

现代生物技术前沿

(美) J.A.托马斯 主编
R.L.富克斯
林忠平 译

(原书第三版)

生物技术与安全性评估



科学出版社
www.sciencep.com

现代生物技术前沿

(美) J.A.托马斯 主编
R.L.富克斯 译
林忠平

(原书第三版)

生物技术与安全性评估

科学出版社
北京

图字: 01-2004-3037 号

内 容 简 介

本书对生物技术的两个主要领域: 农业生物技术和医药生物技术进行了比较深入的论述。内容包括基因改造食品的安全评估、风险评估、环境影响和销售后监测, 在医药生物技术方面还涉及了干扰素、细胞因子和新研制疫苗的临床前安全评估, 此外, 本书还讨论了基因改造微生物在新食品生产中的作用, 列出了有关转基因作物的各种全球性管理问题。

本书适合分子遗传学、农学、微生物学和生物医学领域的学生和研究参考。

© 2002 by Elsevier Inc.

All rights reserved.

This edition of *Biotechnology and Safety Assessment* edited by John A. Thomas and Roy L. Fuchs is published by arrangement with *Elsevier Inc.*, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术与安全性评估 (原书第三版) / (美) 托马斯 (Thomas, J. A.) 等主编; 林忠平译. —北京: 科学出版社, 2007

(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-018129-9

I. 生… II. ①托… ②林… III. 生物技术-技术安全-评估 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 120093 号

责任编辑: 李 悦 沈晓晶/责任校对: 刘小梅

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 9 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2007 年 9 月第一次印刷 印张: 20

印数: 1—3 000 字数: 462 000

定价: 60.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

前 言

《生物技术与安全性评估》的第一版由 John A. Thomas 和 Laurie A. Myers 主编，1993 年出版，该书主要论述了初露端倪的分子生物学技术在重组 DNA 驱动的药物生产中的应用，同时也描述了检测此类药物临床前期安全性与功效的策略。此外，对于遗传修饰（GM）食品的转基因动物模型和安全性评估方法的进展也进行了描述。

《生物技术与安全性评估》的第二版由 John A. Thomas 于 1999 年完成，该书预见了在生物技术治疗与农业生物技术领域的各主题的发展。书中包括了反义疗法、胞浆内的分子修饰、干扰素的临床毒性和重组蛋白药理学等领域的最新进展。该版大大延伸到了农业生物技术的一些领域，包括风险和受益分析，对于环境的思考，还有食品与饲料安全性评估和遗传修饰（GM）与非遗传修饰（non-GM）食品中的过敏原问题。

第三版继续把重点集中到生物疗法与农业生物技术各领域的进展上。第三版较前两版更加全面，它提供了转基因作物与更具潜力的新型治疗药剂的安全性及商业化的重要全球前景。《生物技术与安全性评估》的第三版由 John A. Thomas 与 Roy L. Fuchs 主编，其中包括一些在分子遗传学、营养学、食品科学和安全/风险性评估领域全球知名的专家所撰写的章节。本版所包含的主题范围很广，并且把它们整合成一个个完整的章节，包括安全性检测、转基因植物的管理法规和进入市场后的监管。许多论题对于病毒学家、药理学家和营养学家是十分重要的，对转基因植物风险与效益评估、环境影响评估以及遗传修饰的药物、微生物和植物产品的安全性评估尤为重要。

最近的农业生物技术进展，由原来的对农作物基因做某种修饰以提高对昆虫、杂草与病害的控制，转向提高作物的营养特性。这些特性包括增加维生素与其他的微量营养元素或降低引起过敏的因素，以使食品更为安全。

这的确是食品技术的一场革命，这场革命将有助于养育 21 世纪新生的一代。总而言之，本书尤其有助于了解食品加工与发酵中所用的转基因药物的临床前安全检测，也有助于胞浆与其他药用蛋白的免疫毒理学检测程序的进行。本书深入讨论了环境、非靶标物种以及风险与效益这样一些主题，这使得它能够成为公共技术图书馆与医学中心图书馆中非常有价值的资源。同时，不论是分子遗传学、农学、微生物学的研究者，还是营养学领域的生物医学研究者，甚至寻求对生物技术领域快速发展有更好的理解的人以及希望进行健康咨询的人，都可以从本书获益。

编 者

目 录

前言

第一章 用植物生物技术减少食品中的过敏原：现状与未来潜能	1
引言	1
食品过敏原特性	2
减少过敏性的传统植物育种方法	3
应用遗传工程降低过敏潜能	4
转录后基因沉默	4
硫氧还蛋白减少二硫键	5
过敏原编码基因的修饰	5
结论	6
参考文献	6
第二章 植物生物技术培育的农作物的风险控制：生物安全性研究与市场化之后环境 监测的新经验	9
引言	9
目标和定义	10
制定规章方面	13
抗病毒甜菜的生物安全性研究	13
田间试验	13
基本资料：采用生物地理学资料做生物安全性研究的例子	16
对抗虫玉米的监控	18
参考文献	23
第三章 转基因微生物生产的食品 and 食品成分的现状和安全性评价	27
引言	27
rDNA 生产的食品 and 食品成分中的问题	31
安全性检测中的概念	39
法规要求	39
安全性评估的个案研究	46
结论	54
参考文献	55
第四章 当前及未来植物生物技术产品的食品安全性评估	58
引言	58
安全性评估与实质等同性范例	61
如何进行遗传修饰食物的食品安全性评估？	62

食物安全性评估的未来趋势	70
结论及对未来的展望	72
参考文献	73
第五章 直接有益于消费者的植物生物技术产品	76
引言	76
改善了的营养品质	77
改良的产品性状	83
结论	88
参考文献	89
第六章 来自生物技术作物的动物饲料：饲养场动物的品质及安全性	94
引言	94
美国供牲畜食用的作物	95
农场作物摄取和消化食物的特征	97
以生物技术作物为食的饲养场动物的品质、健康状况和养分利用	100
以生物技术作物为食的农场动物的肉、奶和蛋的组成	112
在动物产品中检测植物来源的蛋白质和 DNA	114
展望	117
参考文献	119
第七章 细胞因子疗法的临床前免疫毒理学评估	125
引言	125
细胞因子及其在健康与疾病中的作用	125
作为一种医疗模式的细胞因子活性调节	127
与细胞因子活性调节疗法有关的临床毒性	136
细胞因子疗法的临床前免疫毒理学评估	137
结论	143
参考文献	144
第八章 对生物技术改良过的作物的生态评价	153
引言	153
术语	154
生态风险评估原则	155
遗传修饰植物的生态风险评估原则	158
结语	164
参考文献	164
第九章 核酶技术与药物开发	167
作为特异性基因表达抑制剂的核酶类反义寡核苷酸	167
基于 RNA 的核酶	169
有催化活性的 DNA	174

用于治疗有催化活性的寡核苷酸·····	174
核酶传送、药物动力学与代谢·····	177
展望·····	179
致谢·····	180
参考文献·····	180
第十章 生物治疗：目前状况与未来方向·····	186
引言·····	186
重组蛋白：被批准于临床应用·····	187
干扰素 α (IFN- α) ·····	189
临床发展中的重组蛋白·····	192
自然的生物学反应修饰·····	199
化学定义上的生物反应修饰·····	200
化疗、免疫治疗和细胞治疗的结合·····	202
结论·····	204
参考文献·····	205
第十一章 植物生物技术产品的食物致敏性评估·····	217
食物过敏与过敏原介绍·····	217
外源蛋白：过敏性评估的理由·····	220
在基因发现过程中的过敏性评估·····	220
树状决策方法：2001 年 FAO/WHO 的决策图表·····	221
过敏原性评估的应用例子·····	226
结论·····	228
参考文献·····	228
第十二章 生物技术：生物制药产品与生物技术农产品的安全性评估·····	231
引言·····	231
生物制药产品·····	235
新生物学·····	237
农业生物技术·····	245
总结·····	254
参考文献·····	254
第十三章 植物生物技术对发展中国家的潜在作用·····	257
引言·····	257
非洲农业·····	258
非洲的农作物及问题·····	259
非洲所需的疫苗·····	260
南非的遗传修饰作物·····	260
发展中国家的遗传修饰作物·····	261

反遗传修饰生物行动与发展中国家的关系·····	262
未来发展方向·····	263
结论·····	264
参考文献·····	264
第十四章 临床使用前期的疫苗安全性评估·····	265
引言·····	265
规章体系·····	267
建议研究项目的概要·····	269
结论·····	273
参考文献·····	273
第十五章 转基因植物的基因漂移·····	276
引言·····	276
最初杂种形成·····	277
结论·····	287
参考文献·····	287
第十六章 抗虫棉的安全性评估·····	291
引言·····	291
保铃棉的分子特征·····	293
保铃棉植株中 Cry1Ac 蛋白和 NPT II 蛋白的水平 ·····	294
保铃棉中 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白的安全性检测 ·····	296
保铃棉的组分分析和营养评价·····	299
水平的基因转移和标记基因的评估·····	304
环境评价·····	306
结论·····	308
致谢·····	308
参考文献·····	308

第一章 用植物生物技术减少食品中的过敏原： 现状与未来潜能

伽雷·A.巴伦

阿肯色大学医学院，生物化学与分子生物学系

小石城，阿肯色州

食品过敏反应影响了6%~8%的儿童和1%~2%的成年人的健康。食用特殊作物食品而发生的IgE介导的突发反应正在增加，尤其是在发展中国家。这可能要归因于日益增加的蛋白质消费。许多引发过敏的蛋白质来源于植物性的食物，包括花生、大豆、小麦和坚果类。许多很典型的过敏反应已经发现是由在食物中含量丰富的已知蛋白质所引起的。过敏反应的日益流行和伴随发生的一些严重的临床症状，迫使科学家去探究减少作物中过敏原的方法。本章探究了用传统育种方法与遗传工程的方法减少作为食物作物的植物引起的过敏反应的可能性。

引 言

20年前，农作物产量和品质的提高还是个需要反复试验的过程。有时候甚至需要花很多年的时间才能确定一个新的杂交种的某个理想性状是否稳定。作物的改良有赖于植物中天然存在的遗传多样性，或者依赖于我们借助化学诱变或辐射诱变的方法创造遗传多样性的能力，当然，那些可能提高作物生产潜力的表型特征也需要我们付出努力去加以鉴定。一旦某种理想的表型品质得以确认，随后还要进行繁重的杂交与回交工作，目的是将任何对这一性状负责的遗传物质转入到新的杂种中去，而将其他不理想的特征排除在外。这一方法有明显的局限性，首先要有一个自然变异的过程以产生所需的表型，或者要经过突变或其他方法创造所需的表型，但这种杂种产生的过程是十分耗时和费力的。尽管传统的育种过程有这么多的局限性，但作物学家与遗传学家还是能够把大多作物的产量提高数倍，供养着持续增长的世界人口。

随着分子生物学与生物技术的出现，不但鉴定理想的表型特性成为可能，而且还能够鉴定对这一遗传特性负责的准确的遗传物质。重组DNA与植物转化技术使得替换单个植物组分（脂肪、碳水化合物与蛋白质）成为可能，超越了那些通过传统的育种方法能够实现的范围。大多数植物生物技术项目的推出注定要提高或者降低植物中发现的变异天然组分的水平，或者是把原本不存在的组分导入植物中去。马铃薯中淀粉含量的改变可作为生物技术工程化作物中天然组分含量被提高的一个例子。依据不同的植物来源，淀粉主要由三种成分组成：大分子直链淀粉、复杂的支链淀粉和较小的直链淀粉（Bab *et al.*, 1984）。正如人们所知，淀粉的生物合成途径是非常复杂的，产生最终产物

的过程中包括许多酶的参与。然而，ADPG 焦磷酸化酶基因的产物（Smith 等在 1995 年做过相关的评述），似乎控制了淀粉生物合成途径的全过程。在这个例子中，Stark 等（1992）用来自大肠杆菌的无反作用抑制的 ADPG 焦磷酸化酶基因使马铃薯中的淀粉含量增加。

因含有一个在植物中非天然存在的成分而与众不同的生物技术工程化作物的例子就是“金色水稻”。这一利用生物技术获得的水稻品系得以发展，主要是为了解决维生素 A 缺乏的问题。缺乏维生素 A 是造成发展中国家儿童严重的视觉缺陷与失明的首要原因。在这一水稻品系中，编码 β -胡萝卜素产物（也就是维生素 A 的前体）所必需的蛋白质基因被导入到其基因组中。基因在水稻中的成功整合与表达致使水稻产生出金黄色的米粒，这种颜色表明种子中有 β -胡萝卜素的存在（Friedrich, 1999）。基因的导入同时也增加了铁的水平与其生物可利用性，铁是另一种重要的营养元素。

研究的目的除了增加食品作物中的营养品质外，大量的工作定位在提高作物对害虫侵袭的抵抗力上。利用细菌（*Bacillus thuringiensis*）晶体蛋白（Bt-Cry）进行的基因转入产生了对一些鳞翅目的昆虫有抗性的基因。表达杀虫性的 Bt-Cry 蛋白的载体已成功转入到花椰菜、玉米和番茄等各种作物中，而作物主要营养与未知的代谢物的全面组成（或称 N-多糖）并没有明显的变化。

这个过程认识到修改植物的基因组以使改变食品致过敏能力的可能性得以实现是很重要的。这一过程可以通过提高现存引发过敏的蛋白质的过敏能力来实现，或者是通过导入全新的具有食品过敏特性的蛋白质来实现。研究方法与安全评估途径都得以发展和应用以实现这些构想（Taylor and Hefle, 本书第 11 章）。然而，生物技术也可以用来直接减少已知过敏原的含量或者降低它们的致敏性。本章重点讨论已经用来减少一些主要作物中潜在的食物过敏性的方法。

食品过敏原特性

在讨论减少食品过敏潜能的各种方法之前，有必要提及作为典型过敏原的食品的成分。在列举的 17 类不同的食品中大约有 26 种已被鉴定的过敏原（IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, 1997）。通过对这些数量有限的过敏原进行生物化学分析，发现其中大多数过敏原有一些共同的特性，诚然，并非所有的过敏原都有这些特性。例如，食品过敏原都是典型的分子质量小的糖基化的蛋白质，它们在食品中含量相对较丰富。另外，它们都有酸性等电点，还有多种形式的与 IgE 结合的线性抗原决定簇，并且对变性和降解的因素均有抵抗力（Stanley *et al.*, 1999）。出于多方面的原因，这些特性使蛋白质具有致敏性。人们认为食品过敏原的分子质量与糖基化模式促进其通过肠黏膜，使其得以进入免疫系统激活 Th₂ 型细胞（产生 IgE 的细胞）。大部分食物过敏原在食物中占有的比例较高，这使得免疫系统有更多的机会与这些过敏原蛋白结合，而那些消化过程中含量很低的蛋白质与免疫系统起作用的概率较小。一些食品过敏原具酸性等电点，使其在胃部低 pH 条件下发生沉淀，延长食物在胃肠道中的运输时间。过敏原的一个很重要的特性是对变性和降解的抗性，因为一个蛋白质的重要部分越长时间保持完整，它就越有可能诱发免疫反应。最后，大多数食品过敏原具有多种形式的、与 IgE 结

合的线性抗原决定簇，这样，即使部分被降解或者被消化，它们仍然能够与 IgE 发生相互作用并且诱发过敏反应 (Maleki *et al.*, 2000)。

具有这些特性的一个典型的食品过敏原的例子是花生过敏原 *Ara h 2*。这种过敏原只有 17kDa，却占花生总蛋白含量的 4%。而且超过 95% 花生过敏患者体内的 IgE 均可识别这种过敏原 (Burks *et al.*, 1992)。另外，*Ara h 2* 是糖基化的，含有一个带有 β -1, 3-木糖残基的高甘露糖侧链。这个过敏原有一个酸性等电点 ($pI=4.5$)，能抵抗胃肠道中存在的一些酶的降解和消化，而且它含有至少 10 个线性的 IgE 结合抗原决定基 (Astwood *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1997)。

尽管大多数食品过敏原都有这些特性，但也有一些明显的例外，比如主要的马铃薯蛋白 Patatin 的过敏原 (*Sol t I*)。这是由 IgE 从对马铃薯过敏的患者中鉴定出来的主要过敏原。对马铃薯过敏的情况十分稀少，而且那些过敏者的过敏反应也不是很严重。Patatin 占马铃薯总蛋白的 40%，含有多种线性的 IgE 结合位点。它是部分糖基化的，但是糖基化侧链的类型还未见报道。尽管 Patatin 拥有这些过敏原特性，但有个显著的不同就是它对人体胃肠道内常见的酶具不稳定性 (Seppala *et al.*, 1999; Astwood *et al.*, 2000a)。

另外一种过敏原是小麦中的过敏原 γ -硫基蛋白 (γ -thionin)，它不同于一般的过敏原。在这个例子中，该过敏原对胃肠道中的蛋白酶具有抗性，但它却只占小麦总蛋白的 0.02% (Astwood *et al.*, 2000b)。上述例子说明仅仅依据我们现在对蛋白特性的了解来预测某一蛋白质是否具有成为过敏原的可能性是有困难的。

减少过敏性的传统植物育种方法

传统的植物育种方法可以用于解决各种作物致敏性的问题，其原理是利用大多数植物物种中发生的蛋白表达水平上固有的多样性。这种方法要求有一种方式检测食品源和作物不同种间遗传物质中所含的过敏原。典型的检测过敏原的方法包括用超敏性的患者的血清 IgE 对可疑食品进行致敏性鉴定，或者采用已知的特异性过敏原的单克隆或多克隆抗体做致敏检验。无论是用血浆 IgE 还是用过敏原特异性抗体，目的都是想研制一个半定量实验方法以估计各种食品作物的蛋白质中过敏原的数量。现行食物产品来源的一种或几种作物品种为标准，其他品种和它们相比较以寻找那些含有较少量的 IgE 结合蛋白或者特异性过敏原的物种。一旦鉴定出这种含有过敏蛋白的物种，它就可以被用于传统育种方法以产生一个超敏作物品种。另外，化学与放射诱变也能用于产生降低了单种或多种过敏原水平的植物。

这一策略已经用于花生的栽培变种。花生过敏只影响到大约 0.6% 的人群，被认为是最严重的食品过敏反应之一 (Sicherer *et al.*, 1998)。主要的花生过敏原已经得到鉴定，大量的过敏原特异性抗体也可用于定量估计总过敏原的含量 (Burks *et al.*, 1991, 1992; Eigenmann *et al.*, 1996)。来自佐治亚大学、美国农业部、亚拉巴马 A&M 大学与得克萨斯 A&M 大学的调查团开始鉴定这些花生品种，因为它们显示的 IgE 结合蛋白含量大大低于当前生产品种的含量 (过敏原论坛，弗吉尼亚州，费尔法克斯, 2001 年 8 月)。这些结果确信不同的品种可能表达不同量的引发过敏的蛋白质，同时说明这种

方式可能成功产生含低水平过敏原的花生品种。然而，这种方法还要克服很多障碍才能完全得以实现。大多数在农业上重要的食品作物都经过数代的筛选才成为具有特定特性的品种，这些特性包括生长率、产量和遗传稳定性。任何最终经过鉴定的作物品种都必须符合农艺与食品加工标准，这些标准对作物本身是相当重要的。

应用遗传工程降低过敏潜能

遗传工程可以通过转录后基因沉默来降低已知过敏原的水平，或者通过硫氧还原蛋白（thioredoxin）的结合来减少关键的二硫键，或者直接修饰编码过敏原的基因。下面讨论的就是这些例子。

转录后基因沉默

转录后的基因沉默是一个靶向机制，已经成功用于降低食品作物中的特定植物蛋白的水平，包括那些有过敏潜能的蛋白质。通常，这一机制能抑制基因特异性 mRNA 的积累，使其不能被翻译成蛋白质，从而减少了这类蛋白的数量（Baulcombe, 1996）。通过这种机制对基因表达进行调节是细菌（Mizuno *et al.*, 1984）与一些真核细胞（Dolnick, 1997）中常见的现象。然而，对这一机制的工作方式还有所争论，所有这些模式都要求产生与目标蛋白的 RNA 的产物方向相反的 RNA，即需要反义 RNA。这样一个反义 RNA 可以直接由外源基因转录产生，或者由已作了某种改造的正义基因产生（Baulcombe, 1996）。

反义 RNA 技术已经成功地用于降低水稻中潜在的致敏性。大多数水稻过敏原都是在水稻种子的球蛋白部分（Shibasaki *et al.*, 1979）。据估计，球蛋白与白蛋白占水稻种子总蛋白的 80%~90%（Cagampang *et al.*, 1966）。已从中鉴定出了一种 16kDa 的 α -淀粉酶/胰酶抑制剂样蛋白质，该蛋白是水稻引发超敏反应中的主要过敏原（Matsuda *et al.*, 1988, 1991; Nakase *et al.*, 1996）。Nakamura 等（1996）利用反义 RNA 技术培育出几个反义 RNA 的转基因水稻品系，它能产生作用于 16kDa 水稻过敏原，成功地把水稻中的过敏原含量降低了 80%，并且没有改变种子的其他主要储藏蛋白的数量。

利用转录后的基因沉默方法降低过敏性有几个优点。这些优点包括：该方法指标的靶向性以及应用这一技术只需要较少的过敏原信息量。然而，正如 Nakamura 等（1996）观察到的，该方法对于过敏原数量的减少在不同的物种间差异较大，即使是在同一个转化株上也是这样，这表明该方法得到的结果可能会不很一致。而且，该方法难以完全删除过敏原，尤其是像来自花生的 *Ara h 2* 这样的潜在过敏原。而为了食品安全起见，对于有较强过敏反应的患者，要求把过敏原完全删除。另外，对于有多个重要过敏原的食品作物很难应用这一技术。

硫氧还蛋白减少二硫键

硫氧还蛋白是 12kDa 蛋白的一个家族的代表,它通过催化活性二硫键位点发生可逆的氧化还原反应 (Buchanan, 1991; Buchanan *et al.*, 1994; Williams, 1995; Holmgren, 2000a, b), 还可以减少多种蛋白质分子内二硫键。这些蛋白中有许多被认为是过敏原 (Gomez *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1991; Teuber *et al.*, 1998)。这是具有普遍性的蛋白质的生物学活性,加之观察到许多食品过敏原都含有分子内二硫键,所以这些二硫键与蛋白的致敏性之间有重要的相关性 (Lehrer *et al.*, 1996)。用硫氧还蛋白可降低一些食品潜在的致敏性。

这一看法通过 Buchanan 和他的同事对小麦和牛奶中的过敏原进行检测得到了证实,他们从致敏的狗身上发现过敏症状明显减轻 (Buchanan *et al.*, 1997; del Val *et al.*, 1997)。简单地说,作者使纯化的过敏原或来自含有过敏原的食品中的提取物与从大肠杆菌中纯化的硫氧还蛋白相混,而后进行皮试,并对致敏犬的胃和肠的症状进行验证。含有硫氧还蛋白的提取物减少了过敏原中的二硫键,从而大大减轻了皮肤反应和胃肠道的症状。这些结果为硫氧还蛋白的应用提供了一个很重要的证据。有了这些证据,才能培育过量硫氧还蛋白的转基因小麦品系。

使用硫氧还蛋白降低致敏性的优点在于它是可以普遍应用的方法,对于减小那些过敏原活性依赖于二硫键的任何食品作物的过敏性都是有用的。然而该方法可能有局限性,尤其是对没有完整的二硫键的过敏原,其 IgE 结合抗原决定簇仍能够诱发过敏反应。

过敏原编码基因的修饰

减小食品作物过敏性的最有前景的方法之一就是通过修饰编码过敏原的基因,以使其表达的蛋白失去致敏性。这一方法的依据是发现大多数食品过敏原都有结合 IgE 的线性过敏原决定簇。而 these 与 IgE 结合的过敏原决定簇可以通过这样的方法加以确定:即在整个氨基酸顺序中逐一替代其多肽的片段,找到与 IgE 血清起反应的位置。一旦 IgE 结合的过敏原决定簇得到确认,对于与 IgE 结合起关键作用的氨基酸也可以被鉴定出来。当这个氨基酸用另外一种氨基酸替代的时候,将导致 IgE 不能与该蛋白质结合,而其主要的生物学功能并不因此而改变。任何致使 IgE 结合失败的改变都可以通过基因的定点突变来实现。

来自对花生过敏患者的免疫血清 IgE 和替代部分片段的多肽已被用于鉴定主要的花生过敏原 (Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3) 的与 IgE 结合的过敏原决定簇。至少有 23 种定位于 Ara h 1 全长分子上的不同线性 IgE 结合过敏决定簇已被鉴定出来 (Burks *et al.*, 1997)。与此相似有 10 种和 4 种 IgE 结合的过敏原决定簇分别从 Ara h 2 和 Ara h 3 中被鉴定出来 (Stanley *et al.*, 1997; Rabjohn *et al.*, 1998)。对每个 IgE 结合的过敏原决定簇的突变分析表明:这些多肽中单个氨基酸的改变都会对 IgE 结合特性产生巨大的影响。替换其中的一个氨基酸就会导致 IgE 不能与之结合 (Stanley *et al.*, 1997; Shin

et al., 1998; Rabjohn *et al.*,)。对影响与 IgE 结合的过敏原决定簇内的氨基酸的位置与类型进行了分析, 结果表明: 在过敏原决定簇中部的疏水残基的替换更易于导致 IgE 结合功能的丢失 (Shin *et al.*, 1998)。编码这些过敏原的 cDNA 的定点突变被用于改变每一个 IgE 结合的过敏原决定簇内的单个氨基酸。这些低致敏性的蛋白质可从大肠杆菌中产生, 并且对其结合来自花生过敏患者的 IgE 的能力进行了检测。野生型过敏原与替代了一个氨基酸的过敏原两者相比时发现, 经过修饰的过敏原其 IgE 结合能力大大减小了 (Bannon *et al.*, 2001)。

即使上述结果令人鼓舞, 但其实际应用仍有许多障碍要克服。例如, 即使用当今的技术可以毫不费力地把修饰过的基因再转入到植物的基因组中, 却不可能使野生型基因完全失去作用。而野生型基因完全失去作用却是该技术得到利用的前提。另外, 结合 IgE 的过敏原的减少必须在临床上得到验证, 才有助于减轻患者对那些过敏原或者对于该食品的过敏反应。因此, 发表任何针对植物品种或者食品的低过敏性声明之前都要进行人体研究。

结 论

在未来的 25 年中, 世界人口可能增加 25 亿。随之而来的是到 2025 年人口食物需求将增加 1 倍。与此相反, 谷物产量的年增长率却一直在下降, 以至于产量的年增长率低于人口的年增长率 (Somerville *et al.*, 2001)。为了养活未来的人群, 作物产量必须提高, 而作物产量的提高在一定程度上有赖于作物遗传工程。另外, 食品过敏的影响表现出增长的趋势, 尤其是在发达国家 (Taylor *et al.*, 1987; Sicherer *et al.*, 1998)。这两个现象集中到一起, 就要求我们继续研究新的方法以通过生物技术来降低食品作物的潜在的过敏性。为减小过敏性而对谷物中主要蛋白进行的任何修饰都必须受到检测, 以确定是否对原来的过敏患者的过敏反应有所减少以及是否会出现新的过敏者。另外, 获得的遗传修饰谷物必须进行在加工情况下研究其功能属性, 以确定这种修饰是否改变了产品的任何食物特性。

参 考 文 献

- Astwood, J. D., Leach, J. N., and Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1269–1274.
- Astwood, J. D., Alibhai, M., Lee, T., Fuchs, R., and Sampson, H. (2000a). Identification and characterization of IgE binding epitopes of patatin, a major food allergen of potato. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 555a.
- Astwood, J. D., Tran, K., Liang, J., Goodman, R., and Sampson, H. (2000b). Digestibility and allergenicity of gamma-thionin from wheat flour. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 419a.
- Baba, T., and Arai, Y. (1984). Structural characterization of amylopectin and intermediate material in amylo maize starch granules. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1763–1775.
- Bannon, G. A., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C. M., Helm, R., Stanley, J. S., King, N., Rabjohn, P., Sampson, H. A., and Burks, A. W. (2001). Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **124**, 70–72.
- Baulcombe, D. C. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing

- in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 79–88.
- Buchanan, B. B. (1991). Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 1–9.
- Buchanan, B. B., Schurmann, P., Decottignies, P., and Lozano, R. M. (1994). Thioredoxin: A multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 257–260.
- Buchanan, B., Adamidi, C., Lozano, R. M., Yee, B. C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., and Frick, O. L. (1997). Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **94**, 5372–5377.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., and O'Brien, T. (1991). Identification of a major peanut allergen, *Ara h* I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172–179.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. J., and Helm, R. M. (1992). Identification and characterization of a second major peanut allergen, *Ara h* II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 962–969.
- Burks, A. W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J. S., Helm, R. M., and Bannon, G. A. (1997). Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on *Ara h* 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 334–339.
- Cagampang, G. B., Cruz, L. J., Espiritu, G., Santiago, R. G., and Juliano, B. O. (1966). *Cereal Chem.*, **43**, 145–155.
- de Val, G., Yee, B. C., Lozano, R. M., Buchanan, B., Ermel, R. W., Lee, Y.-M., and Frick, O. L. (1999). Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 690–697.
- Dolnick, B. J. (1997). Naturally occurring antisense RNA. *Pharmacol. Ther.*, **75**, 179–184.
- Eigenmann, P. A., Burks, A. W., Bannon, G. A., and Sampson, H. A. (1996). Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 969–978.
- Friedrich, M. J. (1999). Genetically enhanced rice to help fight malnutrition. *JAMA*, **282**, 1508–1509.
- Gomez, L., Martin, E., Hernandez, D., Sanchez-Monge, R., Barber, D., del Pozo, V., de Andres, B., Armentia, A., Lahoz, C., and Salcedo, G. (1990). Members of the alpha-amylase inhibitor family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett.*, **261**, 85–88.
- Holmgren, A. (2000a). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants Redox Signaling*, **2**, 811–820.
- Holmgren, A. (2000b). Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biofactors*, **11**, 63–64.
- IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Official List of Allergens*. (1997). International Union of Immunological Societies, San Francisco.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., and Reese, G. (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 553–564.
- Maleki, S. J., Kopper, R. A., Shin, D. S., Park, C. W., Compadre, C. M., Sampson, H., Burks, A. W., and Bannon, G. A. (2000). Structure of the major peanut allergen *Ara h* 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.*, **164**, 5844–5849.
- Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R., and Torii, S. (1988). Purification and properties of an allergenic protein in rice grains. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1465–1470.
- Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M., and Nakamura, R. (1991). Immunochemical studies on rice allergenic proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 509–513.
- Mizuno, T., Chou, M., and Inoue, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**, 1966–1970.

- Nakamura, R., and Matsuda, T. (1996). Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1215–1221.
- Nakase, M., Alvarez, A. M., Adachi, T., Aoki, N., Nakamura, R., and Matsuda, T. (1996). Immunochemical and biochemical identification of the rice seed protein encoded by cDNA clone A3-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1031–1042.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Okajima, H., Nishikawa, K., and Sasaoka K. (1991). Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 555–565.
- Rabjohn, P., Helm, E. M., Stanley, J. S., West, C. M., Sampson, H. A., Burks, A. W., and Bannon, G. A. (1999). Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen *Ara h* 3. *J. Clin. Invest.*, **103**, 535–542.
- Seppala, U., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T., Palosuo, T., and Kalkkinen, N. (1999). Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 165–171.
- Shibasaki, M., Suzuki, S., Nemoto, H., and Kuroume, T. (1979). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **64**, 259–265.
- Shin, D. S., Compadre, C. M., Maleki, S. J., Kopper, R. A., Sampson, H., Huang, S. K., Burks, A. W. and Bannon, G. A. (1998). Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on *Ara h*, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13753–13759.
- Sicherer, S. H., Burks, A. W., and Sampson, H. A. (1998). Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*, **102**(1), e6.
- Simons, R. W. (1988). Naturally occurring antisense RNA control—A brief review. *Gene*, **72**, 35–44.
- Smith, A. M., Denyer, K., and Martin, C. R. (1995). What controls the amount and structure of starch in storage organs? *Plant Physiol.*, **107**, 673–677.
- Somerville, C., and Briscoe, J. (2001). Genetic engineering and water. *Science*, **292**, 2217.
- Stanley, J. S., and Bannon, G. A. (1999). Biochemistry of food allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **17**, 279–291.
- Stanley, J. S., King, N., Burks, A. W., Huang, S. K., Sampson, H., Cockrell, G., Helm, R. M., West, C. M., and Bannon, G. A. (1997). Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen *Ara h* 2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 244–253.
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J., and Kishore, G. M. (1992). Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, **258**, 287–292.
- Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Jr., Bush, R. K., and Busse, W. W. (1987). Chemistry of food allergens, in *Food Allergy*, R. K. Chandra, ed, St John's, Newfoundland, Nutrition Research Education Foundation, pp. 21–44.
- Teuber, S. S., Dandekar, A. M., Peterson, W. R., and Sellers, C. L. (1998). Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 807–814.
- Williams, C. H., Jr. (1995). Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J.*, **9**, 1267–1276.

第二章 植物生物技术培育的农作物的风险控制： 生物安全性研究与市场化之后环境监测的新经验

D. 巴茨

德国亚琛技术大学

德国

G. 斯密茨

德国康斯坦茨大学植物园

德国

科学研究的发展方向是更好地理解遗传修饰植物 (genetically modified plant, GMP) 的安全性问题。GMP 生命周期中的细节得到研究之后, 其安全性问题会得到全面的认识。“生物安全性研究”这个术语是指在商业化之前的研究。而我们说的监测是指有了市场产品之后, 要判定它是否与以前注册的产品是等值的。本章叙述我们在两个方面的最新工作。一方面介绍我们对生物安全性研究的一种设计, 用以评估抗病毒侵袭的糖用甜菜的安全性问题。由于危险性起因于基因漂移 (gene flow) 可能产生某种有害的杂草, 因此我们的工作重点是在评估异交事件的发生情况及可能带来的影响。因为栽培甜菜和它的野生近缘种 (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) 之间可能产生基因漂移, 我们要了解野生近缘物种是否也会出现抗病毒的特征。另一项工作是德国的抗虫玉米, 我们设计一种方法用于评价 Bt 玉米对非靶标昆虫有何潜在影响。监测可以为多种目的服务, 其中一种就是确认安全性研究的结果。因为生物安全研究和监测在时间、经费和所用资源上是紧密相关的, 我们主张通过对 GMP 的科学实验, 全力发展一种审慎的、阶梯式的方法来处理那些被定义为生态“危险因子” (riskier) 的有机物。

引 言

评价一种新的技术是否影响人类、动物的健康以及环境安全应有一个科学的标准。由于危险性由两个方面的因素组成, 即危险出现的频度和损害程度, 科学一致性要求风险研究应以一种新技术同时评估风险频度和潜在危害两个方面。我们集中在两个方面研究遗传修饰的植物: 商业化前的安全性研究和商业化之后的监测。而且我们将安全性研究集中在理解基因漂移的潜在负面作用上, 而非基因漂移的频度。最近, 我们开始了针对规范的产品的生物安全性研究而设计的监测研究。而这种生物安全性研究是用来管理那些通过欧盟指示 90/220 (现为 2001/18) 程序已被批准商业化的产品的。在传统的生物安全评价体系中, 生物安全研究应作为监测工作的补充。

GMP 生物安全性和监测的相关文献资料的全面概述集中体现了我们关于生物安全的现有知识。遗传工程和生物技术国际中心 (ICGEB) 支持着这个最大的关于生物安全的资料库。它有一个网站 <http://www.icgeb.trieste.it/~bsafesrv/>, 其中有关的转基因生物安全资料在 1990~2000 年的 10 年间超过了 2600 份。大量的资料记录了有关