



农业生物工程

主 编 莽克强 副主编 陈受宜 李季伦 朱裕鼎

化学工业出版社

农业生物工程

主 编 莽克强

副主编 陈受宜 李季伦 朱裕鼎



ND31/03



403880

化学工业出版社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

农业生物工程/莽克强主编. —北京: 化学工业出版社,
1998. 11

ISBN 7-5025-2293-X

I. 农… II. 莽… III. 农业工程: 生物工程 IV. S188

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 22741 号

Nongye Shengwu Gongcheng

农业生物工程

主 编 莽克强

副主编 陈受宜 李季伦 朱裕鼎

责任编辑: 叶 露 吴 刚

责任校对: 陈 静

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

*

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 17 字数 411 千字

1998 年 11 月第 1 版 1998 年 11 月北京第 1 次印刷

印 数: 1—3000

ISBN 7-5025-2293-X/S · 33

定 价: 30.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

内 容 提 要

本书对农业生物工程的发展现状和前景作了全面、系统的回顾和展望,并分章介绍了近年来农业生物工程在固氮遗传学、植物直接转化外源基因、农杆菌介导的植物遗传转化、植物组织培养的快速繁殖与脱毒、高等植物中的调节基因及其编码的转录因子、研究稻瘟病真菌的品种特异性的分子遗传方法、植物抗虫育种、植物耐旱耐盐的分子生物学及其基因工程、植物品质改良、动物的性别控制、哺乳动物核移植、动物生物反应器等方面的基础研究、技术方法、应用成果及农业生物工程产业化问题等。

本书可供农、林、医等领域中从事生物工程科研、生产、教学工作的科技人员、大专院校老师及有关专业的学生参考。

目 录

第1章 农业生物工程的前景和展望 (莽克强)	1
1.1 可能成为第二次绿色革命的技术基础	1
1.1.1 抗病	1
1.1.2 抗虫	2
1.1.3 改良品质	2
1.1.4 利用杂交优势增产	2
1.1.5 抗逆	2
1.1.6 基因工程疫苗	3
1.1.7 转基因动物反应器	3
1.2 生物工程体和生物工程产品的生物安全性	3
1.2.1 Kan ^r 的抗性基因 NPT II (aphA ₂) 与转化为不可控的野草	4
1.2.2 aphA ₂ 能否扩散	5
1.2.3 aphA ₂ 基因产物是否对人、高等动物有害	5
1.2.4 目标基因及其产物是否对人、畜等动物有害	5
1.2.5 转基因能否引起新病原菌的产生	6
1.3 我国农业生物工程的发展	7
1.3.1 培育出的品种	8
1.3.2 植物快速繁殖的生产规模和植物种类大幅度增加	8
1.3.3 转基因植物得到发展	8
1.3.4 在应用基础研究方面的发展	10
1.4 对我国农业生物工程的几点建议	12
1.4.1 加强应用基础研究, 大力发掘有价值的基因和表达调控元件	12
1.4.2 结合国情发扬优势	12
1.4.3 对动、植物新品种的专利保护	13
参考文献	13
第2章 固氮遗传学研究进展 (马旅雁 李季伦)	15
2.1 固氮基因组成及功能	15
2.1.1 自生固氮菌	15
2.1.2 联合固氮菌固氮	18
2.1.3 共生固氮菌	19
2.2 固氮调控分子机制	21
2.2.1 固氮基因表达调控 (转录水平调控)	21
2.2.2 固氮酶的活性调控 (翻译后水平调控)	35
2.3 结语	43
参考文献	43

第3章 植物直接转化外源基因的方法 (陈正华 张海燕 王 槐)	49
3.1 直接转化外源基因的概述	49
3.1.1 发展趋势	49
3.1.2 转化外源基因的生物学	50
3.1.3 对转基因植物的检测与评估	51
3.2 植物细胞直接转化技术	52
3.2.1 基因枪转化法	52
3.2.2 用电激法转化完整细胞和组织	57
3.2.3 生殖细胞原位转化法	61
3.2.4 显微注射转化法	64
3.2.5 激光微束穿刺法导入外源基因	66
3.2.6 细胞与组织转化新发展的方法	68
3.2.7 PEG 等介导转化原生质体的方法	72
3.3 植物基因直接转移与外源基因的整合表达及遗传	75
3.3.1 植物表达载体设计的相关问题	75
3.3.2 导入基因在转基因植物中的遗传及存在的问题	76
参考文献	80
第4章 农杆菌介导的植物遗传转化 (贾士荣 王志兴)	85
4.1 T-DNA 转移机理	88
4.2 农杆菌转化程序	90
4.3 农杆菌	90
4.3.1 农杆菌菌系	90
4.3.2 农杆菌培养	92
4.3.3 <i>vir</i> 基因的活化	92
4.4 外植体	93
4.4.1 外植体种类	93
4.4.2 外植体的年龄	95
4.4.3 与外植体再生有关的几个问题	95
4.4.4 胚胎发育及对农杆菌的感受态	96
4.4.5 外植体的预培养	97
4.5 农杆菌接种外植体	97
4.6 农杆菌与外植体共培养	97
4.6.1 共培养方法	97
4.6.2 最佳共培养时间	98
4.6.3 共培养中激素的影响	99
4.6.4 外源基因的短暂表达	99
4.6.5 转化细胞与再生细胞的一致性	99
4.7 转化细胞的选择	100
4.7.1 选择标记基因及报告基因	100
4.7.2 选择压	101

4.7.3 选择方法及时期	102
4.8 检测方法	102
4.9 转基因植物	104
4.9.1 整合位点及拷贝数	104
4.9.2 甲基化与基因表达	105
4.9.3 启动子和组织特异性表达	105
4.9.4 转基因植物的倍性变化	106
4.9.5 发根农杆菌转化株的表型改变	106
4.9.6 发根农杆菌转化用于生产植物次生代谢产物	107
4.10 存在问题及展望	107
参考文献	108
第5章 植物组织培养的快速繁殖与脱毒在农业上的应用 (李文安)	116
5.1 植物组织培养在细胞工程中的作用	116
5.1.1 植物的快速繁殖	116
5.1.2 去除病毒	117
5.1.3 培育新品种	118
5.1.4 植物种质资源的保存	119
5.1.5 人工种子的研究	119
5.2 快速繁殖的途径与方法	120
5.2.1 器官型 (organ type)	120
5.2.2 器官发生型 (organogenesis type)	120
5.2.3 胚状体发生型 (embryoid type)	120
5.2.4 原球茎型 (protocomb type)	121
5.2.5 球茎芽型 (globose stem bud type)	121
5.2.6 块茎型 (tuber type)	121
5.2.7 鳞茎型 (bulb type)	121
5.2.8 微小短枝扦插型 (minicultting type)	121
5.3 脱毒的方法与技术	122
5.3.1 茎尖培养脱毒	122
5.3.2 物理学方法脱毒	127
5.3.3 化学疗法脱毒	128
5.3.4 其他途径脱毒	131
5.4 无病毒植株的鉴定	132
5.4.1 直观测定法	132
5.4.2 指示植物法	132
5.4.3 抗血清 (antiserum) 鉴定法	132
5.4.4 酶联免疫法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)	133
5.4.5 电子显微镜 (electron microscope) 检查法	133
5.5 快速繁殖与脱毒种苗的应用概况	134
5.5.1 蔬菜类作物	134

5.5.2 果树类作物	136
5.5.3 花卉与观赏植物	138
5.5.4 经济作物	140
5.5.5 药用植物	142
参考文献	144
第6章 高等植物中的调节基因及其编码的转录因子 (洪孟民)	150
6.1 控制玉米 32 kD 醇溶蛋白质基因转录的 o2 蛋白质	150
6.1.1 o2 突变	150
6.1.2 o2 基因的克隆	151
6.1.3 o2 基因及其所编码蛋白质的结构	151
6.1.4 o2 蛋白质的功能	151
6.2 控制玉米叶分化的 Kn1 蛋白质	152
6.2.1 Kn1 突变	152
6.2.2 Kn1 基因的克隆	152
6.2.3 Kn1 蛋白质的结构	152
6.3 控制拟南芥菜光形态建成的 Cop1 蛋白质	153
6.3.1 拟南芥菜中的 Cop 突变	153
6.3.2 Cop 基因的克隆	153
6.3.3 Cop1 蛋白质的结构	153
6.4 控制金鱼草与拟南芥菜花发育的蛋白质	154
6.4.1 花器官的同源异形突变	154
6.4.2 基因的克隆	154
6.4.3 蛋白质的结构	155
6.5 控制植物花青素生物合成基因表达的几种蛋白质	156
6.5.1 花青素的生物合成与无色突变	156
6.5.2 调节基因的克隆	156
6.5.3 蛋白质的结构	156
6.5.4 Bz2 基因的转录活化需要 C1 与 R 蛋白质的同时存在	157
6.6 光诱导表达基因的转录因子两例	157
6.6.1 欧芹中控制 CHS 基因表达的 PRF-1 蛋白质	157
6.6.2 拟南芥菜中控制 RbcS-1 基因表达的 GBF 蛋白质	158
6.7 结语	158
参考文献	159
第7章 研究稻瘟病真菌的品种特异性的分子遗传学方法 (S. A. Leong 等)	161
7.1 序言	161
7.2 <i>M. grisea</i> 群体生物学	162
7.3 <i>M. grisea</i> 的寄主/栽培品种特异性的分子遗传学分析	162
7.4 一个研究水稻稻瘟病的新方法	163
7.5 <i>Magnaporthe Grisea</i> 的遗传图谱	164
7.6 水稻品种 C039 的一个品种特异性基因克隆的图谱	169

7.7	<i>Avr-C039</i> 的染色体步行	170
7.8	<i>M. grisea</i> 的转化	171
7.9	<i>M. grisea</i> 中的重复 DNA	172
7.10	结语	174
	参考文献	175
第 8 章	植物抗虫育种的新途径 (田颖川 芦 睿)	178
8.1	概述	178
8.2	抗虫基因的来源	180
8.2.1	苏云金杆菌晶体蛋白基因	181
8.2.2	蛋白酶抑制剂 (PI) 基因	183
8.2.3	植物来源的其他抗虫基因	183
8.2.4	与昆虫生长发育有关的基因	184
8.3	抗虫基因的克隆及改造	184
8.4	抗虫转基因植物研究进展	187
8.4.1	转 Bt 基因植物	187
8.4.2	表达蛋白酶抑制剂基因的抗虫转基因植物	190
8.4.3	其他植物来源的抗虫基因在转基因植物方面的应用	190
8.5	抗虫转基因植物的合理应用及预防昆虫产生耐受性的对策	191
8.5.1	基因策略	192
8.5.2	启动子调控 (降压法)	193
8.5.3	表达水平控制法	193
8.5.4	综合管理	193
8.6	结语	194
	参考文献	195
第 9 章	植物耐旱耐盐的分子生物学及其基因工程策略 (张 慧 陈受宜)	198
9.1	干旱及盐应答基因	198
9.2	应答基因表达的调控	201
9.3	植物耐旱耐盐的基因工程	201
	参考文献	202
第 10 章	农业生物工程在植物品质改良方面的应用 (辛世文)	207
10.1	植物蛋白质	207
10.1.1	序列修饰	207
10.1.2	合成基因	208
10.1.3	同源基因的过量表达	208
10.1.4	转移和表达异源基因	209
10.1.5	增加游离的必需氨基酸的含量	211
10.2	碳水化合物	211
10.2.1	改变淀粉含量	211
10.2.2	改变直链淀粉、支链淀粉的比例	212
10.2.3	改变糖含量	213

10.3 脂肪	213
10.3.1 修饰脂肪酸的饱和度	213
10.3.2 修饰脂肪酸链长度	214
10.4 品味	214
10.4.1 糖含量	214
10.4.2 果实固型物含量	214
10.4.3 甜蛋白	215
10.5 后熟的品质	215
10.6 展望	216
参考文献	217
第11章 动物的性别控制 (胡明信 吴学清)	220
11.1 性别决定的研究	221
11.2 性别控制的研究	222
11.2.1 X、Y精子分离的研究	222
11.2.2 胚胎性别鉴定的研究	226
参考文献	229
第12章 哺乳动物核移植 (朱裕鼎)	231
12.1 哺乳动物核移植意义	231
12.2 研究进展概况	232
12.3 核移植的操作程序	232
12.3.1 卵母细胞染色体(核物质)的去除或破坏的方法	233
12.3.2 细胞融合和卵母细胞的激活	233
12.4 哺乳动物核移植的基础研究	233
12.4.1 细胞电融合及卵母细胞激活	233
12.4.2 核的重编与细胞质的同期化	235
12.4.3 种间核移植	236
12.4.4 牛胚胎连续克隆	237
12.4.5 胚胎干细胞的利用	238
12.5 用核移植方法克隆商品牛	238
12.6 哺乳动物核移植研究的前景	239
参考文献	239
第13章 动物生物反应器 (李建凡 吴祥甫 沈孝宙)	241
13.1 转基因动物的制备方法	241
13.1.1 显微注射	242
13.1.2 胚胎干细胞法	245
13.1.3 反转录病毒载体	245
13.2 外源基因的表达	246
13.2.1 真核基因的结构与功能	246
13.2.2 基因的组织特异性表达	247
13.3 特异表达系统	248

13.3.1 乳腺表达系统.....	248
13.3.2 血液表达系统.....	254
13.3.3 核型多角体病毒为载体的家蚕表达系统.....	254
13.4 动物生物反应器的经济价值及前景.....	255
参考文献.....	257

第 1 章 农业生物工程的前景和展望

莽 克 强

中国科学院微生物研究所 北京 100080

最近一个时期,有些国外友人担心本世纪末至下世纪初中国的粮食能否自给。诚然这种担心也不无根据,我国人口每年净增约 1600 万,至 2000 年时将超过 13 亿,而耕地面积按 1957~1992 年的 36 年统计每年递减 30 万~50 万公顷。到 2000 年耕地面积将共减少约 170 万公顷,届时人均不过 0.07 公顷。目前粮食年总产 4.5 亿~4.6 亿 t (1995 年底国家正式公布为 4.6 亿 t),人均 375kg。本世纪末必须达到 5 亿 t,即每年要增加 1000 万 t,也就是 100 亿 kg 才能维持目前的人均水平。肉类目前人均 38kg 左右,至 2000 年也必须达到 4800 万 t,即每年递增 30 亿~50 亿 kg 才能维持目前的人均水平。加之目前全世界粮食储备大幅度下降,自 1990 年以来全世界粮食总产与消费一直持平,因此对中国这样的用粮大户能否自给特别关心是可以理解的。中国农业生物工程必须首先以服务此宏观总目标为己任,今后现代农业生产的增长不仅是产量问题必须同时考虑食品的品质、营养和保健的问题才能适应市场的需要;在发展农业的同时还必须考虑如何保护环境和大自然的生物多样性,保持良性生态循环才能满足持续农业的要求。其难度必然比过去要大得多。要满足农业发展的上述总体和具体的要求,必然要采用多方面的综合措施(如进一步扩大水源和肥源;提高水肥合理利用率,不断推出各种作物的优良品种;综合发展农、林、牧、渔,促进良性生态系统的形成;有效的适应我国市场经济的农业技术推广渠道),找到能调动生产积极性的新的科学生产关系。本章仅从生物工程技术来探讨其可能为我国今后农业生产做出的贡献。

1.1 可能成为第二次绿色革命的技术基础

本世纪 60 年代墨西哥和印度由于引种了矮秆抗倒伏、抗锈、耐水肥而高产的小麦良种,产量提高了 5 倍,变粮食进口国为出口国。菲律宾推广半矮秆、抗倒伏、耐肥高产水稻良种,10 年左右实现了大米自给。这些由传统育种技术带来的丰硕成果被赞誉为绿色革命至今令人记忆犹新。然而这次绿色革命所解决的主要问题似乎只是实现在良好水肥条件下的高产这个唯一的目标,以上述现代农业发展的要求来衡量,这是很有限的目标。现代持续农业需要的不仅是高产,还需品质优良、营养价值高、抗病虫、抗逆的优良品种,还应尽可能少地依赖化学农药,减少环境污染等。显然这样的绿色革命目标远远超出了第一次绿色革命的深度和广度,其所依赖的技术也必然是以多学科为基础的综合性的新技术。从生物工程已经取得的成就和目前发展的趋势可以预见其所具备的潜力是完全可以为下一次绿色革命做出重要贡献的。可以将 1985 年发表的抗草甘磷的转基因烟草^[1]作为生物工程在农业方面开始应用的标志,十余年来所取得的成果已充分显示了它的巨大潜力。

1.1.1 抗病

利用植物病毒外壳蛋白基因、病毒复制酶的部分基因或利用反义 RNA(核糖核酸)抑制病毒编码的加工酶等策略已获得至少对 16 个植物病毒组中的 30 多种病毒有抗性的转基因植

物。有的已进入大田试验^[2~4]。利用几丁质酶和葡聚糖苷酶基因抑制真菌性病害已在水稻等转基因植物上表现良好^[5]。利用 Avirulence 理论破坏病原细菌毒素^[6]、抑菌肽类、溶菌酶类等方法获得抗细菌的转基因植物也已有成功的报道。RFLP (DNA 限制性片断长度多态性) 和 RAPD (随机扩增多态 DNA) 方法的普遍应用使植物本身内在的抗病基因不断被发现^[7,8], 对各类病原菌致病机理也有了深入的了解^[9], 使利用基因工程方法获得抗病品种的策略更加多样化, 前景更加美好。

1.1.2 抗虫

利用 *Bt* (苏云金芽孢杆菌) 杀虫蛋白基因 *Cry I* 和 *Cry II* 已分别获得抗鳞翅目和鞘翅目害虫的转基因植物 (如番茄、马铃薯、烟草、杨树、棉花、水稻等)^[10~14], 有的已进入大田试验; 利用凝集素蛋白基因抗同翅目的蚜虫和飞虱的转基因烟草也初见成效; 利用 Ser 和 Cys 的酶抑制剂基因已获具广谱抗性的转基因植物^[15,16]。此外开发利用除 *Bt* 杀虫蛋白外的其他杀虫蛋白、昆虫激素^[17~19]、杆状病毒等在抗虫植物基因工程和生物防治方面的应用也在积极研究中, 相信广泛抗虫资源的开发不仅使更广泛的包括抗线虫和螨类的抗虫植物将加速问世, 而且使对付昆虫抗性的手段也愈来愈丰富。我国每年使用化学农药 30 万 t 左右, 由于昆虫产生抗性, 不仅用药量加大、生产成本步步升高, 而且植物食品中残毒致病致死案件也屡见不鲜。农药制造、使用中的环境污染更是司空见惯。抗病、抗虫转基因植物以及各种生物防护的普遍应用必然会带来对化学农药依赖的日渐减少。

1.1.3 改良品质

(1) 利用修饰植物储藏蛋白基因序列使富含 Lys (赖氨酸) 和 Try (色氨酸), 以补足禾穀类蛋白的这方面缺欠, 或使 Met (蛋氨酸) 和 Cys (半胱氨酸) 含量增加以弥补豆类 and 蔬菜在这方面的不足。利用人工合成基因或富含这类氨基酸的异源蛋白基因都能达到上述目的, 已有成功的实例^[20~23]。

(2) 改变淀粉生物合成途径中关键酶在转基因植物的相对含量而使淀粉含量、糖分积累发生变化, 或改变直链淀粉与支链淀粉的比例, 均有成功报道, 因此改变水果、蔬菜风味, 开发新型工业用淀粉是可行的^[24,25]。

(3) 增加或抑制脂肪生物合成途径中关键酶在转基因植物中的表达以改变脂肪酸链长度或饱和度, 从而改变脂肪酸的结构和组成, 以满足保健食品和工业用油脂的需要, 已初步证实是可行的^[26,27]。

(4) 利用反义 RNA 技术抑制番茄果实软化过程中的关键酶、聚半乳糖醛酸酶或乙烯前体合成酶, 可使番茄果在储存期的软化拖延而增加其商品价值。美国的转基因番茄品种 Flavr-Savr 就具有此种性质并已被食品及药物管理局 (FDA) 批准上市^[28~30]。

1.1.4 利用杂交优势增产

利用杂交优势增产已为国内外所公认, 但成败关键取决于能否有理想的亲体组合以及配套的雄性不孕系。植物基因工程已成功地利用组织特异性表达的启动子, 特异地在花器形成期来表达核酸酶及其抑制剂使花粉败育而获得油菜、烟草等植物的雄性不孕系和恢复系, 为广泛应用杂交优势增产开辟了广阔而美好的远景^[31,32]。

1.1.5 抗逆

抗逆包括抗盐碱、抗旱、抗涝、抗寒。利用转基因的山梨醇-6 磷酸脱氢酶或甘露醇-3 磷酸脱氢酶抗盐碱已初获成果; 利用转基因厌氧条件下酒精脱氢酶抗涝; 利用歧化酶和过氧化物酶抗寒的工作也初见端倪。我国耕地面积仅占国土 14%, 而其中有一半是干旱、半干旱或

盐碱地, 生物工程技术若在抗逆方面有所突破其增产幅度将是非常可观的^[33~38]。

1.1.6 基因工程疫苗

80年代利用基因工程亚单位疫苗在解决畜类狂犬病、猪伪狂犬病方面已取得实际应用的成果, 但亚单位疫苗对有些病毒或病原菌的免疫原性往往不理想, 使应用受到局限。近年开发的DNA(脱氧核糖核酸)免疫或DNA疫苗技术令人鼓舞。1990年Wisconsin大学的Wolly利用CAT(氯霉素乙酰转移酶)或GUS(葡萄糖醛酸酶)基因证明这些基因在小鼠骨骼肌可较长期地被表达, 给人以启示: 有可能利用这类方法表达免疫原。之后令人颇感兴趣的是将HIV-I的gp 160基因注入小鼠后有抗体反应, 体外有中和反应, 体内抑制病毒合胞体的形成。在猕猴体内也已证明抗血清具有高效价中和能力, 现正在猩猩和人体内试验。该方法可诱发细胞的和体液的两种免疫反应, 目前已有十多种人、畜传染性疾病(如口蹄疫、狂犬病、爱滋病等)的DNA疫苗在研制中^[39,40]。

1.1.7 转基因动物反应器

90年代初利用转基因小鼠在乳腺和乳汁中表达外原蛋白(如人的尿激酶、tPA、 α 抗胰蛋白酶), 表达量很高(每升以克计), 但很不稳定。继之用大牲畜(如转基因羊)表达人抗血友病因子Ⅷ。转基因猪表达鼠乳清蛋白可达2g/L。在转基因羊中表达 α 抗胰蛋白酶最高可达60g/L, 稳定的表达量在35g/L。这种高表达量是非常诱人的, 以山羊为例, 每日产奶5L, 如每升含基因工程蛋白的药物以10g计, 则每天可产出50g, 相当于一个表达量为50mg/L的1000L的发酵罐的产量。利用奶牛作生物反应器则更有商用价值, 一头高产奶牛每年可产奶8000~10000kg, 这是可能的, 因为荷兰科学家已建立了利用体外培养成卵母细胞和微型注射结合获得转基因牛的体系。然而转基因动物生物反应器商品化前还必须解决一些障碍, 如基因表达水平的稳定性、高效表达对受体动物的损伤、表达产物的高度纯化以及表达产物的生物活性等^[41,42]。

以上仅以10多年来农业生物工程的梗概说明其潜能。美国Calgene公司的抗软化的转基因工程番茄已被FDA批准上市。Monsanto公司的抗虫番茄、棉花也在待批准推广中。畜用伪狂犬病疫苗、基因工程生长激素也已商品化。所有这些实例说明生物工程产品已开始进入人们的生活, 其发展方兴未艾, 然而应当看到它对农业生产产生全面而深刻的影响之前还必须解决一系列问题。如应与传统育种学家协作、与有关基础学科结合解决一系列技术问题, 合理地解决其生物安全性问题, 还要广泛地被社会所承认、所接受。

1.2 生物工程体和生物工程产品的生物安全性

随着转基因动物的大批繁殖及植物大田试验被批准的数目以及进入商品化生产的转基因作物的日益增多, 它们对生态环境和消费者的安全性问题的争论也日趋激烈。自1987年至1995年初美国农业部已批准850多个大田试验, Calgene公司抗软化番茄Flavr-Savr、Monsanto公司的牛生长激素“posilao”、Pfizer的重组凝乳酶经多年争论后亦被FDA批准上市, 认为对消费者、受体和环境都是无害的, 然而所有这些都不足以平息或淡化这场争论^[43,44]。对一个利弊兼有的新生事物持认真的科学态度, 衡量利弊、决定取舍是完全正确的。反之只看阳面一概肯定或只看阴面完全否定都是不正确的态度。讨论安全性问题、制定系列安全条例的目的, 不仅是对消费者和生态环境负责, 而且也是促进生物技术的发展、进步和合理的应用, 而绝不是阻碍它的发展, 甚至企图扼杀它。这应当是讨论这类问题的基本态度。

影响生物工程体或产品安全性的因素是很多的。如目的基因的种类及其产物、表达载体

结构、标记基因种类、性质和功能、外源基因插入受体染色体中的位置、基因表达的周身性、组织特异或发育特异表达的稳定性、遗传工程体本身有无致病性或毒性以及它们对生态环境有无不良影响等。问题如此复杂，试图以完全肯定或完全否定的一言以蔽之来回答显然是不客观、不科学的。正确的哲理似应一事一论，以科学论证、试验数据为准，这应当是处理这类问题的基本原则。

由于这些因素中有些是已知的（如目的基因和标记基因及其产物的结构、功能），它们是否有毒性、基因表达的位置、产物在体内的分布等是可以根据已知材料分析推理的。然而有些因素则是半知或完全不知的，如是否由于外源基因插入的位置效应引起工程微生物由非致病性变为致病菌或引起受体内原来有害而沉默基因的表达、转基因植物在自然界能否通过授粉的有性杂交将目标基因或标记基因转入亲缘相近的野生种而破坏生态环境，这些问题需通过调查研究甚至试验才能有合理的答案。因此生物工程体（包括动物、植物、微生物）或生物工程产品的某些方面的安全性本身就是实验研究，是成果转化为生产力、实现商品化过程中的必要组成部分，是需要投入的，而事实是国外在这方面虽已有研究但仍显薄弱，而国内这方面的研究工作刚刚起步。应当将生物安全性的研究列为工程体或产品应用开发研究不可缺少的一部分，安全性问题得不到妥善的解答和解决，必然影响生物工程在各领域中的应用。

目前国内外对用于农业生产方面的生物工程体和产品的安全性给予高度注意是完全正确和必要的，因为与医用生物工程对比，农用转基因植物、微生物的应用，一旦释放推广则难以控制；再者医用生物工程产品无论药物或疫苗在进入中试临床前都有较严格的审查制度、程序和方法，不仅对产品本身的真实性、纯度、残毒有严格的审查，尤其对药理、毒理、药代、长期毒性均要求必需的动物模型试验，临床前试验审查合格后才能进入临床三阶段再受考验，临床三期通过后才能获得试生产许可，国内这套制度已执行十多年。而农用转基因植物种苗方面正在拟定有关条例，可望不久公诸于世，但真正落实还有相当困难。因篇幅有限不可能全面地讨论、涉及所有生物工程体或产品的安全性问题，仅就目前已进入市场、商品化越来越多、争论激烈的转基因植物为例详加剖析以说明上述基本原则的必要。

各方对转基因植物安全性所担忧的问题是：

（1）普遍应用的选择标记基因为抗生素或除草剂的抗性基因 NPT II 或 Bar^r，它们能否使转基因作物成为不可控的野草，这些基因能否扩散到亲缘关系相近的野生种或其他微生物体内而破坏自然生态平衡；

（2）Kan^r 等基因及其产物的存在是否适于人、畜食用或工业加工；

（3）目标基因及其产物对人、畜以及其他生物是否有毒害，是否会使转基因作物成为新的致病原；

（4）外源基因插入的位置效应是否会引起有毒的沉默基因的表达。

现就其中最主要的问题加以讨论。

1.2.1 Kan^r 的抗性基因 NPT II (aphA₂) 与转化为不可控的野草

一种植物能否成为难以控制的野草取决于它内在的遗传特性及其特性表现所需的特定环境条件，两者缺一不可，因此含 Kan^r 基因 (aphA₂) 的转基因作物能否成为不可控野草，首先要看它原来的受体亲本是否有此野性，如亲本与所处环境已多年适应平安无事，那么经过多次筛选后它的转基因体唯一的改变是在亲本染色体上添加了已知的 aphA₂ 和目的基因，而对其他遗传性无任何影响。比起传统的杂交育种，基因工程育种所改变的遗传特性是高度特

异的。因此只有当自然界中存在一定浓度的 Kan 时,转基因植物的绝对的选择优势即 Kan^r 才能表现,并有可能成为无法控制的野草。根据多次测定,某些土壤微生物可产生 Kan 已勿容置疑,但其量甚微难以测出,靠它们形成选择压是不可能的。再者,大量兽用 Kan 在土中积累有无可能形成选择压?以荷兰为例,每年 Kan 在 5cm 厚表土中的残留量是 0.13μg/ml 地下水。如不考虑生物降解只考虑土壤颗粒吸收也需 5000 多年才能积累到形成选择压所需水平^[45,46]。

1.2.2 aphA₂ 能否扩散

aphA₂ 基因的扩散必须经过两个途径。第一个途径是通过授粉杂交将它转给近亲野生植物。可能的条件首先是该作物是以授粉杂交繁殖的,而马铃薯主要是营养繁殖继代的,很难有这种机会。其次在其生长环境中是否有近亲野生种存在。有些国家、地区的重要作物根本没有这种野生种,即使有还要看相距多远。美国加州大学 Riverside 分校用芜菁进行试验的结果表明,在 1 km 以内可通过自然杂交将转基因扩散至野生种,并由于杂交优势使野生种结实多 15%。因此转基因能否垂直扩散要一事一论、具体分析,不能一言以蔽之。假若 aphA₂ 扩散了,按上述分析由于选择压无法形成,是不可能变成愈加不可控的野草的。自然界中由于自然突变而对 Kan 有高度抗性的植物种类不少,尤其是单子叶植物,这显然与转基因根本无关。第二个途径是通过 DNA 的直接转移将转基因扩散到某些土壤微生物或人畜肠道微生物的可能。首先这种水平转移是通过质粒形式以接合方式转移的。而转基因植物 DNA 不是以质粒存在的,能否扩散到微生物体内? Calgene 公司以转基因番茄为例,根据 aphA₂ 在土壤或肠道中的浓度和存在的活菌数以及转化频率,计算出造成抗 Kan 转化子的几率分别为 10⁻⁸% 和 2.4×10⁻⁵%,而且这种转化子必须经体内重组后转基因才能被表达。因为转基因的启动子在微生物体内无法工作,据此认为 aphA₂ 难以改变土壤和肠道的各自生态条件。与天然抗 Kan μD 植物很类似的人肠道中早已存在天然抗 Kan 的细菌,这与转基因毫无关系^[46]。

目的基因能否扩散原则上与上述 aphA₂ 的情况是相似的。

1.2.3 aphA₂ 基因产物是否对人、高等动物有害

aphA₂ 产物是氨基糖苷-O-磷酸转移酶(Aminoglycoside-O-phosphoryl-transferase),该酶对底物有高度特异性,只作用在氨基己糖环(Aminohexose) 3' 位上的一OH 上,进行依赖 ATP(三磷酸腺苷)的磷酸化反应,而对其他氨基糖苷类抗生素(如 Amikacin 或 Netilmycin)都无作用。消化道中的 ATP 量低不足以造成催化活性。该酶如果被外泌至消化道中,20~30min 即被充分降解而失活^[46]。

1.2.4 目标基因及其产物是否对人、畜等动物有害

目前世界上不少国家用各种 Bt 杀虫蛋白基因转入植物而获得抗鳞翅目害虫的番茄、杨树、棉花、玉米,抗鞘翅目害虫的马铃薯、杨树等。有人认为这类杀虫蛋白是安全的,因为苏云金杆菌作为生物防治剂已在世界各地应用近 30 年,对人、畜、禽、鱼都是安全的。含该基因的转基因植物也理应是安全的,但经基因操作后情况已与自然发生的很是不同。原天然杀虫蛋白基因全长 3.6 kb,编码 130~140 kD 蛋白,昆虫取食后,中肠 pH10.2~10.5 条件下将其降解为被活化的 65~70 kD 蛋白,与肠表面细胞受体结合后改变膜上离子通道,摄入更多的离子和 H₂O,致使细胞胀裂而亡。基因操作时为提高其表达量,3'-端无毒力的一半被切除,只保留 5'-端 1.8kb 有毒力的一半,所以转基因植物体内所表达的 Bt 杀虫蛋白已是被活化了的 65~75 kD 的蛋白。因此将过去天然 Bt 无害论套用于转基因植物是有风险的,应当作为新问题来测试不同类型的 Bt 杀虫蛋白的急、慢性毒性、抗蛋白酶能力、免疫原性等,以

确保对人、畜、禽、鱼甚至对有益的传粉昆虫无害^[47~49]。

1994 年荷兰的国家农产品质量控制研究所(State Inst. for Quality Control of Agricultural Products, Wageningen The Netherlands) 用含 *Bt*、*cryIA* (b) 转基因番茄的冻干饲料喂大鼠 30 天或 90 天后, 其取食体重、血相等与对照组无区别^[50]。1995 年 8 月美国环境保护局(U. S. Environmental Protection Agency, EPA) 批准 Mycogen 公司和 Ciba Seed 公司(Ciba-Geigy 公司的分部) 含 *Bt* 基因的转基因玉米, 5 月份批准了 Monsanto 公司的含 *Bt* 基因的马铃薯可进行商品性的销售。Monsanto 公司的 *Bt* 转基因玉米已转让许可给 Samdoz Seed 公司(瑞士, Basel) 并计划于 1996 年种植其杂交种。就目前形势看, 工业界、联邦管理人员、大学的科学家, 甚至环保专家都日益认为 *Bt* 是安全的杀虫剂。但由于玉米的种植面积太大, 令人担心的却是昆虫产生对 *Bt* 的抗性, 为此 EPA 对 Mycogen 公司和 Ciba-Geigy 公司要求五年内监测 *Bt* 抗性的产生^[51,52]。此外蛋白酶抑制剂、蝎毒蛋白、凝集素等类杀虫蛋白基因产物对哺乳动物、禽类、鱼类、益虫也是有潜在危险性的, 亦应持谨慎的科学态度。

利用反义 RNA 基因阻断某些关键酶基因达到改良植物品质的工作越来越多, 如抗软化的番茄、改变植物花色等。在肠道内, 这些基因正像人们每天都被吃下去的大量不同 DNA 的命运一样, 很快被降解, 不会对机体有毒或产生过敏反应。美国 FDA 正是据此观点才批准转基因番茄 Flavr-Savr 上市的^[50,53]。

1.2.5 转基因能否引起新病原菌的产生

利用植物病毒基因组的结构蛋白或非结构蛋白基因为转基因获得大量具有抗病毒的转基因作物已在至少 16 个植物病毒组 30 多种病毒中获得成功, 有的已进入大田试验或大规模推广。其中用的最多的是植物病毒蛋白外壳基因(CP)。尽管 CP 蛋白本身是无毒害的, 但人们担心异源病毒之间在寄生体内可能通过异源包壳作用(Heteroencapsidation)形成有致病力的新病毒。如提出以下设想: 假若一个可表达蚜虫传的 CMV(有些黄瓜花叶病毒株系决定蚜虫能否传染的是外壳蛋白)的 CP 蛋白的转基因植物被蚜虫不传的 TMV(烟草花叶病毒)所感染, TMV-RNA 有可能被 CMV(黄瓜花叶病毒)的 CP 蛋白所包壳而形成一个可被蚜虫传的新病毒。诚然, 在自然界相近病毒株系间的异源包壳或多组分病毒(如 BMV、CMV 等)基因组之间的体内拟重组(Pseudorecombination)是有可能发生的(BMV 为雀麦花叶病毒)。但是能否通过它们形成新病毒或毒力更强的新株系则不能简单处之, 要具体分析, 一事一论。异源包壳也是有条件的, 病毒基因组应有特异的、可识别 CP 蛋白基的序列, 因此相近株系间容易发生异源包壳。如可表达 PVY-N(马铃薯 Y 病毒的 N 株系)外壳蛋白的转基因马铃薯品种 Binje 被 PVY 的 O 株系侵染后所形成的子代病毒颗粒有两种, 即分别被两种 CP 蛋白所包壳的 PVY-O-RNA 所形成的颗粒。又如在 TMV 的不同株系间也有可能发生。至于 TMV 和 CMV 两个远缘病毒之间似乎是不可能发生异源包壳的。在自然界中很多植物(如烟草、番茄、辣椒、香蕉等)都可以被 TMV 和 CMV 混合感染, 但未见有异源包壳报道。至于异源包壳的新病毒是否能改变传毒媒介取决于传媒特性的决定族是否寓于外壳蛋白中, 如表达蚜虫传的 PVY 的李痘株(PPV)外壳蛋白的烟草被蚜虫不传的南瓜黄花叶病毒的 NAT 株(ZYMV-NAT)侵染时, 子代病毒颗粒包括两种即 ZYMV-RNA 分别被 PPV 和 ZYMV 的外壳蛋白所包壳, 而使 ZYMV 成为可蚜虫传的病毒^[54]。然而在自然界这种异源包壳的发生频率如何, 有待进一步了解。最近美国农业部下属动、植物卫生检验处(APHIS, Animal and Plant Health Inspection Service)放宽转基因植物大田试验的条例, 允许大多数转基因植物只需通知备案、无需批准手续即可大田试验。如此建议被批准, 约 99% 的大田试验无需申请批准了, 但为了保