
第一节 信息编码技术	176
第二节 信息传递技术	179
第三节 信息处理技术	186
第四节 抽样技术	187
第五节 检测技术	194
第六章 转基因产品溯源管理对策	207
第一节 转基因产品溯源管理的利弊分析	207
第二节 转基因产品溯源管理存在的主要问题	210
第三节 我国实施转基因产品溯源管理的基础条件	218
第四节 我国实施转基因产品溯源管理的建议与对策	234

第一章

转基因技术研发

在过去的二十年里，随着分子生物学及其相关领域的不断发展，植物基因的分离、基因工程载体的构建、细胞的基因转化、转化细胞的组织培养、植株再生及外源基因表达的检测等各项技术日趋成熟和完善，有关植物基因工程的研究日新月异，许多以前根本不可能的基因转化工作在越来越多的植物上获得成功。

第一节 转基因技术研究

将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体性状的可遗传的修饰，这一技术称为转基因技术 (Transgene Technology)。人们常说的“遗传工程”、“基因工程”、“遗传转化”均为转基因的同义词。经转基因技术修饰的生物体在媒体上常被称为“遗传修饰生物体”(Genetically Modified Organism, GMO)。

一般来说，转基因植物的获得包括外源基因的克隆、表达载体的构建、受体细胞的转化，以及转基因植株后代的筛选等过程。其中，载体系统、转化系统和培养筛选系统是转基因技术的核心内容。本节重点对转基因技术研究作一简要介绍。

一、基因和载体系统

载体是基因转移的运载工具。载体按功能分为基因克隆载体（Gene Cloning Vector）和基因表达载体（Gene Expressing Vector）。基因克隆载体的用途是将感兴趣的外源基因与载体连接，通过载体的复制而获得大量的外源基因拷贝。基因表达载体一般带有调控基因表达所需要的转录和翻译信号，可以使插入的目的基因转录并翻译成具有生物学活性的蛋白质。除通用的载体骨架序列（包括复制区、抗生素标记基因等）外，还含有启动子、终止子等调控元件和特异旁侧区域等，其中启动子尤为重要。

对于不同的转化方法，对基因表达载体的要求也不一致。农杆菌转化方法所采用的是经过改造的 Ti 质粒，具有许多特殊的结构，而基因枪等直接转化方法对整个载体的构建没有特殊要求，现在普遍采用的是从克隆载体上经过酶切后的线性化的基因片段进行转化。

（一）启动子

用于转基因植物的启动子是 mRNA 基因启动子，其启动的基因绝大多数为编码蛋白质。一般由两部分组成：一部分是形成普遍性转录结构所需要的，通常称为核心启动区，包括转录起始点及邻近的 TATA 框；另一部分是决定基因转录特异性和活性的区域，由多个保守序列组成，这些保守序列在不同的启动子的位置、种类及拷贝数存在较大差异。两部分都参与基因转录的调控，但后一部分起主要的控制作用。

目前转基因植物所采用的启动子按其作用方式大体可以分为三类，即组成型启动子、组织特异性启动子和诱导型启动子。这种分类大体上反映出了它们各自的特点，但这种分类是相对的，在某些情况下，一种类型的启动子往往兼有其他类型启动子的特性。

组成型启动子（Constitutive Promoter）是指一类启动子，它们控制下的结构基因可以在所有组织和部位表达，而且表达水平基本恒定。双子叶植物中最常使用的组成型启动子是花椰菜花叶病毒（CaMV）35S 启动子，它具有多种顺式作用元件。其转录起始位点上游 -343 ~ -46bp 是转录增强

区, $-343 \sim -208\text{bp}$ 和 $-208 \sim -90\text{bp}$ 是转录激活区, $-90 \sim -46\text{bp}$ 是进一步增强转录活性的区域。研究发现把 CaMV35S 启动子的 $-290 \sim -90\text{bp}$ (E7) 序列与 ω 序列串联, 也能很好地驱动外源基因在单子叶植物中的表达。用这两种结构驱动 GUS 基因表达, 在转基因水稻中 GUS 活性比单用 CaMV 35S 启动子高 20 ~ 70 倍。

人们高度重视从植物本身克隆组成型启动子, 并初见成效, 例如水稻的肌动蛋白 (Actin) 和玉米的泛素 (Ubiquitin) 等基因的启动子已被克隆, 并被广泛用于转化载体构建中。用这些启动子代替 CaMV 35S 启动子, 实现了更有效地在单子叶植物中驱动外源基因的转录。

由于组成型启动子驱动基因在转基因植物各组织中均有不同程度表达, 应用中逐渐暴露出一些问题。例如外源基因在整株植物中表达, 产生大量异源蛋白质或代谢产物在植物体内积累, 打破了植物原有的代谢平衡, 有些产物对植物并非必需甚至有毒, 因而阻碍了植物的正常生长, 甚至导致死亡。另外, 重复使用同一种启动子驱动两个或两个以上的外源基因可能引起基因沉默或共抑制现象。因此, 人们寻找更为有效的组织、器官特异性启动子代替组成型启动子, 以更好地调控植物基因表达。

组织特异性启动子 (Tissue-specific Promoter) 又称器官特异性启动子。在这类启动子调控下, 基因往往只在某些特定的器官或组织部位表达, 并表现出发育调节的特性。组织特异性启动子在转基因作物中应用越来越广泛。植物组织特异性启动子大致可以分为维管组织特异性、果实特异性、种子特异性、花器官特异性以及根、茎、叶特异性启动子等类型。例如豌豆的豆清蛋白 (Legumin) 基因启动子可在转化植物种子中特异性表达, 马铃薯块茎储藏蛋白 (Patatin) 基因启动子可在块茎中优势表达。

诱导型启动子 (Inducible Promoter) 是指在某些特定的物理或化学信号的刺激下, 可以大幅度地提高基因的转录水平的一类启动子。目前已经分离了光诱导表达基因启动子、热诱导表达基因启动子、创伤诱导表达基因启动子、真菌诱导表达基因启动子和共生细菌诱导表达基因启动子等。

(二) 目的基因

植物转基因技术应用的目的基因, 分别从微生物、植物、动物甚至人

类分离出来，目前国内外已经商业化的转基因作物所使用的外源基因已经超过 100 种。其中最常见的有抗虫基因和抗除草剂基因。

根据目的基因所赋予的转基因植物的性状分类，以减少投入，增加产量为目的的称为第一代转基因，如抗虫、耐除草剂转基因作物；以提高和改良作物品质为目的的称为第二代转基因；以医用或作为生物反应器为目的的则是第三代产品。

抗虫基因主要有两类。一类是毒蛋白基因，例如苏云金杆菌的 Bt 基因，它所表达的晶体蛋白对鳞翅目和鞘翅目昆虫有毒杀作用。毒蛋白在昆虫消化道内经过蛋白酶激活后造成消化道损伤而导致昆虫死亡，对其他生物则没有任何危害。另一类抗虫基因是蛋白酶抑制基因，它的产物能干扰害虫体内蛋白酶的活性，阻碍对食物的消化而使害虫致死，杀虫作用广泛。例如豇豆胰蛋白酶抑制剂基因（CPTI）。

抗除草剂基因至少有三类。第一类能改变植物酶对除草剂的敏感性。例如 *avoA* 的突变基因，它合成的 EPSP 酶的脯氨酸被丝氨酸所取代，酶的活力不受影响，但是对非选择性除草剂草甘膦的结合力只有原来的 25%，从而使植物对除草剂表现不敏感。第二类能解除除草剂对植物酶的抑制。例如 *Bar* 基因，能合成乙酰转移酶，解除选择性除草剂 PPT 对植物谷氨酰胺酶的抑制，避免植物细胞因为氨的积累而死亡。第三类能补偿被除草剂破坏的植物酶。例如经过修饰的 EPSP 酶基因，所表达的酶大幅度增加，以致草甘膦的浓度不足以破坏植物体内所有的 EPSP 酶，植物因此免于死亡。

植物转基因技术应用的目基因，此外还有固氮基因，有抗菌作用的几丁质酶基因和毒肽基因，与抗盐碱关系密切的脯氨酸基因，与雄性不育有关的核酸酶基因，与果实成熟有关的 ACC 合成酶基因，甚至人类的干扰素基因、生长激素基因等。

（三）终止子

终止子是指 DNA 分子中终止转录的核苷酸序列。而终止密码子 UAA、UGA、UAG 是作为翻译终止的信号。

目前转基因植物中常采用的终止子是胭脂碱合成酶基因的 NOS 终止子、

CaMV 35S 终止子和 Rubisco 小亚基基因的 3'端区域等。

(四) 边界区域

农杆菌介导的转化都利用一套类似的载体系统,在基因表达框的两端都有一段短的(约 25 bp)特异性重复序列,被称为左边界(Left Border, LB)和右边界(Right Border, RB)。这段序列是农杆菌编码的 Vir 蛋白内切酶复合体的识别序列,在 T-DNA 的切割、细胞间转运和宿主基因组上的整合等过程中起着至关重要的作用。

而在基因枪介导的转化中,特别是在线粒体等质体的转化中,为了将外源基因插入到基因组的特定位置,通常在外源基因阅读框的两侧区域插入 1~2 kb 的宿主内源序列。

二、转化系统

遗传转化的方法按其是否需要通过组织培养和植株再生分成两大类,第一类需要通过组织培养再生植株,常用的方法有农杆菌介导转化法、基因枪法;另一类方法不需要通过组织培养,目前,比较成熟的主要有花粉管通道法。

(一) 农杆菌介导转化法

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌,它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位,并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌中细胞中分别含有 Ti 质粒和 Ri 质粒,其上有一段 T-DNA,农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后,可将 T-DNA 插入到植物基因组中。因此,农杆菌是一种天然的植物遗传转化体系。人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区,借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合,然后通过细胞和组织培养技术,再生出转基因植株。

农杆菌介导法起初只被用于双子叶植物中,近年来,农杆菌介导转化在一些单子叶植物(尤其是水稻)中也得到了广泛应用。

（二）基因枪介导转化法

利用火药爆炸或高压气体加速（这一加速设备被称为基因枪），将包裹了带目的基因的 DNA 溶液的高速微弹直接送入完整的植物组织和细胞中，然后通过细胞和组织培养技术，再生出植株，选出其中转基因阳性植株即为转基因植株。与农杆菌转化相比，基因枪法转化的一个主要优点是不受受体植物范围的限制。而且其载体质粒的构建也相对简单，因此，也是目前转基因研究中应用较为广泛的一种方法。

（三）花粉管通道法

在授粉后向子房注射含目的基因的 DNA 溶液，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源 DNA 导入受精卵细胞，并进一步地被整合到受体细胞的基因组中，随着受精卵的发育而成为带转基因的新个体。该方法于 20 世纪 80 年代初期由我国学者周光宇提出，我国目前推广面积最大的转基因抗虫棉就是用花粉管通道法培育出来的。该法的最大优点是不依赖组织培养人工再生植株，技术简单，不需要装备精良的实验室，常规育种工作者易于掌握。

三、组培系统

（一）组织培养技术

一个成熟的植株再生的组织培养技术是进行植物遗传转化的先决条件。植物组织培养又叫离体培养，指从植物体分离出符合需要的组织、器官或细胞，原生质体等，通过无菌操作，在人工控制条件下进行培养以获得再生的完整植株，包括在培养过程中从各器官上产生愈伤组织的培养，愈伤组织再经过再分化形成再生植物。

植物组织培养一般分为培养基配制、接种、培养和驯化移栽等步骤。

（二）报告基因

报告基因（Reporter Gene）是一种编码可被检测的蛋白质或酶的基因，

也就是说,是一个表达产物非常容易被鉴定的基因。把它的编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因,或与其他目的基因相融合,在调控序列控制下进行表达,从而利用它的表达产物来标定目的基因的表达调控,筛选得到转化体。

作为报告基因,在遗传选择和筛选检测方面必须具有以下几个条件:①已被克隆和全序列已测定;②表达产物在受体细胞中不存在,即无背景,在宿主细胞中无相似的内源性表达产物;③其表达产物能进行定量测定。

在转基因植物中,已使用的报告基因有以下几种:胭脂碱合成酶基因(NOS)、章鱼碱合成酶基因(OCS)、新霉素磷酸转移酶基因(NPT II)、氯霉素乙酰转移酶基因(CAT)、庆大霉素转移酶基因、葡萄糖苷酶基因、荧光酶基因等。NOS、OCS这两个基因是致瘤土壤农杆菌(*Agrobacterium Tumefaciens*)的Ti质粒特有的,对Ti质粒进行改造,用相应的致瘤农杆菌转化植物体时,如果外源基因转入植物体中,则这两种报告基因在植物根茎叶中均能表达,不受发育调控,检测时直接用转化体提取液进行纸电泳,染色后在紫外光下观察荧光即可。NPT II、CAT及庆大霉素转移酶基因,均为抗生素筛选基因,相关的酶可以对底物进行修饰(磷酸化、乙酰化等),从而使这些抗生素失去对植物生长的抑制作用,使得含有这些抗性基因的转化体能在含这些抗生素的筛选培养基上正常生长,也可以用转化体提取液体,外用同位素标记,放射自显影筛选转化体。目前常用的一种报告基因是 β -D-葡萄糖苷酶基因,该酶催化底物形成 β -D-葡萄糖苷酸,它在植物体中几乎无背景,组织化学检测很稳定,可用分光光谱、荧光等进行检测。荧光酶基因(LUC)是1985年从北美萤火虫和叩头虫cDNA文库中克隆出来的,该酶在有ATP、 Mg^{2+} 、 O_2 和荧光素存在下发出荧光,这样就可利用转基因植物整株或部分直接用X-光片或专门仪器进行检测。

四、筛选系统

采用的筛选方法是根据所使用的报告基因或选择标记基因来确定的。当使用抗生素抗性基因作为选择基因时,筛选主要是在组织培养的过程中

加入特定的抗生素。而当采用的是报告基因时，筛选是通过不同的表型来区别的。

事实上，对转基因植株的筛选还应该考虑到筛选报告基因在转基因植株的整合和表达。通过抗生素筛选或表型筛选，那些发生了基因整合而又没有表达的转基因植株就会被筛选掉。这种现象被称为选择偏差。有研究表明，比较通过 PCR 鉴定和通过抗生素选择鉴定的拟南芥的转化体，PCR 鉴定含有抗生素标记基因的转基因转化体有超过 30% 是不表达的。

从分子水平对转化植株进行检测给判断目的基因是否转入带来了极大的便利。从 DNA 水平上主要采用的方法有 PCR 和 Southern 杂交。定性 PCR 的筛选方法是一种通过特异性的引物的扩增结果来判断一段特定序列是否存在的快速方法，而 Southern 杂交和定量 PCR 的方法则可以判断一个基因在转化的植株中存在多少个拷贝。ELISA 方法则是从蛋白水平上检测转化植株中特定外源蛋白是否存在。

第二节 转基因生物应用现状

农业是转基因技术应用最为广泛的领域。1994 年，首例转基因番茄“FLAVR SAVR”在美国批准商业化生产以来，越来越多的转基因植物被批准在不同国家和地区商业化种植，转基因技术在农业上的应用越来越广泛。据国际农业生物技术应用服务组织（International Service for Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA）统计，1996 年，全球转基因作物种植面积 of 170 公顷，2009 年达到 1.34 亿公顷，14 年间，转基因作物种植面积增长了 80 倍。

据 ISAAA 统计，2009 年，全球共有美国、巴西、印度、加拿大、中国、巴拉圭、南非、乌拉圭、玻利维亚、菲律宾、澳大利亚、墨西哥、西班牙、智利、哥伦比亚、洪都拉斯、布基纳法索、捷克、罗马尼亚、葡萄牙、德国、波兰、斯洛伐克、埃及等 25 个国家、1400 万农户种植了转基因作物，主要为转基因大豆、玉米、棉花和油菜。本节重点对转基因大豆、玉米、棉花、油菜和水稻作一简要介绍。

一、转基因大豆

转基因大豆是世界上商品化最早的转基因作物。1994 年, 美国孟山都 (Monsanto) 公司推出商品名为 Roundup Ready Soybean (简称 RR 大豆) 的转基因抗除草剂大豆, 成为最早获准推广的转基因大豆品种。2009 年, 全球转基因大豆种植面积占大豆总面积 9000 万公顷的 77%。

目前, 抗除草剂转基因大豆已经普遍用于商业化生产, 高油酸、高赖氨酸转基因大豆也已进入田间试验, 转基因大豆迅猛发展的势头不可逆转。我国转基因大豆研究尚在起步阶段, 基本处于安全性评价的中间试验和环境释放阶段。

二、转基因玉米

转基因玉米是世界上商业化应用最重要的转基因作物之一。1996 年, 美国先正达 (Syngenta) 公司研发的耐草甘膦除草剂转基因玉米实现商业化种植。2009 年, 全球转基因玉米种植面积占玉米总面积 1.58 亿公顷的 26%。

目前, 转基因玉米转化体涉及抗除草剂、抗虫性状、品质改良 (增加赖氨酸含量) 和用于生物燃料生产的转 α -淀粉酶等性状共 50 多个, 其中, 已商业化种植的主要为抗虫、耐除草剂转基因玉米及抗虫、耐除草剂等复合性状转基因玉米。我国是仅次于美国的世界第二大玉米生产国, 2009 年, 发放了植酸酶玉米转基因生物安全证书, 拥有我国自主知识产权的转基因玉米具备了商业化应用前提。

三、转基因棉花

转基因棉花是世界上商业化种植面积最大的转基因作物。1995 年, 美国首批发放了 NuCOTN33B 和 NuCOTN35B 两个转 Bt 基因抗虫棉新品种, 1996 年起在全球大面积商业化种植。2009 年, 全球转基因棉花种植面积占