



转基因作物

OECD共识文件

(卷二)

经济合作与发展组织 (OECD)
农业部科技发展中心 编译



 中国农业出版社

转基因作物 OECD 共识文件

(卷二)

经济合作与发展组织(OECD)

农业部科技发展中心 编译

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

转基因作物 OECD 共识文件. 2/经济合作与发展组织 (OECD), 农业部科技发展中心编译. —北京: 中国农业出版社, 2011. 12

ISBN 978-7-109-16254-9

I. ①转… II. ①经…②农… III. ①基因转移—作物—安全性—文件 IV. ①S336

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 231557 号

© 2011 Development Centre for Science and Technology, Ministry of Agriculture for this Chinese edition. Published by arrangement with the OECD, Paris. The quality of the Chinese translation and its coherence with the original text is the responsibility of Development Centre for Science and Technology, Ministry of Agriculture.

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 闫保荣

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 17.25

字数: 400 千字

定价: 45.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

《转基因作物 OECD 共识文件（卷二）》

编译委员会

主 任 杨雄年

副主任 叶纪明 周云龙

委 员 李 宁 段留生 翟 勇 宋贵文 汪其怀

付仲文 刘培磊 刘 刚

编 译 组

主 编 李 宁 刘培磊

副主编 徐琳杰 陈 琰 刘 刚

编 译 （按姓名笔画排序）

王赞文 卢孟柱 付仲文 朱永红

任海丽 刘 刚 刘培磊 孙卓婧

李 宁 杨汉春 杨佑明 张英俊

陈 琰 武国干 范在丰 林文力

赵永国 柳 俊 姜 斌 徐琳杰

黄昆仑 焦 悦 解超杰 熊 鹏

前言

转基因是一项新技术，也是一个新产业，具有广阔的发展前景。2014 年全球转基因作物的种植面积为 1.8 亿公顷，与产业化应用之初的 1996 年相比增长了 100 多倍。世界许多国家都把转基因技术作为支撑植物育种和增强国家竞争力的战略重点。同时，转基因是一个新生事物，自诞生以来争论就从未间断过。社会对转基因技术有争论、有疑虑是正常的，科学从来都是在论争中进步的，关键是让转基因论争回归科学的轨道。科学家和科学家的辩论对手应该用专业的知识去传播科学和理性的精髓，让科学获得最广泛公众的理解和支持。

经济合作与发展组织（OECD）第一个提出了转基因技术风险评估的概念，并长期致力于转基因生物风险评估信息的共享。OECD 发布的《重组 DNA 安全性考虑》和《生物技术安全性考虑》，提出了转基因生物安全的概念和操作原则，是转基因技术在工业、农业和环境领域应用的安全指南。OECD 出版的转基因生物安全共识文件对安全评价的核心问题进行了系统总结。通过转基因生物环境安全评价、食品（饲料）安全评价核心信息的比较分析，推动科学共识和信息共享，为转基因生物风险管理和风险交流提供科学基础。

农业部科技发展中心是国家农业转基因生物安全委员会和全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会秘书处的承担单位，长期从事农业转基因生物安全评价和监督管理工作。在 OECD 授权下，农业部科技发展中心于 2010 年组织编译出版了 OECD 共识文件系列丛书第一部。书籍出版后，受到了转基因生物研发人、监管人及相关从业人员的好评。这促使我们尽快组织第二部的编译工作，用科学信息引导转基因认知回归科学和理性。本书主要编译了转基因植物分子特征、抗病毒作物、抗草甘膦作物、抗草铵膦作物，以及马铃薯、番木瓜、杨树、苜蓿等作物的共识文件。同时，本书在附录中

列出了《重组 DNA 安全性考虑》和《生物技术安全性考虑》两个技术指南，帮助读者用最初的科学考虑去思考转基因生物的安全性。由于知识的更新，共识文件可能会在将来更新，鼓励用户跟踪最新版本，共识文件英文版可在 OECD 网页 (<http://www.oecd.org/biotrack>) 免费获取。

最后，衷心感谢中国农业大学和河北农业大学的老师和研究生对本书编译给予的大力支持和帮助。

编者

2015 年 1 月

目 录

oooooooooooooooooooooooooooo

前言

第一章	转基因植物分子特征共识文件	1
第二章	通过衣壳蛋白基因介导的抗病毒作物生物安全信息的共识文件	12
第三章	抗草甘膦基因及其酶的一般信息共识文件	36
第四章	抗草铵膦基因及其酶的一般信息共识文件	43
第五章	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> Subsp. <i>tuberosum</i> 生物学特性的共识文件	52
第六章	番木瓜 (<i>Carica Papaya</i>) 生物学特性的共识文件	70
第七章	杨属 <i>Populus</i> L. (杨树) 生物学特性的共识文件	117
第八章	马铃薯新品种成分的共识文件：食品和饲料的关键营养素、抗营养成分和毒素	149
第九章	苜蓿和其他温带豆科牧草新品种成分的共识文件：食品和饲料的关键营养素、抗营养成分以及植物次生代谢物	160
附录 1	重组 DNA 安全性考虑	195
附录 2	生物技术安全性考虑	244

第一章

转基因植物分子特征共识文件*

第一节 背景

1. 分子特征和安全评价

分子特征是建立在科学基础上的一种综合学科研究方法，该方法可用于转基因植物的食品、饲料和环境安全评价。分子特征能使人们理解转基因植物中导入并表达的遗传物质。本文件旨在解释将分子特征应用于转基因植物食品、饲料和环境安全评价的科学基础。

本文件旨在使安全评价人员了解如何应用分子特征数据和信息，这些数据和信息是安全评价整体的组成部分。本文件没有讨论主管部门进行安全评价时应当考虑的具体数据和信息，因为数据和信息的应用取决于安全评价的类型和产品的特征。本文件没有详尽列出分子特征鉴定的分析技术。就所列举的分析技术事例而言，只是为了说明分子特征的某一方面，并不意味着推荐使用该技术。

根据生物安全卡塔赫纳协定书（Cartagena Protocol on Biosafety）（SCBD，2000）和食品法典委员会（Codex Alimentarius Commission）（Codex，2003a）的定义，现代生物技术是指：“应用 a）体外核酸技术，包括重组 DNA 技术以及直接将核酸注射到细胞或细胞器中；或 b）超越分类学上的科进行的细胞融合技术，该技术克服了自然的生殖障碍或重组屏障，并且在常规育种和选择中不使用该技术”。

尽管所有技术（包括常规育种）培育的植物品种都存在风险，本文件的范围只限于应用重组 DNA 技术以及将核酸直接注射到细胞或细胞器中产生的植物，即指重组 DNA 植物^①。确切地说，本文件将检测转化程序转化载体遗传物质向受体的转移以及重组 DNA 植物中遗传物质的鉴定、遗传和表达。

本文件主要针对开放条件下拟进行商业化应用的重组 DNA 植物，该植物需要进行安全评价。

本文中需要进行法规评估的重组 DNA 植物通常已进行了转化后的筛选和选择。重组 DNA 植物的开发从产生大量转化体开始（Padgett et al，1995；Zhou et al，2003；Heck

* Originally published by the OECD in English under the title: “Consensus Document on Molecular Characterisation of Plants Derived from Modern Biotechnology” © 2010 OECD. All rights reserved.

① 其他称谓 [如遗传改良植物、基因工程植物、转基因植物和转化植物] 经常与重组 DNA 植物（recombinant-DNA plant）交换使用。本文中，重组 DNA 植物特指第 4 段的定义。

et al, 2005)。最初的转化体经过几个繁殖周期鉴定,以得到能稳定表达和遗传预期表型^①、并保留理想农艺性状(如生长性状、育性和产量)的植株。这一筛选和选择过程有助于研发者鉴定转化过程对植物的影响。随着繁殖周期的推进,开发者将淘汰具有非预期性状和不理想性状的植株。这一过程最终选择出开放条件下拟进行商业化应用的重组 DNA 植株,安全评价就是针对这些重组 DNA 植株。

2. 各国和国际经验

在生物技术产品管理方面具有长久历史的很多国家已经制定了重组 DNA 植物及其产品的评估标准和程序。各国的评估技术和经验已经为很多政府间组织[如经济合作组织(OECD)、世界卫生组织(WHO)、粮食和农业组织(FAO)]共享。通过国际协商确定的安全评价的科学原则和科学方法目前正被世界各地的行政机构应用。本文件补充了国家机构和国际组织在本领域内建立的指南。

就环境安全而言,已经建立了几个指南文件,着重于环境安全评价的方法,如 1993 年 OECD 发布的《生物技术的安全性考虑:农作物的环境释放试验》(Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants)。此外,通过成员国共识形成的很多其他 OECD 文件为重组 DNA 植物的环境安全评价奠定了基础。

就食品安全而言,在 FAO/WHO 食品标准项目的资助下,食品法典委员会生物技术食品政府间特别工作组(Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology)制定了几个文件,包括《现代生物技术食品的风险分析原则》(Codex, 2003a),《重组 DNA 植物食品的食品安全评价指南》(Codex, 2003b)。就饲料安全性而言,OECD 发布了《来源于转基因植物的动物饲料安全评价考虑》(OECD, 2003)。此外,通过成员国共识形成的很多其他 OECD 文件为重组 DNA 植物食品和饲料安全评价奠定了基础。

3. 分子特征鉴定的目的

分子特征为转基因植物的安全评价提供信息。分子特征在分子水平提供的信息包括植物基因组^②内插入的 DNA、插入位点和表达物质[核糖核酸(RNA)和蛋白质],以及转化所产生的预期效应和可能的非预期效应。基因型^③的分子特征信息有助于评价转化对重组 DNA 植物食品、饲料和环境安全的潜在影响,并可协助预测表型,表型将最终决定重组 DNA 植物是否存在相关的安全性问题。

分子特征有很多特定的考虑事项,这通常是管理机构考虑的内容,也是建立国际共识中关注的内容,包括:

- 转化方法

转化方法的描述,同时对可能插入到植物基因组中的 DNA 序列进行详细的描述;

- 插入 DNA、插入位点和表达物质

① 表型是指某一生物中可以观察到的特征或性状,由生物基因型和环境间的相互作用决定,包括但不限于物理、形态、生理和生化性质。

② 基因组包括细胞核和细胞器中的遗传物质。

③ 基因型是指某一生物的遗传组成。

插入 DNA 的描述,包括由于转化而可能引起的遗传重组、缺失或截短,以及在不同发育阶段插入 DNA 在植物不同组织不同时期的表达(蛋白水平和/或 RNA 水平)。

● 遗传特征和遗传稳定性

不仅包括插入 DNA 的遗传特征,而且包含经过多个繁殖周期后插入 DNA 的稳定性(如翻译和转录)。

插入 DNA 的分子特征可能和转基因植物安全性的非预期效应预测相关,但通常不是测定该非预期效应的主要方法。安全评价的其他内容包括:新物质(如蛋白质,代谢物)的致敏性和毒性评价,营养素和抗营养成分含量的变化,内源毒素和过敏源含量的变化以及植物适合度的变化等,这些都与转基因植物安全性的非预期效应测定相关。

重组 DNA 植物的食品、饲料和环境安全评价中的分子特征鉴定建立在针对特定序列和表达产物的检测方法基础上。新的图谱技术可以提供许多成分在特定生化/分子水平(如转录组学——RNA;蛋白质组学——蛋白质)的信息。由于许多新的图谱技术还处在发展阶段,因而管理机构在重组 DNA 植物安全评价中尚未应用该技术。如果这类技术得到充分的发展和验证,它们有望在将来的安全评价中作为补充手段。图谱技术在安全评价中的应用前景及可能带来的挑战已在多个综述中进行了讨论(如 Kuiper et al, 2003; Chassy et al, 2004),本文件没有深入阐述。

任何植物育种都能产生非预期效应。对重组 DNA 植物来说,非预期效应可能是由于基因组序列遭到破坏或新性状导致的多重影响引起的。基因插入或转化导致的基因组缺失和重排(包括插入基因的缺失和重排)都能破坏基因组序列。非预期效应产生的变异株要在转化后的筛选和选择中去除。尽管重组 DNA 植物和常规育种植物(包括应用突变技术产生的植物)都需进行农艺和形态性状的评价和选择,但大多数常规育种植物没有经过和重组 DNA 植物相同安全评价。

总之,分子特征是安全评价的一个重要内容,不过它只是全部安全评价方法的一个组成部分。分子特征是安全评价其他内容的补充,如重组 DNA 植物与其适合对照物在环境、化学、营养、致敏性和毒理学数据的比较。安全评价的侧重点是转化是否会无意间增加受体植物的潜在毒性或致敏性,是否改变其营养品质,是否对环境产生负面影响,以及是否产生了其他不想要的性状。全面的安全性信息将帮助管理机构确定重组 DNA 植物是否满足适合的安全标准。

第二节 转化方法

1. 引言

转化是将目的 DNA 序列插入到植物基因组的过程。现在已有不同的转化方法,每一转化方法都有相应特点,并会影响整合到植物基因组中的外源 DNA 序列。例如,整合过程可引起重排、缺失或多拷贝插入以及来源于质粒(载体)或染色体 DNA 的“其他”序列的插入。如果这类“其他”序列可引起重组 DNA 植物中新物质的出现,或导致 RNA 和蛋白质水平的改变,则这些“其他”序列就与安全评价有关。本节将重点介绍特定转化方法产生的 DNA 整合。

现已有很多方法可将 DNA 导入到植物基因组中 (Hansen and Wright 的综述, 1999)。卸甲农杆菌在细菌介导的转化方法中最常用。农杆菌以外的其他植物细菌在植物转化中可能也会变的重要 (Broothaerts et al, 2005)。直接转化方法包括粒子轰击 (基因枪) 和电穿孔。其他方法 (如微注射、电泳) 经特别设计后主要应用于难以转化的植物种或组织 (Hansen and Chilton, 1996; Rakoczy-Trojanowska, 2002 的综述)。本节将重点介绍广泛应用的转化方法。

2. 农杆菌介导转化

在农杆菌介导转化过程中, 一段带有特定较短侧翼序列 (即 T-DNA 边界序列) 的 DNA 区域 (称之为 T-DNA) 被转移整合到基因组中 (见 Gelvin 的综述, 2003)。除 T-DNA 边界序列外, 毒力基因 (*vir*) 在 T-DNA 加工、运输和整合过程中起着关键作用。Vir 蛋白不仅具有顺式作用功能, 还能以反式的方式起作用。根据后一发现, 建立了二元载体系统, 该系统包括: i) 带有 T-DNA 区和边界序列的质粒; ii) 具有 *vir* 基因功能并去除了 T-DNA 区的辅助质粒。二元载体系统频繁地应用于农杆菌介导的转化中 (Hellen et al, 2000)。

转化中使用的农杆菌菌株和辅助质粒必须是已知的, 如果之前未鉴定过, 应提供对它们的介绍。还应提供辅助质粒是如何被卸甲的信息。此外, 还要描述含有 T-DNA 区的质粒, 该信息说明了可能转移的 DNA 序列。

对农杆菌介导转化通常可在单一插入位点上整合低拷贝的 DNA 构件^①。已在一些正在商业化的重组 DNA 植物品种中发现, 在单一位点上 T-DNA 作为串联重复序列插入 (结构上正向插入或反向插入) (Smith et al 的综述, 2001)。有时也可见到不完整 T-DNA 序列的整合。整合中 DNA 构件可能同时出现几种类型的重排 (复制、倒位或在植物 DNA 中散布), 以及植物基因组在插入位点处出现 DNA 的重排 (复制、倒位和易位)。有时也观察到 T-DNA 边界以外的质粒骨架序列的插入 (Smith et al 的综述, 2001), 质粒骨架序列要么与右边界 T-DNA 序列一起插入, 要么与左边界 T-DNA 序列一起插入, 要么作为与 T-DNA 不相连的独立单元插入 (Kononov et al, 1997)。第三节将考虑这些现象的安全评价。

3. 直接转化

植物细胞的直接转化是利用各种可将外源物质通过细胞壁和细胞膜的技术 (如粒子轰击、电穿孔) 而将目的 DNA 序列直接导入到植物细胞中。该方法可能会导入其他未打算转移的 DNA 序列 (如细菌染色体 DNA), 这取决于转化所用 DNA 的纯度。应提供关于载体 DNA 及其制备方法和纯度的描述, 以表明可能转移的 DNA 序列。

对于不适宜用农杆菌介导转化法成功导入新性状的植物来说, 可应用直接转化法 (见 Taylor and Fauquet, 2002)。如果使用最小表达盒 (启动子、开放阅读框、终止子) 可获得单个整合体 (Fu et al, 2000)。粒子轰击可能使 DNA 构件在一个或多个位点多拷贝插入 (以正向或反向重复结构插入) (Jackson et al, 2001; Smith et al 的综述, 2001)。植物基因组 DNA 片段可能散布在单位点插入的多拷贝 DNA 构件中。某些情况下, 导入的

① 本文件中构件指拟插入到植物基因组中的 DNA。

DNA 可能出现缺失或重排,如串联体(见 Smith et al 的综述,2001)。如果在转化时使用完整的质粒或未充分纯化的表达盒,则重组 DNA 植物中可能存在载体骨架序列。

4. 结论

转化方法的描述有助于了解可能转移到植物基因组的 DNA 序列信息,这对于鉴定受体植物的变化,全力开展安全评价工作十分重要。

第三节 插入 DNA、插入位点和表达物质

1. 插入 DNA 和插入位点

在安全评价中,对插入 DNA 进行的分析可用于鉴定转化体的基因型。DNA 构件中或插入位点处 DNA 片段缺失和重排的数据,可用于确定是否产生非预期的其他效应。本节对插入 DNA 的信息以及插入位点的变化进行了讨论。

应当指出的是,当插入 DNA 在开放条件下拟商业化应用的重组 DNA 植物中稳定遗传时,对插入 DNA 进行分析是安全评价内容的一部分。

整合和拷贝数

DNA 构件可插入到植物核基因组或细胞器(如叶绿体)基因组中。插入 DNA 存在于核内还是细胞器内与重组 DNA 植物的繁殖生物学密切相关,该信息有助于在环境安全评价中评估目的基因扩散的潜在风险。如果插入 DNA 位于叶绿体中,则其最可能的是母体遗传[大多数高等植物(主要)通过母本而不是花粉转移其叶绿体 DNA (Bock, 2007)]。如果插入 DNA 位于核内,将同时通过母本和父本遗传。分子分析和遗传学研究可提供插入 DNA 位点的信息(见第四节)。

根据所用的转化方法,插入位点的数目可能不同。并且,每一插入位点可能存在多拷贝的 DNA 构件(见第二节)。尽管人们通常选择单拷贝 DNA 构件的植株,但在有些情况下,多拷贝的植株由于表达水平高可能更为有效。拷贝数虽然可以影响基因沉默,但其相关性不如导入 DNA 与内源基因的同源性(Flavell, 1994)。

选用合适的对照和试验数据(如 Southern 杂交分析)可以获得重组 DNA 植物的插入位点数目、各位点拷贝数以及插入元件(如启动子、增强子)的信息。

质粒骨架序列的存在

农杆菌介导转化法和直接转化方法都可能出现载体骨架序列在植物基因组的整合(见第二节)。如果载体骨架序列的插入会导致其他蛋白质的表达(33)或改变内源基因的表达,则载体骨架序列的整合就很重要。用载体骨架的 DNA 序列为探针对基因组 DNA 进行 Southern 杂交,以确定是否插入了载体骨架的元件。

转化的组织和插入位点

外源基因整合到植物基因组的过程中,可能会出现 DNA 的重排。通过序列分析、插入 DNA 的 PCR 扩增和 Southern 杂交技术可以鉴定 DNA 重排。如果试验结果表明插入较复杂,如存在重排或缺失,则可能需要对插入 DNA 进行进一步的分析,以确定与植物表型相关的新物质是否存在于植物中。这些重排对于食品、饲料和环境安全评价而言并不一定有意义。

T-DNA 整合到内源基因的编码序列或调节序列，以及插入位点处植物基因组 DNA 缺失或重排都可能引起内源基因功能的丧失或改变其表达。这可能会导致植物发生变化，这些变化对安全而言可能有意义，也可能无意义。对插入 DNA 的旁侧区域进行分析可用于确定 DNA 构件是否插入到内源基因的编码序列或调节序列，不仅如此，旁侧区域分析可用于鉴定对植物基因功能潜在的影响。不过，由于不了解大多数植物基因的功能对插入位点变化引起基因功能丧失的分析经常难以进行。插入位点的鉴定能可用于分析重组 DNA 植物的非预期效应，这是植物农艺性状评价、表型性状评价和组成成分评价的一部分。

转化可能形成新的开放阅读框，从而产生新蛋白质。对插入 DNA 和基因组 DNA 接合区之间的序列进行分析可用于说明是否存在新的开放阅读框，以及新开放阅读框的上游或下游是否存在调节序列。

2. 表达物质

为评价新基因产物的食品、饲料和环境安全，需要分析插入 DNA 的表达。除此之外，可能还需要考虑载体骨架序列和新开放阅读框的表达。通过分子分析获得的数据应当能够表明插入的载体 DNA 是否可以转录和翻译。如果发现潜在的新开放阅读框，则通过生物信息学手段确定其形成 RNA 的可能性，转录和翻译的可能性以及新蛋白推导的氨基酸序列。如果发现可能产生新蛋白质，应当全面鉴定其对安全的潜在影响。对新蛋白进行的安全评价不在本文件范围之内。

一些情况下，插入 DNA 构件的目的是抑制或下调内源靶基因的转录。该情况下，内源靶基因在蛋白质水平表达可能会降低或受到抑制。在一些情况下，作为非预期效应基因沉默构件可能影响其他具有明显序列相似性的内源基因的转录或翻译。

转录和翻译

将 DNA 构件成功转入到一个新的植物品种中，并不表示该构件就会表达（Gelvin, 2003）。一些因素可影响插入 DNA 的表达水平和表达稳定性。研究表明，插入 DNA 的拷贝数、结构（如反向重复序列）和插入位点均影响转录（Flavell, 1994; Gelvin, 1998; Matzke and Matzke, 1998）。此外，插入 DNA 在哪里转录以及什么时候转录，在一定范围内取决于所用的启动子（如组织特异性启动子可将表达限制在期望的组织中）、植株发育阶段（如开花、结子）和重组 DNA 植物的生长环境（Bregitzer and Tonks, 2003; Zhu et al, 2004）。

应用 Northern 杂交等核酸技术，或 Western 杂交等基于抗体的方法，可测定插入 DNA 在 RNA 或蛋白水平的表达。在分析插入 DNA 的表达特征时，应确保分析所用的条件（如检测的组织 and 生长条件）与安全评价相关。一旦确认表达，就可以鉴定插入 DNA 的表达产物并评价其安全性。

在评价表达产物的暴露量时，应当考虑插入 DNA 在相关组织中以及相关环境条件下的表达，并将其作为安全评价的一部分。在植物基因组中稳定整合并不意味着插入 DNA 能够在重组 DNA 植物的整个生活周期中将要或一定以稳定的水平表达。在关键发育阶段分析植物组织中插入基因的编码蛋白，将揭示该发育阶段的蛋白表达量与安全评价的相关性，例如蛋白质是否存在于食品和饲料中，在哪个发育阶段的环境暴露量最大（如花粉中

蛋白质的表达)。

翻译后修饰

蛋白质在翻译后要经过进一步的修饰。鉴定插入基因编码蛋白的特征将有助于研发者确认新物质是否为期望的表达产物。这些蛋白质的特征能够建立与其安全应用历史的关联性,其相关性可通过植物体中表达的蛋白质与天然寄主中表达的蛋白质没有实质不同来说明。为了在重组 DNA 植物的安全评价中引用天然寄主中蛋白质的数据和信息,上述相关性分析是必须的。目前已经建立了识别潜在翻译后修饰系统,例如 N-糖基化位点、O-糖基化位点、Ser/Thr/Tyr 磷酸化位点和异戊二烯化的算法 (Blom et al, 2004; Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2005)。应用特异染色方法、放射性标记研究或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS),可以证明是否存在预计的与安全评价相关的翻译后修饰 (Jensen, 2000)。一些翻译后的修饰可能影响蛋白质的安全性,虽然这已经超出了分子鉴定的范围,但是应将其作为整个安全评价的组成部分进行考虑。

3. 结论

插入 DNA 的分析有助于鉴定转化体的基因型。在 DNA 构件中或插入位点处出现的缺失和/或重排可能会导致非预期的影响。表达产物分析在表型评价中具有重要作用,不过这应当在整体的安全评价中考虑。

第四节 遗传和遗传稳定性

1. 引言

插入 DNA 遗传和遗传稳定性的信息可以将特定重组 DNA 植物的安全评价结论扩展到其后代中。因此,插入 DNA 的遗传和遗传稳定性信息对于食品、饲料和环境安全评价十分重要而且是必须的。

遗传指基因型和表现型传递到后代的代谱。遗传修饰的稳定性指经过不同时间和世代后,遗传修饰的结构和功能的完整性。在重组 DNA 植物生产和繁殖过程中,通过插入位点的基因型分析或/和期望性状的表现型分析,可以鉴定遗传稳定性。

2. 安全评价中的遗传和遗传稳定性

世代内和不同世代中导入性状的遗传稳定性与遗传是安全评价的组成部分。遗传分析包括插入 DNA 是位于植物核染色体上还是细胞器上,是通过母本还是父本传递到后代中。如果插入 DNA 已经稳定整合到基因组中,就可一定程度上确认植物在早期世代进行的安全评价可应用于以后的世代。当选择植株在开放条件下商业化应用时,研发者通常寻找那些插入 DNA 已经稳定整合到基因组的植株。

遗传谱

对于 DNA 构件插入到细胞核的情况,通常用孟德尔规律中基因型和表现型的分离比预计遗传谱。不符合孟德尔遗传表明遗传存在潜在的不稳定性,特别是对二倍体有性繁殖植物核基因组染色体的遗传修饰,管理人员遇到的新植物通常属于这种类型。不过,特定植物的遗传谱取决于该物种的遗传机制,例如繁殖方式、倍体性以核基因组还是细胞器基因组遗传。

对于无性繁殖、营养繁殖和一些多倍体的植物以及所有质体或线粒体基因组的遗传修饰而言,预期将不会出现孟德尔遗传。这些非孟德尔遗传的事例并不能表示遗传不稳定。

遗传稳定性因素

所有植物在有丝分裂或减数分裂过程中以及在将基因传递到后代的过程中,可能会发生基因型的改变。在 DNA 复制和有丝分裂前染色体加倍过程中,由于碱基对插入错误,可能会出现自发突变。在减数分裂中同源染色体的配对会引起基因交换,从而引发基因重组出现新的基因组群。插入 DNA 的稳定性一定程度上也取决于导入或改良基因的序列与结构以及插入位点的特征。

遗传修饰稳定性的测定方法

遗传修饰的稳定性可以在表现型和/或基因型水平上进行分析。通过性状鉴定或通过对足量样本的适合的 RNA 或蛋白表达进行分析可以确定表型表达的稳定性的。一些表型性状(如抗性)可在试验条件下在完整的植株中进行定量。和其他植物基因一样,插入 DNA 的表达会受环境的影响,因此在考虑表型稳定性时,应当考虑这一点。通过酶或抗体介导的生化反应可以测定表达谱的变化或表达量(如 ELISA, Western 杂交)。

应用 Southern 杂交、PCR 或其他类型的遗传分析方法对世代内和世代间多个植株进行遗传分析,可以在基因水平上测定遗传修饰的稳定性。应当在植物育种会发生正常变异的背景下,考虑重组 DNA 植物世代间基因型的变化。

3. 结论

遗传和遗传稳定性可为食品、饲料和环境安全评价提供信息。该信息在将特定世代重组 DNA 植物的安全评价结果扩展到后代中起着重要作用。

第五节 总 结

分子特征包括对转化方法,插入 DNA 和表达物质,以及插入 DNA 遗传与遗传稳定性的考虑。分子特征本身不是一个充分预测重组 DNA 植物安全性的方法。不过,分子特征有助于重点考虑安全评价中的其他要素,植物表型评价中,如营养物、抗营养因子、内源毒素的水平或致敏源的特征或植物适合度的变化。迄今为止,在重组 DNA 植物的分子特征鉴定中已经应用了目前最合适的科学程序和技术。这些程序和技术应用的经验形成了本文件的基础。按照目前技术进步的步伐,预计新的方法将会应用于重组 DNA 植物的分子特征鉴定,不过应当证明这些方法在食品、饲料和环境安全评价的危害鉴定机理中具有附加价值。

参考文献

- Blom, N., T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft and S. Brunak. 2004. Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence. *Proteomics* Vol. 4, pp. 1633-1649.

- Bock, R. 2007. Structure, Function, and Inheritance of Plastid Genomes. In R. Bock, ed., Cell and Molecular Biology of Plastids. Topics in Current Genetics Vol. 19, pp. 29-63, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Bregitzer, P. and D. Tonks. 2003. Inheritance and Expression of Transgenes in Barley. Crop Science Vol. 43, pp. 4-12.
- Broothaerts, W., H. J. Mitchell, B. Weir, S. Kaines, L. M. A. Smith, W. Yang, J. E. Mayer, C. Roa-Rodriguez and R. A. Jefferson. 2005. Gene Transfer to Plants by Diverse Species of Bacteria. Nature Vol. 433, pp. 629-633.
- Chassy, B., J. J. Hlywka, G. A. Kleter, E. J. Kok, H. A. Kuiper, M. McGloughlin, I. C. Munro, R. H. Phipps and J. E. Reid. 2004. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved Through Biotechnology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol. 3, pp. 35-104.
- Codex Alimentarius Commission (Codex) (2003a, with amendment in 2008). Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology. CAC/GL 44-2003. available online at http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10007/CXG_044e.pdf.
- Codex (2003b; with Annexes II and III adopted in 2008). Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants. CAC/GL 45-2003. available online at http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10021/CXG_045e.pdf.
- Flavell, R. B. 1994. Inactivation of Gene Expression in Plants as a Consequence of Specific Sequence duplication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 91, pp. 3490-3496.
- Fu, X., L. T. Duc, S. Fontana, B. B. Bong, P. Tinjuangjun, D. Sudhakar, R. M. Twyman, P. Christou and A. Kohli. 2000. Linear Transgene Constructs Lacking Vector Backbone Sequences Generate Low-Copy-Number Transgenic Plants with Simple Integration Patterns. Transgenic Research Vol. 9, pp. 11-19.
- Gelvin, S. B. 1998. The Introduction and Expression of Transgenes in Plants. Current Opinion in Biotechnology Vol. 9, pp. 227-232.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation; the Biology behind the 'Genejockeying' Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 67, pp. 16-37.
- Hansen, G. and M. D. Chilton. 1996. "Agrolistic" Transformation of Plant Cells: Integration of T-Strands Generated in Planta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 93, pp. 14978-14983.
- Hansen, G. and M. S. Wright. 1999. Recent Advances in the Transformation of Plants. Trends in Plant Science Vol. 4, pp. 226-231.
- Heck, G. R., C. L. Armstrong, J. D. Astwood, C. F. Behr, J. T. Bookout, S. M. Brown, T. A. Cavato, D. L. DeBoer, M. Y. Deng, C. George, J. R. Hillyard, C. M. Hironaka, A. R. Howe, E. H. Jakse, B. E. Ledesma, T. C. Lee, R. P. Lirette, M. L. Mangano, J. N. Mutz, Y. Qi, R. E. Rodriguez, S. R. Sidhu, A. Silvanovich, M. A. Stoecker, R. A. Yingling and J. You. 2005. Development and Characterization of a CP4 EPSPS-Based Glyphosate-Tolerant Corn Event. Crop Science Vol. 44, pp. 329-339.
- Hellens, R., P. Mullineaux and H. Klee. 2000. A Guide to *Agrobacterium* Binary Ti Vectors. Trends in Plant Science Vol. 5, pp. 446-451.
- Horvath, H., L. G. Jensen, O. T. Wong, E. Kohl, S. E. Ullrich, J. Cochran, C. G. Kannangara and D. von Wettstein. 2001. Stability of Transgene Expression, Field Performance and Recombination

- Breeding of Transformed Barley Lines. Theoretical and Applied Genetics Vol. 102, pp. 1-11.
- Jackson, S. A, P. Zhang, W. P. Chen, R. L. Philips, B. Friebe, S. Muthukrishnan and B. S. Gill. 2001. High-Resolution Structural Analysis of Biolistic Transgene Integration into the Genome of Wheat. Theoretical and Applied Genetics Vol. 103, pp. 56-62.
- Jensen, O. N. 2000. Modification-Specific Proteomics: Systematic Strategies for Analysing Post-Translationally Modified Proteins. Trends in Biotechnology Vol. 18, Supplement 1, pp. 36-42.
- Kononov, M. E., B. Bassuner and S. B. Gelvin. 1997. Integration of T-DNA Binary Vector "Backbone" Sequences into the Tobacco Genome: Evidence for Multiple Complex Patterns of Integration. The Plant Journal Vol. 11, pp. 945-957.
- Kuiper, H. A., E. J. Kok and K. -H. Engel. 2003. Exploitation of Molecular Profiling Techniques for GM Food Safety Assessment. Current Opinion in Biotechnology Vol. 14, pp. 238-243.
- Matzke, A. J. M. and M. A. Matzke. 1998. Position Effects and Epigenetic Silencing of Plant Transgenes. Current Opinion in Plant Biology Vol. 1, pp. 142-148.
- Maurer-Stroh, S. and F. Eisenhaber. 2005. Refinement and Prediction of Protein Prenylation Motifs. Genome Biology Vol. 6, R55.
- Muskens, M. W. M., A. P. A. Vissers, J. N. M. Mol and J. M. Kooter. 2000. Role of Inverted DNA Repeats in Transcriptional and Post-transcriptional Gene Silencing. Plant Molecular Biology Vol. 43, pp. 243-260.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1993. Safety Considerations for Biotechnology: Scale-Up of Crop Plants, OECD, Paris.
- OECD. 2003. Considerations for the Safety Assessment of Animal Feedstuffs Derived from Genetically Modified Plants. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 9, OECD Environment Directorate, Paris.
- Padgett, S. R., K. H. Kolacz, X. Delannay, D. B. Re, B. J. LaVallee, C. N. Tinus, W. K. Rhodes, Y. I. Otero, G. F. Barry, D. A. Eichholtz, V. M. Peschke, D. L. Nida, N. B. Taylor and G. M. Kishore. 1995. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. Crop Science Vol. 35, pp. 1451-1461.
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. Alternative Methods of Plant Transformation-a Short Review. Cellular & Molecular Biology Letters Vol. 7, pp. 849-858.
- SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity). 2000. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: Text and Annexes, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Canada.
- Smith, N., J. B. Kilpatrick and G. C. Whitlam. 2001. Superfluous Transgene Integration in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences Vol. 20, pp. 215-249.
- Tang, J., R. Scarth and P. B. E. McVetty. 2004. Stability of the Expression of Acyl-ACP Thioesterase Transgenes in Oilseed Rape Doubled Haploid Lines. Crop Science Vol. 44, pp. 732-740.
- Taylor, N. J. and C. M. Fauquet. 2002. Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology. DNA and Cell Biology Vol. 21, pp. 963-977.
- Yin, Z., M. Szwacka, R. Malinowski and S. Malepszy. 2004. Differences in the Inheritance Stability of Kanamycin Resistance between Transgenic Cucumbers (*Cucumis sativus* L.) Containing two Constructs. Journal of Applied Genetics Vol. 45, pp. 307-313.
- Zhang, Y., X. Yin, A. Yang, G. Li and J. Zhang. 2005. Stability of Inheritance of Transgenes in Maize (*Zea mays* L.) Lines Produced using Different Transformation Methods. Euphytica Vol. 144, pp. 11-22.