

转抗菌肽基因辣椒食用安全性和营养质量评价

邓平建¹ 刘建军¹ 赵 锦¹ 房师松¹ 黄自然² 钟杨生² 廖富葵²

(1. 深圳市疾病预防控制中心,广东 深圳 518020;2. 华南农业大学,广东 广州 518000)

摘 要:依据中华人民共和国卫生部《转基因食品卫生管理办法》的有关规定,对转抗菌肽基因辣椒食用安全性和营养质量进行评价,探讨建立相关的模式和方法,为我国转基因食品的卫生管理提供可资借鉴的模型和方法。以转抗菌肽基因辣椒及其对应的受体辣椒为材料,通过对其外源基因及其表达产物、主要营养成分的检测,鉴定转基因食品的特性、基因重组体的遗传稳定性、外源基因的表达忠实性、与受体辣椒的实质等同性,分析和评价其食用安全性和营养质量。抗菌肽基因辣椒其受体、外源基因供体均为传统食品,其基因重组体的主要特性的遗传是稳定的,其外源基因的表达式是忠实的,其食用安全性和营养质量不低于对应的原有食品。

关键词:基因;安全;营养

The evaluation of the safety and nutritional value of cecropin- GM capsicum

Deng Pingjian, et al.

(Shenzhen municipal center for disease prevention and control, Guangdong province 518020, China)

Abstract: The safety and nutritional value of cecropin- GM capsicum were evaluated according to the rule of "the Sanitary Regulation of Genetically Modified Food" issued by the Ministry of Health of the People's Republic of China using the transgenic cecropin-capsicum and the corresponding capsicum as testing material. The genetically modified capsicum, including its characteristics, the genetic stability of the recombinant, the expression loyalty of the introduced gene and the substantial equivalence, was identified by detection of introduction gene and its expression product as well as the major nutritional component. The results showed that both the receptor and the inserting gene provider were traditional foods. The heredity of major characteristics of recombinant cecropin capsicum was stable, the expression of foreign gene in GM capsicum was loyal; the safety and nutritional value of GM capsicum were not lower than those of the corresponding capsicum. The GM capsicum is fit for human consumption.

Key Words: genes; food safety; nutrition

转基因食品系指利用基因工程技术改变基因组构成的动物、植物和微生物生产的食品 and 食品添加剂,包括转基因动物、植物和微生物产品,转基因动物、植物和微生物直接加工品和以转基因动物、植物、微生物或者其直接加工品为原料生产的食品 and 食品添加剂。转基因食品的食用安全性和营养质量受到全球普遍关注,其评价程序和方法的研究亦日益受到重视。^[1,2]依据中华人民共和国卫生部《转基因食品卫生管理办法》的有关规定,本文以转抗菌肽基因辣椒及其对应的受体辣椒为材料,通过对其外

源基因及其表达产物、主要营养成分的检测,鉴定其转基因食品的特性、基因重组体的遗传稳定性、外源基因的表达忠实性、与受体辣椒的实质等同性,分析和评价其食用安全性和营养质量。为我国转基因食品的卫生管理提供可资借鉴的模型和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 转抗菌肽基因辣椒及其对应的受体辣椒由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。

基金项目:2001 年广东省科技计划项目(No. C 31403)、深圳市科技计划项目(No. 6)

作者简介:邓平建 男 主任技师

This work was supported by the Science and Technology Plan of Guangdong province, China (No. 6) and Science and Technology Plan of Shenzhen, China (No. 6)

1.1.2 主要仪器设备

PCR 扩增仪 9700 型,美国 ABI 公司产品。

氨基酸分析仪 L8800 型,日本日立公司产品。

质谱仪 MALDI TOP,瑞典 Amersham Biosciences 公司产品。

PCR 扩增 使用 Roche 公司的 PCR Core Kit,全部引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.3 标准物质

抗菌肽抑菌生物活性标准物 由大肠杆菌 K₁₂D₃₁诱导炸蚕蛹,提取免疫血淋巴制备的抗菌肽。^[4]炸蚕蛹由辽宁省大连生物技术研究所提供。

转基因食品标准品 Roundup Ready 大豆(含 35S 和 NOS),孟山都公司产品;Bt - 176 玉米(含 35S),Novartis/Ciba-Geigy 公司产品。

DNA 分子量标准品 100 bp DNA Ladder,购自北京鼎国生物技术公司。

蛋白质分子量标准品 Peptide Marker Kit,购自 Amersham Pharmacia Biotech。

1.2 方法

1.2.1 转抗菌肽基因辣椒申报资料审查

《卫生部转基因食品卫生管理办法》第十一条规定:“生产或者进口转基因食品必须向卫生部提出申请。并提交申请表、国家有关部门颁发的批准文件等 8 种材料。”据此收集和审查相关资料。

产品名称、来源、工艺、用途和有关部门颁发的批准文件的审查。

遗传工程体安全等级相关资料的审查,资料包括:

受体辣椒的种植和食用历史、生物特性、产品性状、受体植物的安全等级划分、食用安全性和主要营养成分。

抗菌肽 D 和抗菌肽 B 的获得方法、核苷酸序列、用途、产物功能、推导的产物氨基酸序列及其食用安全性。

目的基因与载体构建的图谱、载体和启动子、终止子、标记基因、报告基因的来源及其致病性或演变为有致病性的概率。

含目的基因的表达载体侵染方法、遗传工程体的筛选方法、目的基因整合进受体基因组的鉴定方法。

遗传工程体安全等级划分及有关部门对该遗传工程体安全等级的确认。

遗传工程体遗传稳定性相关资料的审查,资料包括:遗传分化第 4 代产品(T₃代)的验证方法及结果、目的基因表达在受体中分布和组织特异性、遗传

性状稳定性。

1.2.2 转抗菌肽基因辣椒食用安全性与营养质量评价的验证方案

《卫生部转基因食品卫生管理办法》第八条规定:转基因食品食用安全性和营养质量评价采用危险性评价、实质等同、个案处理等原则。根据此原则和对转抗菌肽基因辣椒申报资料的审查结果,设计转抗菌肽基因辣椒食用安全性与营养质量评价的验证方案。

1.2.2.1 转抗菌肽基因辣椒的食用危险性评价方案

转抗菌肽基因辣椒对食用者可能产生的主要危害因素是外源基因在遗传分化中发生变异,导致表达产物性质、功能的改变,产生非期望的有害物质。据此,主要验证遗传稳定性和表达忠实性。

遗传稳定性 验证目的基因是否丢失或者变异。验证调控基因、标记基因是否丢失。如发生外源基因的丢失或者变异,则需通过进一步的分析验证所产生的后果。

表达忠实性 验证是否表达目标蛋白质。验证表达的蛋白质的生物活性、分子量、氨基酸序列是否变异。如果发生变异,则需要对该表达产物的性质、功能及食用安全性作进一步的验证。

1.2.2.2 转抗菌肽基因辣椒的营养质量评价

营养质量评价主要依据实质等同性原则进行。验证产品除目标产物外,其他主要营养成分及感官指标与对应的原有食品是否等同或相近。如果主要营养成分和感官指标与受体相比发生了改变,则需进一步分析这种改变对营养质量的影响及程度。

1.2.3 转抗菌肽基因辣椒特性的鉴定方法

采用 PCR 方法,检测转抗菌肽基因辣椒的 35S 和 NOS 基因,与转基因食品标准品比对,与受体辣椒对照。^[3]

采用提取总蛋白质检测生物活性方法,检测转抗菌肽基因辣椒蛋白的抑菌生物活性,与抗菌肽抑菌生物活性标准物比对,与受体辣椒蛋白对照。^[4]

1.2.4 转抗菌肽基因辣椒遗传稳定性的检验方法

采用 PCR 方法,检测抗菌肽 Cecropin D、Cecropin B 基因,与 DNA 分子量标准比对,与受体辣椒对照;对扩增 DNA 产物进行克隆测序,与资料提供的序列比对。^[3]

采用 PCR 方法,检测标记基因 NPT- 和报告基因 GUS,与 DNA 分子量标准比对,与受体辣椒对照和与资料提供的数据比对。^[3]

1.2.5 转抗菌肽基因辣椒表达忠实性的检验方法

采用针对抗菌肽 D 和 B 的提取、分离、高压液

相色谱纯化方法分别收集转基因辣椒果实和叶子中目标蛋白质。^[4]

采用针对抗菌肽 D 和 B 的生物活性检测方法检验上述收集物的抑菌活性,与抗菌肽抑菌生物活性标准物比对,与受体辣椒蛋白质对照。^[4]

采用 SDS-PAGE 电泳方法,检验上述收集物的抗菌肽 D 和 B 的分子量,与蛋白质分子量标准和资料提供的数据比对。^[4]

采用 MALDI-TOF 质谱法,检验纯化的抗菌肽 D 和 B 的分子量,与资料提供的数据比对。^[4]

1.2.6 转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒实质等同性的检验方法

按食物营养成分检验标准方法,进行转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒的营养成分分析和比对。

按食品卫生检验方法检查产品的感官指标。

2 结果与讨论

2.1 转抗菌肽基因辣椒申报资料审查结果

2.1.1 产品的名称、来源、工艺、用途和有关部门颁发的批准文件审查结果

名称:转抗菌肽基因抗青枯病辣椒。

来源:由广东省农业科学院蔬菜研究所承担的广东省自然科学基金项目(970677)研究生产。

工艺:运用基因工程技术合成抗菌肽 B、D 基因及构建转化载体 pCDB-,三亲法导入农杆菌,通过农杆菌转化辣椒,获得抗青枯病表达植株。

用途:选育出抗青枯病转基因辣椒,降低青枯病对辣椒生产的危害,提高商品果率。

批准文件:2001 年取得《国家农业部农业生物基因工程安全评价审批书》(农基安审字 2001A-01-003),批准进行中间试验。

我国农业部门依据《农业转基因生物安全管理条例》对转基因动植物、微生物的研究和生产中的实验室试验、中间试验和商品化生产三个阶段实施审批和管理制度。^[5]取得中间试验、环境释放及商品化生产批准文件的转基因产品,具有进行批量生产的资格和条件。在转基因食品卫生管理中,应作为申报转基因食品生产批准文件的基本条件之一。

2.1.2 遗传工程体安全等级相关资料的审查结果

受体生物:“早丰一号”辣椒,学名: *Capsicum annuum* L。

目的基因:抗菌肽 Cecropin D、Cecropin B;供体生物:柞蚕、天蚕;生物学功能:抗细菌病。目的基因的 5 端为 CaMV35 启动子,3 端为 NOS 终止子。

载体:pCDB-。来源:自行构建;标记基因:NPT-(来源于 Ti 质粒);报告基因:无。转基因方

法:根瘤农杆菌介导。

转基因生物体:转抗菌肽 BD 基因辣椒。

抗菌肽辣椒在国家农业部批准文件中被确认为遗传工程体安全等级为 I 级。

2.1.3 遗传工程体遗传稳定性相关资料的审查结果

华南农业大学植物细菌和杀菌剂研究室对其 T₀~T₃ 代抗病性鉴定的资料表明,转抗菌肽基因抗青枯病辣椒为已获得稳定遗传四代的遗传工程体的产品。

2.1.4 转抗菌肽基因辣椒食用安全性资料审查结果

资料审查结果表明,转抗菌肽基因辣椒的受体作物的果实和植株对人畜无害,亦不含毒素。辣椒有长期食用历史,为主要蔬菜之一;其目的基因来自柞蚕和天蚕,表达产物属蚕血淋巴抗菌多肽。蚕蛹为传统食品,对人畜无害;未发现基因工程中采用的载体、启动子、终止子、标记基因对植物和人类有毒害作用;其遗传工程体安全等级为 I 级。

2.2 转抗菌肽基因辣椒特性鉴定结果

从转抗菌肽基因辣椒中检出 35S 和 NOS 调控基因,未从对照的受体辣椒中检出;两基因与转基因大豆标准品扩增检出的 35S 和 NOS 调控基因相同。^[3]

从转抗菌肽基因辣椒蛋白质提取物中检出其有抑菌生物活性,未从对照的受体辣椒中检出;生物活性与从抗菌肽抑菌生物活性标准物中检出的活性相同。^[4]

2.3 转抗菌肽基因辣椒遗传稳定性检验结果

从转抗菌肽基因辣椒中检出抗菌肽 D 基因,未检出抗菌肽 B 基因。对照的受体辣椒两者均未检出;抗菌肽 D 基因扩增条带与 DNA 分子量标准比对,序列长度为 122 bp。序列长度与资料提供的数据完全相符。^[3]

对抗菌肽 D 基因扩增产物进行克隆测序。结果见图 1。

抗菌肽 D 基因扩增产物核苷酸序列与文献报道^[6]的序列及资料提供的数据完全一致。

从转抗菌肽基因辣椒中检出标记基因 NPT-,未检出报告基因 GUS。对照的受体辣椒两者均未检出;标记基因 NPT-与 DNA 分子量标准比对,序列长度为 183 bp,检出结果及序列长度与资料提供的数据完全相符。^[3]

2.4 转抗菌肽基因辣椒表达忠实性结果

分别检测转基因辣椒果实和叶子中目标蛋白质,均检出其对大肠杆菌 K₂D₃₁、大肠杆菌耐药株、

大肠杆菌标准株、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌具有抑菌活性,与抗菌肽抑菌生物活性标准物相同。未从对照的受体辣椒中检出。^[4]

从转抗菌肽基因辣椒蛋白质抽提液中检出抗菌

肽 D,未检出抗菌肽 B。对照的受体辣椒两者均未检出。与蛋白质分子量标准比对,抗菌肽 D 分子量位于 3 800 Da 附近,与抗菌肽抑菌生物活性标准物相同,与资料提供的数据相符。^[4]

5 ATG TGG AAT CCA TTC AAG GAA TTG GAA AGA GCT GGT GAA AGA GIT AGA G
AC GCT ATC ATT TCT GCT
3 TAC ACC TTA GGT AAG TTC CTT AAC CTT TCT CGA CCA GIT TCT CAA CTG TCT CGA TAG TAA AGA CGA
GCT CCT GCT GIT GCT ACT GIT GCT CAA GCT ACT GCC TTG GCC AAG TAA 3
CCA GGA CGA CAA CGA TGA CAA CGA GIT CGA TGA CGG AAG CGG TTV ATT 5

图 1 抗菌肽 D 基因 PCR 扩增产物核苷酸序列

检验经纯化后的抗菌肽 D 的分子量,标示分子量为 3 806 Da,与文献报道的抗菌肽 D 的分子量及资料提供的推导抗菌肽 D 的理论分子量相符。^[4]

应用抗菌肽 D 基因序列的测定结果,推导抗菌肽 D 的氨基酸序列,结果见图 2。

推导的抗菌肽 D 氨基酸序列与文献报道^[8]的序列及资料提供的数据完全一致。

2.5 转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒实质等同性分析结果

转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒的蛋白质、脂肪、维生素 C、-胡萝卜素、维生素 B₁、维生素 B₂ 等主要营养成分及氨基酸含量的结果见表 1、表 2。两者主要食物营养成分及氨基酸含量比对差异无显著性。

H₂N - Tip - Asn - Pro - Phe - Lys - Gu - Leu - Gu - Arg - Ala -
Gly - Gn - Arg - Val - Arg - Asp - Ala - Ile - Ile - Ser - Ala - Gly - Pro
- Ala - Val - Ala - Thr - Val - Ala - Gn - Ala - Thr - Ala - Leu - Ala -
Lys - Stop

图 2 推导的抗菌肽 D 氨基酸序列

表 1 转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒的主要营养成分检测结果

产品名称	蛋白质 %	粗脂肪 %	维生素 C mg/100 g	-胡萝卜素 mg/100 g	维生素 B ₁ mg/100 g	维生素 B ₂ mg/100 g
转基因辣椒 ⁽¹⁾	1.60	0.873	102	0.428	0.16	未检出
受体辣椒 ⁽¹⁾	1.70	1.08	104	0.401	0.16	未检出
检验标准	GB5009.5—85	GB5009.6—85	GB/T12392—90	比色法	GB/T12390—90	GB/T12391—90

注:(1)均检鲜物。

表 2 转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒的氨基酸含量检测结果^[8]

	Asp	Thr	Ser	Gu	Gly	Ala	Cys	Val	Met
转基因辣椒 ⁽¹⁾	1236.16	513.38	552.21	1626.00	644.61	572.17	83.03	589.58	51.28
受体辣椒 ⁽¹⁾	1132.30	472.04	533.46	2048.21	671.09	518.40	170.88	572.12	89.08
	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro	
转基因辣椒 ⁽¹⁾	454.29	813.22	290.57	599.65	346.88	170.18	403.38	438.27	
受体辣椒 ⁽¹⁾	438.29	752.90	418.24	591.91	305.30	166.40	458.25	363.34	

注:(1)均检鲜物。

转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒的果实大小、单果重量、外形、坚硬度及籽粒多少等感官指标差异无显著性。

3 结论

广东省农业科学院蔬菜研究所申报的转抗菌肽基因辣椒,为运用基因工程技术构建抗菌肽 B、D 基因通过农杆菌转化的辣椒品种,表达产物具有所标示的抑菌生物活性,属基因工程安全等级 级产品,已经农业部批准进行中间试验。

转抗菌肽基因辣椒已遗传分化 4 代。导入的抗菌肽 D 目的基因、35S 和 NOS 基因及 NPT- 标记基因未发生丢失或变异;抗菌肽 B 目的基因未检出,可能已在遗传分化中丢失。但转抗菌肽基因辣椒的转基因特性及抑菌生物活性并未丢失或改变,据此认为其基因重组体的主要特性的遗传是稳定的。

转抗菌肽基因辣椒表达的抑菌活性蛋白质,与设计的抗菌肽 D 蛋白质及来自柞蚕蛹免疫血淋巴细胞的抗菌肽抑菌生物活性标准物的生物活性及分

子量相符;未检出抗菌肽 B 蛋白质,与基因检测结果相符。据此认为转抗菌肽基因辣椒中外源目的基因的表达是忠实的。

转抗菌肽基因辣椒的受体作物辣椒的果实和植株对人畜无害,亦不含毒素,有长期食用历史,为主要蔬菜之一;目的基因来自柞蚕和天蚕,表达产物属蚕血淋巴细胞抗菌多肽。蚕蛹为传统食品,对人畜无害;未见基因工程中采用的载体、启动子、终止子、标记基因、报告基因对植物和人类有毒害作用的报道。据此认为转抗菌肽基因辣椒的食用安全性不低于对应的原有食品。

转抗菌肽基因辣椒除表达抗菌肽 D 外,其他主要营养成分及感官性状与受体辣椒差异无显著性。据此认为转抗菌肽基因辣椒与受体辣椒具有实质等同性,其营养质量不低于对应的原有食品。

参考文献:

[1] 邓平建,李良成.制定转基因食品管理办法的研讨[J].中国公共卫生杂志,2002,(1):39—41.

[2] 邓平建,李良成.转基因食品安全性评价程序和方法[J].中国卫生监督杂志,2002,(1):29—31.

[3] 邓平建,赵锦,刘建军,等.转基因食品安全性检验的核酸检测技术研究[J].卫生研究,2002,(1):37—40.

[4] 刘建军,邓平建,赵锦,等.转基因食品安全性检验的蛋白质检测技术研究[J].卫生研究,待发表.

[5] 中华人民共和国国务院令 第 304 号[Z].2001-05-23.

[6] 徐飞,施文,王启松,等.柞蚕抗菌肽 D 基因的合成[J].科学通报,1988,(21):1656—1659.

[7] Qu Xianning, Steiner H, Engstrom A, et al. Insect immunity: Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth[J]. Anthracia pernyi Eur J Biochem, 1982,(127):219—224.

[收稿日期:2002-08-14]

中图分类号:R15;Q943.2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)01-0013-05

《现代食品卫生学》征订启事

为探索、解决和阐明饮食与健康的关系,为适应我国社会经济发展和食品卫生工作的需要,本着突出先进性、科学性、实用性和系统性相结合的指导原则,通过介绍新理论、新观点、新技术和新方法,特编写出版本书。

全书共 7 篇 49 章,174 万余字。内容包括食品卫生基本理论、食品污染问题、食品添加剂、各类食品问题及预防对策、有关研究食品与健康的方法及技术及食品卫生监督管理的理论与方法等,既把握本专业发展前沿,联系我国国情和卫生工作成就,又反映食品卫生学术进步的时代气息和我国食品卫生工作特征。参加编写本书的作者既有国内本科的老专家、学者和教授,又有优秀的中青年博士、硕士,他们都具有丰富的教学、科研和实践经验。

该书是从事食品卫生教学、科研、监督管理人员必备的阅读参考书,也是预防医学专业研究生及本科生学习参考书,同时对广大从事食品生产经营人员与企业家和广大食品消费者提供科学咨询与指导,欢迎踊跃订阅。

本书订价 126 元,加收邮挂费 15 元。邮局汇款或银行汇款均可。

联系人:刘瑕 地址:北京市朝阳区潘家南里 7 号 邮编:100021

电话:010—87781383 传真:010-67711813

银行汇款:北京市商业银行九龙山支行 帐号:9001201080336-07

户名:北京实维安科技有限责任公司 请注明“现代食品卫生学订阅款”

请注意凡通过银行汇款的单位,务必用传真或电话通知编辑部,汇款单位的名称、地址、邮编、收件人。

《中国食品卫生杂志》编辑部