

转基因作物中外源基因在体内代谢途径的研究进展

殷召雪 徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为研究转基因食品中外源基因发生水平转移和其它危害的可能性,从而揭示转基因食品的安全性,综述了外源基因在体内代谢的途径及影响因素,外源基因在消化系统中的代谢降解,外源基因的水平转移以及外源基因在体内代谢途径的研究方法。

关键词:植物;转基因;基因;外源;代谢

Current progresses on study of metabolic pathway of foreign gene from transgenic crops

YIN Zhao-xue, XU Hai-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: To study the safety of transgenic foods and show the probability of gene horizontal transfer and other potential hazards of transgenic food, the metabolic pathway of foreign gene and influencing factors involved, the degradation of foreign gene in digestive system and the horizontal transfer of foreign gene were reviewed. In addition, research methods related were mentioned.

Key word: Plants, Transgenic; Gene, Foreign; Metabolism

随着生物重组技术的应用,转基因作物已在世界范围内广泛种植,毫无疑问这对于解决世界粮食问题有非常重要的意义。但近年来随着研究的深入以及食品安全意识的进一步提高,再加上转基因作物污染事件的出现,人们更加重视转基因作物及其产品的安全性。

转基因作物不同于传统作物在于它引入了各种外源基因(目的基因和标记基因),转基因作物被人或动物摄取后,外源基因随转基因作物进入体内之后首先暴露在消化系统中,在口腔咀嚼、胃中酸性环境及胃肠道消化酶的共同作用下,外源基因被降解成许多小的片段,最后可能完全降解成各种碱基进

一步代谢或者排出体外。一个令人关注的问题是那些未完全降解的片段是否会转移到肠道细菌或者整合到宿主组织、脏器基因组中。因而非常有必要研究外源基因进入体内之后的代谢途径,从而揭示其发生基因水平转移和其它危害的可能性。

1 外源基因在体内代谢途径的研究内容

转基因作物特别是其中外源基因的安全性的相关研究不断增多,研究内容涉及到其在体内外代谢的稳定性以及影响因素,能否与肠道细菌之间发生水平转移以及是否会进入宿主动物基因组中等,但就其性质而言,大多是检测性或描述性的,相关机制

[17] Richter S S, Heilmann K P, Beekmann S E, et al. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations[J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(2):225-235.

[18] De Moissac Y R, Ronald S L, Peppler M S. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *bordetella pertussis* in a whooping cough outbreak[J]. J

Clin Microbiol, 1994,32(2):398-402.

[19] Duffy G, O'Brien S B, Carney E, et al. Characterization of *E. coli* O157 isolates from bovine hide and beef trimming in Irish abattoirs by pulsed field gel electrophoresis[J]. J Microbiol Methods, 2005, 60(3):375-382.

[收稿日期:2005-03-03]

中图分类号:R15;R378.1;S965.1

文献标识码:E

文章编号:1004-8456(2005)04-0341-04

基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”(2001CB10901)

作者简介:殷召雪 男 硕士生

通讯作者:徐海滨 男 研究员

This work was supported by the National Basic Research Program of China. (2001CB10901)

中国食品卫生杂志

CHINESE JOURNAL OF FOOD HYGIENE

2005年第17卷第4期

方面的研究很少。

1.1 外源基因在体内代谢的影响因素 外源基因在体内代谢包括在消化系统和在脏器代谢以及与细菌间的水平转移等多个方面,是一个多种机制参与的复杂过程,受多种因素的影响。

影响外源基因在消化道中降解的因素很多,包括抑制降解的因素和促进降解的因素。抑制降解的因素主要是某些食品基质如果胶等。此外,植物本身庞大的基因组对外源基因也起到一定的稀释作用,从而抑制其降解^[1,2]。促进外源基因降解的因素则包括各种消化酶、酸性环境以及细菌核酶等。外源基因在 DNase 和 DNase 这些消化酶作用下产生许多大小不一的片段。酸性条件下的去嘌呤反应会促使 DNA 的降解。体内外细菌核酶对 DNA 的降解可能也起一定的作用^[3~6]。

外源基因在体内脏器代谢涉及到多种因素,首要的是经消化道降解后外源基因的数量、大小,另外还包括外源基因甲基化,有无刺激性分子等,以及穿过消化道-血液屏障的机制,但目前这方面的研究较为缺乏,仍需要进一步的研究^[7]。

1.2 外源基因在消化系统中的代谢降解 目前国外有较多关于转基因作物中外源基因在消化系统中代谢情况的研究,认为大多数 DNA 在消化道中已被降解,仅有少数未被完全降解,但结论不完全一致,究其原因发现其中涉及到多方面因素,包括所使用的动物模型、基因种类、外源基因受作用的时间长短以及外源基因的宿主植物,这些方面的不同可能会造成研究结论的差异。

1.2.1 动物种属 转基因作物中外源基因代谢方面的研究结论差异较大的原因之一就是所选用的动物模型不同,也就是说,转基因在消化道中代谢情况的差别可能是由动物种属引起的。反刍动物(如牛、羊)和非反刍动物(家禽、猪、大鼠等)是目前常用的动物模型。

反刍动物具有与非反刍动物不同的消化道结构和消化机制,反刍动物消化时要经过长时间的反刍过程,所以 Duggan 等人^[8]给羊喂饲转基因玉米很长时间后,仍可在胃中检测到外源基因短片段。Einspanier 等^[9]给反刍动物(牛)喂饲转基因玉米饲料后,在十二指肠可检测到外源基因的存在,在粪便中则检测不到。而在以非反刍动物为受试对象时,在猪消化道的多个部位均可检测到转基因的小片段,导致结论差异的原因可能是由于种属的差别,也可能是研究方法的差异^[10,11]。

与其它非反刍动物相比,禽类的消化系统又有所不同,禽类的嗉囊通过研磨作用可以起到促进消

化作用,外源基因经过消化道后很可能已完全降解。Chambers 等人^[12]给鸡喂饲转基因饲料后仅在鸡的嗉囊和胃中可检测到 *bar* 基因片段,在小肠及粪便中检测不到。

1.2.2 基因量及拷贝数 植物叶绿体基因以多拷贝的形式存在于植物基因组中,在经过消化系统后不会全部降解,所以在消化道各个部分均可检测到小片段,因而也常常被作为内源性基因的对照。相对于叶绿体基因来说,特异的外源基因大多数以单拷贝形式存在于转基因作物中,因而经过消化系统的降解之后可检测到的几率非常小^[9~13]。

1.2.3 降解时间 许多报道都显示,不论是外源基因还是内源叶绿体基因,在消化道中的降解都与其受作用时间的长短有较大关系,随着时间的推移,所能检测到目的片段的几率逐渐减小^[10~13]。在体外研究中,Wilck 等人^[5]也得出类似的结论。

1.2.4 宿主植物及处理方式 外源基因的宿主植物是否容易消化降解,饲料的加工程度和处理方式等也可能是导致结论差异的原因。植物细胞结构是否相同、是否经过热处理及发酵过程决定了外源基因在进入体内代谢之前就已处于不同的状态,所以得到的结论也会不同。

1.3 外源基因的水平转移 经过消化道代谢之后,仅有少量外源基因未被降解,这些外源基因是否会在肠道细菌间发生水平转移,能否整合到人或动物体基因组,都是人们所非常关注的,并且也是研究的热点之一。

目前一般认为发生基因水平转移并表达的可能性极小,因为这一过程的发生要涉及到多个阶段,需要多种条件共同存在于消化道中,而事实上在消化道中这些条件的实现是非常困难的^[14]。

经消化道降解后残存的少量外源基因片段在一定条件下会通过肠壁淋巴集结(Peyer's Patches)进入淋巴细胞,然后通过血液和淋巴系统进入外周白细胞和器官^[7,15]。当前有较多研究通过 PCR 或者 PCR-blot 等方法检测动物肌肉、脏器、乳汁中是否含有转基因片段,但所得结论不一致。有的在肌肉、脏器中检测到外源基因,有的则检测不到,研究者将这种差异归结于不同动物具有不同的消化系统和消化腔-血液屏障穿越机制^[10,11,15]。基因拷贝数也是影响目前研究结论差异的原因之一,较多学者在动物脏器及肌肉中检测到多拷贝的植物叶绿体基因片段,而未检测到转基因作物中的外源片段^[16~18]。此外,经消化后的基因片段大小也是影响其代谢的一个因素,Einspanier 等人^[9]发现较小的片段似乎更容易进入淋巴细胞。

2 外源基因在体内代谢途径的研究方法

目前对外源基因在体内代谢途径的研究有体外研究和整体动物试验两类,两者各有优缺点,在选择时应根据研究目的来确定,两种方法相结合应该是较好的选择。

2.2 体外研究 目前在体外研究转基因植物外源基因的代谢途径主要采用模拟胃肠液法,研究人员收集消化道手术患者或动物的消化液,或者自行配制消化液来模拟体内消化过程^[2,5,6]。这种体外研究方法简便易行,花费低,便于控制条件从而防止污染。但体外模拟系统也具有明显的缺点,比如在细胞间联系、信号传导、生理条件的变化、代谢能力和长期行为等方面,体外研究都不能代表实际动物或人体。而且一般的体外模拟系统都没有模拟大肠的厌氧及微生态环境,所以不能过分强调其作用,由此所得到的数据也应该认真谨慎地解释。

2.3 整体动物试验 一般来说,整体动物研究是根据不同目的设计试验,给家畜、家禽等动物喂饲含有转基因成分的饲料或者纯化的外源基因,研究外源基因在经过动物体代谢后的结果^[8-13,15]。由于这种方法能够直接反映外源基因经过动物体代谢之后的情况,已较多地应用于外源基因在体内代谢的研究中。这种方法的实验要严格控制饲料加工、喂饲、取样过程,防止不同组别间的交叉污染,而且在得出结论时也要非常谨慎,要考虑包括动物种属、研究中给予的受试物的种类、方式及动物模型与人的差异等问题。

3 展望

体内外研究表明,哺乳动物的胃肠道、血液和淋巴系统都会非常有效地清除游离DNA,但也并不是一个外源基因的完全屏障。虽然由于多种原因外源基因(目的基因和标记基因)水平转移的可能性较小,但这种情况一旦发生后果将非常严重,特别是用作标记基因的抗生素抗性基因,如果发生水平转移将会导致耐药菌的增多,对人类的健康造成极大威胁,所以需要进一步研究外源基因在体内的代谢,包括基因片段大小、数量与水平转移和整合发生率的关系以及相关机制方面的研究,为外源基因安全性评价提供系统、详尽的资料。

参考文献

[1] Salyers A. Case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: Genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe [A]. In: Abigail Salyers. Genetically engineered foods: safety issues associated with antibiotic resistance genes [C], Urbana: university of Illinois, 1997, 1-23.

[2] Susana M Martir-Orue, Anthony G O'Donnell. Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87: 533-542.

[3] Baker K P, Baron W F, Henzel W J, et al. Molecular cloning and characterization of human and murine DNase [J]. Gene, 1998, 215: 281-289.

[4] Torsten Bauer, Philipp Weller, Walter P, et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food [J]. Eur Food Res Technol, 2003, 217: 338-343.

[5] Andrea Wilcks, Angela H A M van Hoek, Ruth G Joosten, et al. Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 493-502.

[6] Trudy Netherwood, Susana M Martir-Orue, Anthony G O'Donnell, et al. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract [J]. Nature biotechnology, 2004, 22(2): 204-209.

[7] D E Beever, C F Kemp. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures [J]. Nutrition Abstracts and Reviews, Series B: Livestock Feeds and Feeding, 2000, 70(3): 175-182.

[8] Paula S Duggan, Philip A Chambers, John Heritage. Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep [J]. British Journal of Nutrition, 2003, 89: 159-166.

[9] Ralf Einspanier, Andreas Klotz, Jana Kraft, et al. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case - study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 212: 129-134.

[10] Tim Reuter, Karen Aulrich. Investigation on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies [J]. Eur Food Res Technol, 2003, 216: 185-192.

[11] E H Chowdhury, H Kuribara, P Sultana. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11 [J]. Journal of animal science, 2003, 81: 2546-2551.

[12] Philip A Chambers, Paula S Duggan, John Heritage, et al. The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49: 161-164.

[13] Andreas Klotz, Johann Mayer, Ralf Einspanier. Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry [J]. Eur Food Research Technology, 2002, 214: 271-275.

[14] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.

[15] Rainer Schubbert, Doris Renz, Birgit Schmitz, et al.

黄曲霉毒素的分析方法

高秀芬 计 融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为了解黄曲霉毒素的检测方法,从采样与样品准备、提取净化、测定方法等方面对黄曲霉毒素的分析方法进行了综述。

关键词:黄曲霉毒素类;研究技术;食品;动物饲料

Analytical methods for aflatoxins in food and feed

GAO Xiufen, JI Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: In order to know about the determination for aflatoxins in foods and feeds, the analytical methods for aflatoxins were reviewed including sampling, sample preparation, extracting, clean-up, and measurement.

Key word: Aflatoxins; Investigative Techniques; Food; Animal Feed

黄曲霉毒素在很低浓度时就具有很强的生物活性特性,使研究者在不同领域对其进行了大量研究。许多国家制定了食品中黄曲霉毒素的限量标准,黄曲霉毒素污染问题经常成为国际食品贸易中各国纷争的焦点。为对其进行控制管理,准确有效的分析方法是必不可少的。本文主要对有关黄曲霉毒素的分析方法进行了综述。

黄曲霉毒素的分析包括确定特定批次的食品中黄曲霉毒素含量的全过程,主要有采样、样品前处理(提取与净化)和测定等步骤。

1 采样与样品准备

采样是从待分析的样品中选择有代表性的样品

的过程。不论采用什么样的检测方法,采样无疑是黄曲霉毒素分析中最重要的误差或变异来源,黄曲霉毒素分析中几乎 90 %的误差来源于采样与后续的准备过程^[6],这主要是由于黄曲霉毒素在农产品中分布的不均匀性造成的。

通常污染黄曲霉毒素的作物颗粒在整批作物中所占的比例是相当小的^[7],并且污染的作物颗粒所含黄曲霉毒素的浓度差异又相当大,因此对某些作物进行采样非常困难。据报道少数污染的作物颗粒的黄曲霉毒素含量可达到1 000 000 μg/kg^[8]。为了采集到被污染的作物颗粒,在采样过程中要尽可能粉碎样品,并彻底混匀以使污染部分有效分散。1 粒被污染的花生(大约 0.5 g)能使10 000粒正常花

Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA [J]. Proc Natl Sci USA, 1997, 94: 961-966.

[16] J C Jennings, L D Albee, D C Kolwyck, et al. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed yieldGard corn borer corn [J]. Poultry Science, 2003, 82: 371-380.

[17] Phipps R, D Beever, A Tingey. Detection of transgenic

DNA in bovine milk: Results for cows receiving a TMR containing corn grain modified for insect protection (MON 810) [J]. J Anim Sci, 2001, 79: 476.

[18] Emdadull H Chowdhury, Osamu Mikami, Hideo Murata, et al. Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11 [J]. Journal of Food Protection, 2004, 67: 365-370.

[收稿日期:2005-05-11]

中图分类号:R15;Q943 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2005)04-0344-04

基金项目:国家“十五”重大科技专项(2001BA804A3205)

作者简介:高秀芬 女 硕士生

通讯作者:计融 男 研究员

This work was supported by The Grant from National Science and Technology Program Funds of China. (2001BA804A3205)

黄曲霉毒素的分析方法——高秀芬 计 融

— 347 —

