

转基因食品中外源基因非预期效应的分子检测技术

徐茂军

(浙江工商大学食品、生物与环境工程学院, 杭州, 310035)

摘 要 转基因食品中外源基因的非预期效应可以引起转基因食品的营养成分含量发生变化,甚至产生一些新的毒性物质,是转基因植物食品安全性评价的重要内容之一。由于外源基因非预期效应的不可预见性,因此用常规的分析技术难以准确测定。利用蛋白质组定量分析技术和基因芯片技术从蛋白质组和 mRNA 水平上比较转基因植物食品和非转基因植物食品的基因表达差异,是检测外源基因非预期效应的有效手段。文中对利用蛋白质组分析技术和基因芯片技术检测转基因食品中外源基因非预期效应的应用进展进行了综述分析。

关键词 转基因食品,非预期效应,蛋白质组学,基因芯片,检测

近年来转基因技术和转基因植物的发展十分迅速,由此产生的转基因食品的数量也在不断增加。然而到目前为止,在转基因操作中对外源基因的插入位点尚无法准确控制^[1],对外源基因与植物基因组之间可能存在的各种复杂的相互作用以及由此产生的各种非预期效应也了解甚少。虽然通过对外源基因特性的分析可以在一定程度上对转基因植物可能产生的代谢特性等方面的变化进行预测,但是对于转基因操作中外源基因插入位点的不确定性等因素引起的非预期效应却难以准确预测^[2]。这些非预期效应可以引起植物的营养成分和代谢产物的含量发生变化,甚至可能使转基因植物产生一些新的毒性物质^[3],因此转基因植物中外源基因的非预期效应是引起转基因植物食品安全性问题的主要原因之一。

为了保证转基因食品的安全性,包括美国、欧盟、日本和我国在内的许多国家以及 FAO、WHO 等一些国际组织纷纷制订了一系列针对转基因植物食品安全性的管理措施^[4,5]。其中,由 OECD 提出的“实质等同性原则(substantial equivalence)”是目前国际公认的转基因食品安全性评价的通用原则。其核心内容是:与转基因植物相对应的非转基因植物由于有长期的食用历史,因而被认为是安全的。如果转

基因植物食品在化学组成上与对应的非转基因植物食品无实质性差异,可以认为该转基因植物食品是安全的^[6]。转基因植物中外源基因的非预期效应是转基因植物食品安全性评价的重点内容之一。

准确测定并比较转基因植物与相对应的非转基因亲本植物之间的差异,是对转基因植物中外源基因的非预期效应进行安全性评价的基础。虽然利用常规的化学方法可以对转基因植物食品中部分营养物质和部分抗营养因子的含量进行分析测定,但是由于外源基因非预期效应的不可预见性,因此仅仅检测转基因植物中部分化学成分的变化,难以准确反映外源基因所产生的所有非预期效应。况且植物食品的化学成分十分复杂,而目前可以利用的化学分析方法尚不能满足对植物中所有成分进行测定的需要,因此利用普通化学分析技术难以准确测定转基因植物食品中外源基因的非预期效应^[2]。

与一般的安全性评价策略不同,对转基因植物食品中外源基因非预期效应安全性评价的关键是比较转基因植物食品与非转基因亲本植物之间的差异,以及这种差异的多和少,而不在于测定某一种成分的绝对含量。利用蛋白质组差异分析技术和基因芯片技术可以从蛋白质组

第一作者:博士,教授。

收稿时间:2004-02-27,改回时间:2004-06-17

和 mRNA 水平全面比较转基因植物和非转基因植物的基因表达差异,是检测转基因植物食品中外源基因非预期效应的有效方法。目前,国内外有不少研究者在进行转基因植物食品中外源基因非预期效应的蛋白质组差异分析和基因芯片分析研究,但公开的研究报道还不多见。本文对利用蛋白质组差异分析技术和基因芯片技术检测转基因植物食品中外源基因非预期效应的技术特点、研究进展及未来发展方向等进行了分析讨论。

1 蛋白质组分析技术

利用蛋白质组差异分析技术检测转基因植物中外源基因非预期效应的核心是如何合理地比较转基因植物和相对应的非转基因亲本植物材料之间的蛋白质组分的差异,以及不同材料之间蛋白质组含量相对差异的大小。与普通的化学测定方法相比,蛋白质组分析技术的特点是在不限制具体检测蛋白种类和数量的情况下对不同材料间的蛋白质组差异进行全面的比较^[7],符合转基因植物中外源基因非预期效应的检测要求。

双向电泳(2-DE)技术是目前检测蛋白质组差异的一种常用技术。传统的以双向电泳为基础的蛋白质组差异分析技术分为两步:1)从不同样品中提取出蛋白质并在不同的胶上进行电泳分离;2)染色后比较不同的胶图,找出两个样品之间有差异的蛋白质。

利用双向电泳技术检测转基因植物中外源基因非预期效应时,首先是在蛋白质组水平上找出转基因植物和相对应的非转基因植物的差异,再利用质谱分析(MS)等技术对差异蛋白质进行分析研究。由欧盟资助的一个研究小组(GMOCARE)正在利用蛋白质组分析技术研究4种转基因马铃薯品系(W2GBSS、MAL1、SAM35S、SGT)中外源基因的非预期效应。该研究小组以2-DE技术为基础,采用质谱分析技术和HPLC-ESI-MS联用技术从转基因马铃薯中检测到了50余种差异表达的蛋白质。进一步研究表明,这些差异表达蛋白质一部分为

酶蛋白,一部分为结构蛋白和储藏蛋白,目前该项研究仍在进行之中^[8]。

虽然双向电泳技术并非一种理想的蛋白质组定量分析系统,但是它可以直观地反应转基因植物和非转基因植物材料之间蛋白质表达的差异。利用双向电泳技术测定转基因植物中外源基因非预期效应时,准确检出转基因植物和对应的非转基因植物间蛋白质组分差异,是检测转基因植物中外源基因非预期效应的基础,而电泳后蛋白质斑点的染色以及斑点吸光度的准确定量是保证检测结果准确性的技术关键^[9]。考马斯蓝染色法和银染法是2种最常用的蛋白质染色法。考马斯蓝染色法的敏感性较差(100 ng),银染法的敏感性虽然比较高(1~10 ng),但其浓度动力学范围较窄,因此这2种方法并不适合于要求严格的蛋白质组差异比较分析。目前比较理想的染色方法是荧光染色法,如Molecular Probe公司生产的荧光染料SyPro Ruby在敏感性(100 fmol)和动力学方面(10^3)都能满足蛋白质组差异分析的需要^[10]。

虽然目前已经有不少蛋白质双向电泳图像分析专用软件,如ImageMaster 2-D Elite, Biolumage 2D Investigator等,但是双向电泳蛋白质斑点的定量仍然是一个比较困难的步骤,这大都是由2-DE技术本身的不足引起的。因为即使是同一个样品的平行实验,要完全保证双向电泳胶图中蛋白质斑点的一致性也是很困难的。因此,每个样品必须作多个平行试验以计算每个点的平均值,尽量减少实验误差。此外,利用普通双向电泳技术所获得的不同胶图间蛋白质斑点的匹配也经常出现差错,使胶图间的比较变的困难,分析结果的可靠性降低。

为了解决胶图间的比较问题,人们发明了一种荧光标记与双相电泳技术相结合的技术——荧光双向差异凝胶电泳技术(fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, DIGE)^[11]。与传统的双向电泳蛋白质差异分析技术相比,DIGE是在同一块胶上对2种样品中的蛋白质组进行分离,根据待比较的蛋白质样品不同的荧光标记(如Cy2、Cy3、Cy5等),

电泳后通过各斑点的荧光显色差异可以对样品之间蛋白质组的差异性进行比较分析。由于待比较的蛋白质样品是在同一张胶上进行电泳分离,因此可以排除各种操作因素对蛋白质重现性的影响,保证了不同样品间蛋白质斑点的重叠性。与传统的双向电泳蛋白质差异分析技术相比,利用 DIGE 技术可以比较准确的分析转基因植物和非转基因植物的蛋白质组差异,是从蛋白质组水平上检测转基因植物中外源基因非预期效应的一种比较理想的方法。

转基因植物和非转基因植物的蛋白质组差异分析技术不仅可以用来检测转基因植物中外源基因非预期效应的有无,还可以对转基因植物其他方面的安全性评价起辅助作用。例如,GMOCARE 研究小组目前正在利用蛋白质组差异分析和免疫分析相结合的技术对转基因植物的致过敏性进行分析^[8]。

2 基因表达分析技术

从基因表达(mRNA)水平上对转基因植物和相对应的非转基因亲本植物进行差异性比较,是检测转基因植物食品中外源基因非预期效应的一种常用策略。由于需要比较的基因数量很大,因此要求检测技术必须具有高通量的特性。基因芯片技术(DNA 微阵列技术)是近年来发展十分迅速的一种基因表达分析技术^[12]。由于基因芯片技术具有高通量的检测特性,因此是从 mRNA 表达水平上对转基因植物和相对应的非转基因植物进行差异性比较分析的首选技术。通过对转基因植物和相对应的非转基因亲本植物之间的基因表达差异分析,可以判断转基因植物中的外源基因非预期效应的有无和大小^[2]。

GMOCARE 研究小组以表达序列标签(EST)为靶标探针,对 3 种转基因番茄品系的基因表达进行了 cDNA 微阵列分析。结果显示,与非转基因的亲本植物相比 3 种转基因番茄品系的基因表达都出现了明显变化。在对 2 种转基因拟南芥品系进行的分析中,也发现了相同的情况。研究小组已经从转基因拟南芥差

异表达的 cDNA 中选择了 150 种 DNA 片段进行测序,目前正通过 NCBI 等数据库对这些差异表达的基因进行序列比较,并对这些基因的功能进行进一步分析,更深入的研究目前仍在进行中^[8]。

利用基因芯片技术可以比较方便地检测转基因植物和非转基因植物的基因表达差异谱,找出二者之间差异表达的基因,为从基因表达水平上分析转基因植物食品中外源基因的非预期效应提供了基础。芯片技术虽然具有高通量等优点,但是利用芯片技术分析转基因植物中外源基因的非预期效应仍然有一定的局限性。例如,由于受到可利用的靶标探针数量的局限性,在大多数情况下利用基因芯片技术并不能检测转基因植物和非转基因亲本植物的全基因组表达差异情况,因此对于转基因植物中外源基因的非预期效应引起的基因表达差异存在着漏检的可能性。由于转基因植物中外源基因非预期效应的不可预见性,因此在基因芯片靶标探针的选择上也具有一定的盲目性。

通过将其他一些分析技术和基因芯片技术联用,可以克服利用基因芯片技术检测转基因植物中外源基因非预期效应所存在的不足。例如,在选定的靶标 DNA 范围内,用基因芯片技术检测转基因植物与非转基因植物的表达差异谱,同时利用 mRNA 差异显示技术在不设定具体检测目标的情况下,全面比较转基因植物和非转基因植物的基因表达差异。2 种方法同时运用,既可以相互验证检测结果,又可以弥补各自的不足。

3 展 望

利用蛋白质组定量分析技术和基因芯片技术可以从蛋白质和 mRNA 水平对转基因植物和非转基因植物的基因表达差异进行高通量分析,是目前检测转基因植物中外源基因非预期效应比较理想的技术^[2]。蛋白质组和基因芯片分析技术的重点是比较材料之间基因表达差异,即测定转基因植物和非转基因植物之间基因表达的相对丰度。为了保证检测结果的准确

性,必须建立一套稳定的参照系统和一套普遍适用的样品处理和测定操作技术,包括建立标准化的样品采集和预处理方法以及样品中蛋白质和 mRNA 提取的标准化操作方法。植物体内基因的表达容易受外界环境等因素的影响,为了保证利用蛋白质组和基因芯片技术所检测到的蛋白质组和 mRNA 表达差异确实是由转基因植物中外源基因的非预期效应引起,需要对非转基因亲本材料的选择以及植物材料的种植和生长条件严格控制。在上述一系列标准化技术没有建立之前,将蛋白质组定量分析技术和基因芯片分析技术广泛用于转基因植物中外源基因非预期效应的检测是不合适的。因为在没有采用标准化技术的情况下,不同研究者所获得的实验数据可能没有可比性。

利用蛋白质组定量分析技术和基因芯片技术检测转基因植物和非转基因植物之间的基因表达差异时,将不可避免的会产生大量的数据,因此建立科学的数据处理系统对测定结果的分析处理具有十分重要的意义。从转基因植物食品安全性角度来看,人们关心的是转基因植物中基因表达差异对植物代谢途径和代谢产物包括营养物质和有害物质含量的影响。因此,随着相关数据的积累,有必要建立一种用于转基因植物中外源基因非预期效应分析的专用数据库。与传统的基因和蛋白质组数据库相比,这种专用数据库的特点是帮助研究者根据转基因植物和非转基因植物的基因或蛋白质组表达差异的测定结果,快速找出由此引起的代谢途径及代谢产物的变化,从而实现对转基因植物中外源基因非预期效应的大小极其安全性进行准确判断。

建立一套科学合理的转基因植物中外源基因非预期效应检测技术,不但有助于对转基因植物的安全性进行科学评价,同时也是对转基因植物中外源基因非预期效应的分子生物学基础进行深入研究的基本手段。随着蛋白质组和基因组分析技术研究的深入,新的分析技术不

断涌现,对完善转基因植物食品中外源基因非预期效应的检测手段具有积极意义。

参 考 文 献

- 1 Chilton M D, Que Q. Targeted Integration of T-DNA into the Tobacco Genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA Integration [J]. *Plant Physiol*, 2003, 9: 103~107
- 2 Kuiper H A, Kleter G A. The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified foods [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2003, 14:277~293
- 3 Kuiper H A, Kleter G A, Noteborn H P J M et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods [J]. *Plant Journal*, 2001, 27: 503~528
- 4 Halford N G, Shewry P R. Genetically modified crops: methodology, benefits, regulation and public concerns [J]. *Br Med Bull*, 2000,56(1):62~73
- 5 Moseley B E. Safety assessment and public concern for genetically modified food products: the European view [J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(1):129~131
- 6 OECD (Organization for Economic and Development). Safety evaluation of Foods Produced by Modern Biotechnology: Concepts and Principles [M]. Paris: OECD,1993
- 7 Griffin T J, Gygi S P, Ideker T et al. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Scerevisiae* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1 (4) : 323~333
- 8 Project 30-Months Interim Progress Summary: GMOCARE, available (2003) at <http://www.entransfood.com/RTDprojects/GMOCAR/aboutgmocare/aboutgmocare.html>.
- 9 张国安,许雪姣,张素艳. 蛋白质组的分离与分析及其应用进展[J]. *分析化学*, 2003, 5:345~349
- 10 Patton W F. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2000,21(6): 1 123~1 144
- 11 Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technolgh [J]. *Proteomics*, 2001, 1(3): 377~396
- 12 Schena M, Shalon D, Heller R et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1996, 93:10 614~10 619

Molecular Detection of the Unintended Effects of Transgenic Foods

Xu Maojun

(College of Food Science and Biotechnology and Environmental Engineering,
Hangzhou University of Commerce, Hangzhou, 310035)

ABSTRACT The unintended effect of the foreign gene in transgenic plant foods is one of the main safety issues of the genetically modified crops, which may result in the changes of the contents of nutrients and metabolites, and even produce some new toxins. The unintended effects of the transgenic plants cannot be detected accurately by the targeted single compound analysis methods, mainly because the unintended effects are unpredictable. The non-targeted quantitative analysis technologies of proteomics and DNA microarray are the powerful methods to detect the unintended effects by comparing the differences of proteomics and gene expression between transgenic plants and their parent lines. The current status of the approaches applied to detecting the unintended effects of the foreign genes were reviewed.

Key words transgenic foods, unintended effect, proteomics, gene chip, detection

(上接第 77 页)

The Effect of Five Chemicals on the Growth of Mycelium and Production of Exopolysaccharide from *Schizophyllum Commune*

Hao Limin^{1,2} Deng Guifang¹ Li Zheng^{1,2} Sun Jinxu¹
Sun Yanfang¹ Gao Hong³ Yang Zeyi³ Jia Shiru¹

1(The Lab of Biochemistry Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222)

2(The Quartermaster Equipment Institute of the GLD of PLA, Beijing, 100010)

3(National Research Institute of Sports Medicine, Beijing, 100029)

ABSTRACT The effect of V B₁, NAA, Oleic acid, CMC and L-Glu on the growth of mycelium and production of exopolysaccharide was studied. The results showed that 0.5mg/L V_{B1}, 0.2mg/L NAA, 0.1% Oleic acid, 0.6% CMC, 1000μg/L L-Glu in the medium can remarkably enhance the growth of mycelium and production of exopolysaccharide. It is found that there is positive relativity between the mycelium and production of exopolysaccharide.

Key words schizophyllum commune, polysaccharide, biomass, mycelium

信息窗

日本一家公司开发芝麻乳加工新技术

日本一家公司开发出了一种新型芝麻乳加工新技术。该项技术是在芝麻中加入2%~4%的大豆乳,分离大豆蛋白或浓缩大豆蛋白等辅料,然后磨碎成糊状、加水、均质、过滤、除杂,再经高温瞬间杀菌制成。

芝麻营养价值高,但芝麻制成芝麻乳时,由于芝麻蛋白的水溶性差,使芝麻乳化液不稳定,在加热杀菌时乳化颗粒常常被破坏,极易出现分离、凝聚现象。新技术则克服原有加工技术的不足,制得的芝麻乳,不仅香味佳,质量好,且兼有芝麻与大豆双重营养,氨基酸效价更高。