

文章编号:1005-8737(2000)01-0099-04

·综述·

转基因水生生物研制及其安全问题

The research and produce of transgenic aquatic organisms and its safety issues

李思发

(农业部水产增殖养殖生态、生理重点实验室,上海水产大学,上海 200090)

LI Si-fa

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China)

关键词:转基因水生生物;研制;安全性

Key words: transgenic aquatic organism; research; safety

中图分类号:Q958.83

文献标识码:A

70年代以来,基因工程技术的应用打破了生物进化形成的遗传壁垒,使生物学家能够将特定的遗传基因,经过修饰和改造,导入同种、近缘、甚至远缘物种的基因组中,按设计者的意愿创造具有特定表型的生物体,或者产生自然界非常珍稀的生物产品。通过基因转移创造的具有重要经济价值的各种动物、植物和微生物,将逐步进入社会。另一方面,转基因生物体的研制与利用逐渐引起了人们对环境和人类自身安全性的关注。

转基因植物自1983年问世,到第1例商品化转基因植物1994年获得批准,历时仅11年;至1997年1月31日,商业化转基因植物在美、加、澳、日分别有17、18、4和7例,中国于1998年1例。转基因动物进展神速,特别在利用转基因动物作为生化医药“工厂”方面。比较起来,转基因水生生物从研究到商业化的步履较为艰难,世界首例转基因鱼于1985年在我国问世,1997年批准中间试验,历时12年,尚未进入商业化;在其它国家也尚未见有进入商业性生产的确切报道。作为开展转基因研究较早的领域,预计今后5年内将有若干种转基因水生生物投入商业性生产而进入市场,并不可避免地进入天然水体。由于水域环境的流通性和水生生物的游动性,转基因水生生物的安全性研究非常紧迫。

本文拟报告和讨论两个问题:(1)转基因水生生物研制成就及“瓶颈”问题;(2)转基因水生生物的安全工作现状和建议。本文题目中使用“研制”一词,意在就有限篇幅,强调“研”是为了“制”,“制”是为了“用”,着眼于21世纪。

收稿日期:1999-05-21

作者简介:李思发,男,上海水产大学首席教授。

1 转基因水生生物研究成就及“瓶颈”性技术问题

1.1 成就

基因转移研究的兴起和蓬勃开展,是基因克隆和基因转移技术发展和完善的必然结果。1982年美国Palmiter等^[1]将大白鼠生长激素基因转移到小白鼠受精卵中,获得了比正常小白鼠大1倍的“超级”小白鼠,引起了遗传育种学家的浓厚兴趣,振兴了动物基因转移育种的研究,转基因羊、猪、牛、兔及鱼等相继问世。

与其它脊椎动物相比,鱼类具有怀卵量大、体外授精和发育、胚胎操作简单、可对多种高等动物生长激素作出反应等优点,是研究基因表达和调控等基本分子生物学问题的理想材料;同时,培育高产、优质及抗逆的鱼类新品种也迫切需要基因转移等新技术和手段。80年代初以来,国内外许多实验室相继开展了转基因鱼研究,并已相当普及^[2,3]。

在我国,从1984年起,中国科学院水生生物研究所朱作言等^[4,5]将冠以小鼠重金属螯合蛋白基因启动和调控顺序的人生长激素(GH)基因导入金鱼受精卵,培育出世界上第1批转基因鱼,并进一步研制了转基因鱼形成的理论和研究模型。中国科学院发育生物研究所、动物研究所、青岛海洋研究所、厦门海洋研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所、黑龙江水产研究所、淡水渔业研究中心,以及青岛海洋大学等相继进行了鱼类基因转移研究。

在国外,美国、加拿大、英国、法国、爱尔兰、德国、以色列、日本、挪威、印度、印度尼西亚、匈牙利、马来西亚、泰国及俄罗斯的数十个实验室先后开展了鱼类基因转移研究。法国的Chourrout等^[6]及英国的Maclean等^[7]将人生长激素基

因转移到虹鳟,日本的 Ozato 等^[8]将鸡晶体蛋白基因导入鳙鱼,爱尔兰的 McZvoy 等^[9]把半乳糖苷酶基因转入大西洋鲑,德国的 Brem 等^[10]将人生长激素基因转移到罗非鱼,加拿大的 Fletcher 等^[11]把美洲拟鱈抗冻蛋白基因转入大西洋鲑,Devlie 等^[12]把抗冻/生长基因转入银大麻哈鱼,美国的 Dunham 等^[13]把人的生长激素基因转移到鳗鱼, Gross^[14]把牛的生长激素基因转移到狗鱼等。

早期的转基因鱼研究使用的基因多为人、牛、鼠等哺乳动物的 GH 基因,重组基因的启动子也多来自小鼠重金属螯合蛋白基因或病毒基因。这样的转基因鱼使消费者由于从心理和伦理上难以接受,加上转移基因的定点整合技术不过关,已获得的转基因鱼都没有形成一个遗传上稳定的品系,在短期内定向培育性状优良、遗传稳定鱼类新品种的期望一时难以如愿,而转基因鱼的安全问题又日益被人们所关注。90 年代以来,鱼类基因转移研究的热潮有所冷却,在美国等发达国家尤其如此。

为达到鱼类之间的基因转移,我国学者首先提出构建“全鱼”基因的设想,并于 1989~1992 年间先后分离和克隆了鲤、草鱼肌动蛋白基因(CA)和草鱼生长激素基因(gcGH)及其 cDNA,将草鱼 CA 基因 5' 端启动调控区与 gcGH 基因 3' 端下游结尾区组成鱼类基因高效表达载体 pCAz,再与 gcGH 结构基因区段或其 cDNA 顺序重组,构建出全部由我国鲤科鱼类基因元件组成的“全鱼”GH 基因重组体 pCAgcGH^[15]和 pCAgcGHc,并应用于转“全鱼”基因鱼的培育,获得了生长速度提高 20%~30% 的鲤和银鲫。黑龙江水产研究所获得了转大麻哈鱼生长激素基因鲤^[16]。与此同时,国外亦构建成功鲑科鱼类“全鱼”GH 基因,并证实了“全鱼”GH 基因在受体鱼中的促生长作用。“全鱼”GH 基因的构建和应用,无疑使转基因鱼向实用化迈出了重要一步。

90 年代以来,先后进入中试阶段的转基因鱼有美国的斑点叉尾鲟^[17],中国水生生物研究所的转 GH 鲤和黑龙江水产研究所的转大麻哈鱼 GH 鲤等,中试结果尚未见报道。另外,转基因海胆和海藻等的研究也在进行之中,其主要目的在于探讨外源基因在胚胎发育过程中的整合、表达和行为,由此研究发育生物学和分子生物学的基础理论问题。近几年,转基因藻类的应用研究也有所进展^[18]。预计在国内外将有更多的转基因水生生物陆续进入中试阶段。

1.2 转基因水生生物应用潜力和有待解决的问题

1.2.1 应用潜力

(1)快速育种 传统的品种选种需经过多代反复选种交配才能育成优良品种。转基因技术有可能在很短时间内超越自然界亿万年生物进化历程,创造自然界原来没有的品种或品系,这是常规育种难以办到的,故此引诱力极强。

(2)改良养殖性能 如加快受体的生长、提高饵料利用率及抗逆性等。不少试验表明,转基因鱼生长速度可提高 11%~30%^[12,13,15,19],即所谓“超级鱼”。但这些结果多为实验室环境所得,尚待养殖生产环境的检验。有的转基因鱼

可提高饵料利用率^[20],有的则表现出耐寒或耐热、耐低盐度或高盐度、耐高浓度重金属、耐污染物以及耐缺氧等,产生耐逆性较强的鱼。如 Chatakondi^[21]的研究初步表明,转有虹鳟生长基因的鲤表现出较好的耐低氧性和抗病力。

(3)生产医药生物制品 通过转基因水生生物来生产生物活性物质(bioactive ingredients)以满足医药需要,生产对外来物质呈阳性的反应器的鱼(bioreactors)以满足医疗的需要,研制携带人类胰岛素的转基因鱼以提供胰岛素的研究^[22]也开始引起了人们的重视。

以上均为常规育种难以办到的特定性状的定向选育,是渔业科技工作者们梦寐以求达到的。

1.2.2 有待突破的“瓶颈”性技术 10 多年来,转基因水生生物研究虽有很大进展,但进展并不如人意。虽然我国有两种转 GH 鲤已投入生物安全性评价研究,但国内外至今尚无商业性生产的事例,虽有个别宣传性报道说,转基因鲑在苏格兰和爱尔兰已大量生产,在美国已开始养殖,但未见有科学报道。这同以下问题尚待解决有关:

(1)外源基因在受体鱼中的定点整合 目前所能导入的基因尚属随机,“子弹”(目的基因)和“靶子”(基因定点)尚不能预先精确设定,整合率和表达率低。

(2)外源基因在受体鱼中的可控表达 由于导入的基因属随机,在各受体中整合的量及部位不同,又缺少调控手段,外源基因在受体鱼中的表达也是随机的。产出的转基因鱼的畸形众多;特别是在转基因鱼的后代中,各仔鱼具有的外源基因拷贝数不一样,发生分离,优良性状不能稳定。

(3)转基因鱼的培育与繁殖 搞出几条转基因鱼已非难事,但转基因鱼的正常生长、成熟及繁殖,所转移的基因在后代中有效地遗传及建立起有效的繁育群体等,是今后应着重解决的切实问题。

(4)转基因鱼应用的安全问题 转基因鱼释放的安全问题已受到各国政府和人民的广泛关注^[22]。证实转基因鱼应用的安全性,是转基因鱼商品化的前提。

不突破这些“瓶颈”,用转基因技术定向培育人们所期待的优良品种和生物制品、尤其是它们的商业化生产及安全使用就难以实现。

2 转基因水生生物安全问题

2.1 问题的由来

开发自然资源和保护自然环境的矛盾是制约现代社会发展的重要因素之一。人类活动已使许多物种陷入了濒危甚至灭绝的危险境地,物种的大规模灭绝不仅破坏生态系统的稳定性,而且改变地球的生命系统,对农业、工业和人类活动的总体质量产生消极作用。但直到近几年,人类活动导致的这一负面后果才为各方面所关注。保护生物多样性,即保护人类赖以生存的自然环境已成为全世界关注的热点。

水生生物在自然界物质循环和能量流动中起着极其重要的作用,因此,在开发利用水生生物资源的同时,必须保护

水生态环境和水生生物遗传资源不受破坏,维持水生生物多样性和遗传多样性。转基因水生生物的研究和应用也必须符合这一要求。由于目前尚不能精确地预测转基因可能产生的所有表现型效应,基因工程产品对人类及环境的安全性等问题非常严肃地摆在人类面前。

2.2 转基因水生生物安全工作

许多发达国家如美国、澳大利亚、加拿大、德国、日本、挪威等,还有发展中国家如菲律宾、马来西亚,都制订和颁布了有关法规。美国生物安全科学家工作组于1988年制定了“遗传工程生物对生态和人类健康的影响评估手册”。

我国政府对转基因水生生物的安全问题十分重视。国家科委于1993年颁布了《基因工程安全管理办法》,据此农业部于1996年颁布了《农业生物基因工程安全管理实施办法》。这标志着我国已初步将农业生物基因工程安全管理纳入了法制化、规范化管理的轨道。

目前我国正在进行的转基因水生生物安全性评估工作有两项:①“转‘全鱼’生长激素基因鲤、银鲫的中试研究(水生生物研究所)。②转大麻哈鱼生长激素基因鲤的生物安全性评价(黑龙江水产研究所)。有关这两项研究的进展情况,因无有关报告,在此无法评述。

虽然国内外许多国家都制订和颁布了有关法规,由于有关转基因水生生物安全性的研究十分缺乏,这些法规多比较原则和抽象,无量化标准,不易执行。

2.3 转基因水生生物安全性研究主要内容

2.3.1 基因操作过程的安全性

(1)详细了解目的基因的来源、结构、功能和用途,弄清载体的来源、特性,保证使用载体的安全性,熟悉目的基因与载体的连接方法,重组DNA分子结构及复制特性,保证重组体的安全性。

(2)基因转移方法研究,选择有效和安全的基因导入途径,研究目的基因的整合与表达,证实外源基因整合与表达的稳定性。在上述基础上,建立水生生物基因转移的模型,研制转基因水生生物。

2.3.2 评价转基因水生生物自身的安全性 在保证对环境 and 人类健康前提下,评价转基因水生生物自身的安全性。

对受体水生生物进行详细的生物学调查是开展基因转移研究的基础。包括受体水生生物的分布、形态、繁殖及生命史特征,生理和行为特征,生理和代谢特征,物理因子耐受力,食物利用情况,对有毒或有害物质的富集能力,对水环境或水生生物多样性是否有害,以及对致病因子的抗性。

对转基因水生生物能否保持水生生物的原有特征,已经发生或可能发生的正面或负面的效应作出客观评价。

2.3.3 拟接受转基因水生生物的水体的调查 对计划接受转基因水生生物的水体进行生态学调查。包括水生生物区系调查;水生生态系统结构,如物种间相互作用,食物和空间利用情况;水生生态系统演替过程,如与食物链相关的能流和营养模式;水生生态系统的持久性,如现有生态系统结构和种类

组成随时间变化的稳定性等。

2.3.4 转基因水生生物与其它水生生物相互作用

(1)转移基因扩散的可能性;转基因水生生物通过与同种和近缘物种的交配,对野生资源基因库产生影响;

(2)捕食被捕食相互作用;竞争、共生和寄生相互作用;非直接相互作用,如转基因生物通过改变环境条件使之不适合其它物种或种群的生存。

2.3.5 转基因水生生物释放(逃逸)对水生生态系统的影响

水生生态系统经过长期演化,在不受外界干扰的状况下,是遵循一定规律演变的。转基因水生生物个体或群体的介入,可能会干扰乃至打破原有水生生态系统的种群结构和演替进程,或导致水生生态系统的退化。在遗传多样性方面,随着转基因个体的扩散,通过同种之间或相关种之间的交配,转移基因将逐渐渗入水生生态系统的基因库。

2.3.6 转基因水生生物遗传安全性研究 转基因水生生物所获得的新基因及其相应的表达能否稳定地遗传,而且对其后代有无不良影响?如何借助倍性育种、性别控制等技术使新获得的新基因及其相应的表达稳定地遗传下来?在没有突破上述转基因技术的“瓶颈”之前,这类问题尚难入手,但须及早考虑,及时进行。

2.3.7 转基因水生生物的食用安全性 转基因水生生物只有保证对人类健康有益无害,才能实现其价值。为此,必须开展转基因水生生物营养学和消费安全性研究。

2.3.8 转基因水生生物的扩散及防范措施

(1)扩散途经 转基因水生生物的扩散主要由人类有意或无意造成。有意的如有目的放养、引种及驯化;无意的如通过航运将水生生物从一个水域携带到另一个水域,或由于开挖新的水运渠道,为水域间水生生物的迁移提供新通道,或国家、地区间的贸易往来,或自然灾害造成的逃逸等。

(2)防范措施 转基因水生生物投入实际应用之前,逃逸是其主要的扩散途径,而逃逸的因素很多。为防止逃逸个体在水生生态系统中产生不良影响,研究者需谨慎选择安全性良好的饲养场所,设置有效的防逃设施,制定严密的防逃措施。在非常情况下,可利用物理或化学方法,处理进出水,使有可能逃逸的转基因水生生物及时地全部消灭。

2.3.9 转基因水生生物商品化的社会认可 可以预见,由于生物技术的飞跃发展和各国的竞相投入,各种转基因生物将大量研制出来并力图尽速投入商业化生产。然而,自进化以来依靠自然生物而生存的人类,对陌生的转基因生物作为食品或药品尚无思想准备,心存疑虑。倘若面对含牛基因的鱼时,敢不敢吃?爱不爱吃?即使某转基因水生生物的食物安全性被证明无虞,其对生态和环境无负面作用,通过立法保证安全生产和安全食用;而当千百种转基因生物出现在市场上时,逐一甄别和管理其安全性谈何容易!况且,受历史、文化、理论、种族及宗教等因素的影响,公众对转基因水生生物商品的接受尚须时日。

3 建议

(1)宣传要适当 无疑,转基因水生生物具有极大的应用潜力,必须大力倡导研究。但切忌把“潜在的”误导为“现实的”,以免决策者和研究者的躁动和盲动。

(2)充分考虑水生生物和水域环境的特点 水生生物的生殖隔离远较陆生生物困难,同近缘野生种的可交配性也强得多。故转基因水生生物的安全性评估必须充分考虑水生生物的生物学特性和水域环境的水文特点,转基因水生生物的研制和开发利用应有自己独特的技术路线和运转周期。

(3)加快安全性基础研究 只有从生物科学、环境保护、政府管理以及消费心理等多方面进行安全性基础研究,才能为转基因水生生物的安全生产和安全消费开辟康庄大道。

(4)健全转基因水生生物研究许可及开发利用申报制度 建立转基因水生生物研究许可制度。凡承担转基因水生生物研究和开发利用的组织和个人,必须对转基因技术的安全问题有充分认识,具备一定的条件和配套技术。转基因水生生物的中试开发和商业化生产,必须经专家严密评估和权威机构审批后才能实施,并有严密的、持续的监督检查制度。

(5)迎接转基因生物产品的国际性竞争 可以预料,随着转基因技术的成熟和相应工艺的发展,不少转基因产品将象工业品那样在流水线上大量生产出来,不仅将不分国别地对千万年来人们对天然生物产品的消费习惯和伦理形成巨大冲击,而且将引发国家间在技术垄断和产品推销上的经济战和政治战。目前,美欧转基因产品贸易战已箭在弦上。我国只有在转基因生物研制和安全保障问题上予以同样的重视,才能在未来的竞争中立于不败之地。

参考文献:

- [1] Palmiter R D et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes[J]. Nature, 1982, 300:611 - 615.
- [2] Chen T T, et al. Transgenic fish: ideal models for basic research and biotechnological applications[J]. Zoological Studies, 1995, 34: 215 - 234.
- [3] Dunham R A. Utilization of transgenic fish in developing countries: potential benefits and risks[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1999, 30(1): 1 - 11.
- [4] Zhu Z Y, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Z Angew Ichthyol, 1985, 1: 31 - 34.
- [5] 朱作言, 等. 转基因鱼模型的建立[J]. 中国科学(B辑), 1989, 2: 147 - 155.
- [6] Chourrout D, et al. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdner*) by microinjection into egg cytoplasm[J]. Aquaculture, 1986, 51: 143 - 150.
- [7] Maclean, et al. Introduction of novel genes into fish[J]. Bio Technology, 1987, 5: 257 - 261.
- [8] Ozato K, et al. Production of transgenic fish: Introduction and expression of chicken δ - crystallin gene in medaka embryos[J]. Cell Differ, 1986, 19: 237 - 244.
- [9] McEvoy T, et al. The expression of a foreign gene in salmon embryos[J]. Aquaculture, 1988, 68: 27 - 37.
- [10] Brem G, et al. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 1988, 68: 209 - 219.
- [11] Fletcher G L, et al. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1988, 45: 352 - 357.
- [12] Devlin R H. Extraordinary salmon growth[J]. Nature, 1994, 371: 209 - 210.
- [13] Dunham R A. Genetic engineering in aquaculture[J]. Ag Biotech News and Information, 1990, 2: 401 - 405.
- [14] Gross M L. Molecular analysis and growth evaluation of northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone gene[J]. Aquaculture, 1992, 103: 253 - 273.
- [15] Zhu Z Y. Growth hormone gene and the transgenic fish. Agricultural Biotechnology [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992. 106 - 116.
- [16] 孙效文, 等. 全鱼基因工程鱼的构立[J]. 高技术通讯, 1993, 3 (9): 23 - 26.
- [17] National Biological Impacts Assessment Program. Transgenic catfish study approved[J]. NBIAP News Report, April, 1992. 1.
- [18] 王希华, 等. 中国科学院海洋研究所海藻分子生物学与基因工程研究进展[J]. 海洋科学, 1995, 1: 18 - 19.
- [19] Zhang P J, et al. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV - rainbow trout - GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) [J]. Molecular Reproduction and Development, 1990, 25: 3 - 13.
- [20] Chatakondi N G, et al. Performance of F₂ transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing pRSVrtGH, cDNA subjected to low dissolved oxygen. Abstract, Proceeding of the American Association for the Advancement of Science [J]. Scientific Innivative Exposition, 1995.
- [21] Chatakondi N G. The effect of rainbow trout growth hormone gene on the morphology, dressing percentage and condition factor in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Proceedings of the Fifth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1994, 17: 481 - 484.
- [22] Hallerman E M, A R Kapuscinski. Ecological and regulatory uncertainties associated with transgenic fish[A]. In: C Hew, G L Fletcher. Transgenic fish[C]. Singapore: World Scientific Publication Company, 1992, 209 - 228.