

基改植物安全評估(一)

抗藥性基因

自一九八三年以來，利用生物技術來生產對農業與人類有用的生物，即成了一種新興的科技。藉由分子生物的方法，把重組的DNA轉殖至一特定的細胞中，改變細胞或分子的遺傳物質，再藉由組織培養技術使該轉型細胞發展成一個個體。例如含殺蟲蛋白的基改玉米，抗殺草劑的基改大豆，抗病毒的基改木瓜等。因此消費大眾對這些經由生物技術得到的基因改造植物 (Genetically modified plants, GMP) 之食用安全性與對環境生態的安全性，非常關切。因此本文先介紹環境生態安全評估項目之一的抗藥性基因移轉供各位讀者參考，其餘與基因改造生物相關的生物安全資訊，將在日後陸續介紹。

基因改造植物在田間種植

後，其所攜帶的轉殖基因DNA就有可能因花粉的散布，或因作物的農事操作或收成而使轉殖的DNA進入與其相近的植物中，或隨植體進入土壤中，使得轉殖的基因在環境中累積，增加在土壤中進行水平移轉的機會。

基改植物本體的生長與根系的分泌物，亦有可能對其附近的環境造成生態的改變，替換及對其他生物的影響。例如使物種得到新的特性，改變了基因表現與內生性基因活性等，使物種雜草化，使環境中昆蟲抗藥性增加，或基因水平移轉，使土壤微生物增加對抗生素的抗藥性等。因此國際間對於基改作物所攜帶的轉殖基因的宿命是非常關切的。

基因水平移轉其實是自然界中常見的現象，對於真核

生物與原核生物上的演化，基因水平移轉是一個很重要的機制。特別是對於真菌的演化，基因水平移轉的重要性有可能更高於其他真核生物。

在基改作物中使用的標示基因中以具抗生素抗性的基因最常用，也特別引起注意，曾有報告指出約有84%的基改作物使用可使抗生素卡那黴素 (Kanamycin)，新黴素 (Neomycin) 失效的npt基因 (Neomycin phosphotransferase gene)。因此對於基改作物所轉殖的抗藥性基因與土壤中微生物間的基因水平移轉等研究，特別是對人，畜可致病，且需使用抗生素來治療的病原性細菌間的基因移轉是必要的(表一)。

世界衛生組織與聯合國農

表一、基改作物中使用的抗藥性標示基因及其在國內外可能使用的情形

抗藥性基因	抗生素	用途
nptII	Kanamycin	全身性發炎，為小兒科用藥，毒性較Neomycin低很多，作為Gentamycin替代藥。也使用於嚴重性的系統感染，且其他抗生素無效時。 第一線用藥，作用與Kanamycin相同，但毒性較強，亦為畜牧用藥。
	Neomycin	
bla	Ampicillin	第一線用藥，廣泛用於呼吸道，胃腸道，尿道，敗血症，細菌性腦膜炎。亦為畜牧用藥。

糧組織 (World Health Organization / Food and Agriculture Organization, WHO/FAO) 在二一年發表數篇報告，針對基改作物中使用的抗生素基因有一個原則上的建議：對這些抗藥性基因的橫向移轉至環境中病原性微生物上，及可能在臨床上的意義是必須評估的。因DNA無論其來自基改植物或來自環境進入勝任細菌中的機會均相近。

美國環保署 (USEPA) 在基改作物審查初期時並不主動要求廠商提供有關微生物間的基因移轉報告，因早期認為DNA在土中不殘留，容易為環境中所分解。但由於新的研究報告指出轉殖基因在土中可殘存四十天至一百八

十個月以上。而這些殘留在土中的轉基因，仍具活性可進入原核生物的基因組中，造成基因水平移轉鏈。在美國如農藥殘留在土中的半生期 (Half-life) 超過三十天以上，環境衝擊指數就進入有害的領域。所以美國環保署近年來開始要求廠商提供有關轉殖基因在環境中的宿命的報告。

細菌基因移轉

一般原核細菌在自然界中的移轉頻率，約在 10^{-2} - 10^{-9} 之間 (Lorenz and Wackernagel, 1994a)。在土壤微生物中，下列九種細菌曾被報導可在自然環境中進行基因移轉：
Achromobacter、

Acetobacter、*Bacillus*、*Haemophilus*、*Moraxella*、*Micrococcus*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、及*Halobacterium*等九種。細菌進行基因移轉的環境如不同，其移轉頻率也會有不同。

基改植物標示基因

標示基因的目的為供確認細胞是否成功轉入目標基因。使用的標示基因主要有兩種：選擇基因 (Selection gene, 或Selectable marker gene) 及報告基因 (Reporter gene)。外來基因的移轉雖可藉由農桿菌轉型 (Agrobacterium-mediated transformation)，粒子槍

(Particle gun), 微量注射 (Microinjection), 或原生質轉型 (Protoplast transformation) 等技術進行基因移轉, 但這些基因轉殖的成功率不是非常高。因此為了提高獲得已成功完成基因轉殖的細胞株的效率, 通常在做基因轉殖的同時也植入了另一組特定的基因 (Co-introduced with the gene-of-interest), 這一組特定基因就是標示基因。它的目的就是將經完成轉型的基改細胞 (Transgenic cell) 培養於含抗生素或抗殺草劑的選擇性培養基中培養, 篩選存活的細胞, 以簡便快速的自大量未完成基因移轉的細胞 (無抗性) 中挑選數量微少但已完成基因移轉事件的細胞 (具抗性)。因植入的特定基因可使完成基因移轉事件的細胞或植物在此選擇性的環境中表現, 存活及增殖, 而未完成基因移轉事件的細胞在這一特定的環境中不能生存。

標示基因又因其作用可再細分成四種。

第一種為具抗生素抗性的

選擇基因, 最常用的是使抗生素失效酵素基因, 如可使卡那黴素(Kanamycin), 新黴素(Neomycin), 及Geneticin (抗生素 G418) 失效的酵素 Aminoglycoside-3'-phosphotransferase 【APH(3')_{II}】, 又稱 NPTII 基因 *npt*。使氨比西林 (Ampicillin) 失效的 *bla* 基因。

第二種為對廣效性殺草劑具抗性的基因, 例如可抗固殺草 (Glufosinate) 及畢拉草 (Bialaphos) 的 *bar* 基因與 *pat* 基因, 及可抗嘉磷塞 (Glyphosate) 的 *epsps* 基因。抗殺草劑的基因有時也是基改作物設計時的目標基因。

第三種為代謝性基因, 植入的基因與植物的代謝相關。

第四種為報告基因。報告基因是為了監控基因是否成功地完成移轉至受體基因組上而設計的, 報告基因通常會導致受體宿主內增加一種酵素活性, 而這酵素活性原本是不存在於受體宿主內的。對於比較不容易轉移基因的植物而言, 加入報告基

因就有助於基因移轉的確認, 目前較常用的報告基因是 *uidA (gus)* 及 *gfp*。

依經濟合作暨開發組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 的報告指出最常用的標示基因前三名為 *aphA2 (nptII)*, 次為 *bar*, 其次為 *pat*。其中又以 *aphA2* 基因最常用於基改作物上。

nptII 基因成為最常用的抗藥性選擇基因, 最主要的條件是這個抗藥性基因在環境中有的背景值很低, 在土壤本身原生的族群中不太可能發現 *nptII* 基因序列及 Tn5 DNA 序列。在荷蘭與德國的農地土壤中的抗 Kanamycin 之細菌一百五十株均不含 *nptII* 基因, 顯示 *nptII* 基因在土壤環境中的零背景值。

抗藥性基因水平移轉與對環境之安全評估

英國在一九九六年不同意 Ciba-Geigy 基改抗蟲玉米用於動物飼料的申請, 因這基

表二、化學農藥與基改植物之基改蛋白在生物安全與環境安全評估的比較：

項目	化學農藥	基改植物表現蛋白
1.組成	物質簡單, 明確, 可大量取得	基改蛋白微量存在植物體內, 不易取得
2.高劑量	高劑量可造成效應	最大劑量不易明確, 且未必與效應相關
3.吸收量	容易估算	不易估算
4.急毒性	容易判斷毒性程度	不易產生或判斷
5.營養	與營養無關	與營養相關
6.代謝途徑	途徑特殊容易了解	複雜
7.殘留	可以, 如化學農藥為非自然物	不易, 因表現蛋白與自然蛋白理化性接近
8.因果關係	相當明確	複雜

改玉米含有完整的 β -lactamase 基因及來自 pUC18 載體的啟動子與複製起點 (*ori*)。不同於在自然界中常見的載體 (在一個細胞中可產生四至十八個複本), 本品系使用之載體可在一個細胞中產生超過六百個複本。因此英國農部 (MAFF) 認為這種基改玉米對人畜與環境的安全是有一定程度的風險。

在環境中基因水平移轉大致有下列四種: (1) 經由植物花粉轉入另一種植物, (2) 由微生物轉入不同種類微生物, (3) 微生物轉入植物, 及 (4) 由植物或動物轉入微生物。其中轉型 (Transformation) 的機制對植物 DNA 進入微生物, 特別是細菌很重要。例如枯草桿菌

及單棲氮固菌可吸收與其本身 DNA 序列無關的 DNA 碎片。基改植物基因移轉頻也會因玉米根部分泌物的刺激而增加。

雖然基因移轉頻率低。然而在一般土中微生物的含量約為 10^7 /克土, 如移轉頻率為 10^{-12} , 則在每克土中, 可能就有 10^{-5} 轉型成功的微生物, 如經過一個演化時間後, 就可能對環境產生了影響。

基改植物的管理可分成三個階段, 第一個階段是基改植物本身的遺傳特性, 表現與食用安全。第二個階段是基改植物對環境的安全性。第三個階段是產品上市後的安全追蹤 (食用安全與環境安全)。藥試所自二二年

即開始進行抗藥性轉基因在環境中的安全性評估試驗, 目前試驗仍在進行。

結語

生物技術是一個新興的科技, 且研發成果多樣化, 使得政府管理的措施不易配合。美國環保署初期比照農藥管理的方式進行, 但隨即面臨到一個問題, 就是不易得到足量的有效成分進行各項安全測試。例如農藥是一個簡單明確的分子, 可大量取得。而基改植物的有效成分則是一種蛋白質, 以微量方式存在植物體內 (表二), 例如 *B.t.k.HD-1* 蛋白在基改作物上的含量約為 11.4 微克/克 (11.4 ppm, w/w), 因此

表三、不同來源之基改蛋白對昆蟲之急毒性 (ng / cm²)

來源 昆蟲	微生物	基 改 植 物
A	0.5	0.5
B	2.0	2.0
C	2.5	2.5
D	50	15 (最大劑量)
E	70	25

(本表數據經修改)

不易得到足量純化的蛋白質進行與農藥般相同規格的毒性安全與環境安全測試。

如以微生物方法產製以得到大量的表現蛋白，又引起許多爭議，兩者是相同 (Identical)，相近(實質等同，Substantially equivalent)，或不同？例如某公司生產的基改作物在進行昆蟲毒性測試時發現，兩種不同來源之毒蛋白進行的急毒性測試有二種結果。對昆蟲 A, B, C 而言，兩種來源之蛋白毒性相同，但對昆蟲 D, E 而言卻有相差近三倍的急毒性反應 (表三)。這結果顯示，對 A, B, C 三種昆蟲而言，來自微生物增量的毒蛋白與來自基改植物的毒蛋白是相同的，但對 DE 兩種昆蟲而

言是不同的，為何昆蟲對這些毒蛋白的反應有不同？不同來源的毒蛋白對人類或其他哺乳類的毒性測試要如何知道結果之正確性？這些差異造成基改植物管理上的不確定性。

因此基改植物管理上有效成分的取得在國際上形成了很重要的爭議，也同時由於有爭議，導致對隨後的食用安全，環境安全的評估也有了爭議。有人接受，有人存疑。至於管理制度上有多

表四、農藥使用與禁用時間

農 藥	使用年	禁用之指標項目
滴滴涕 (DDT)	1944 1972, 28	長效性環境污染
克氯苯 (Chlorobenzilate)	1952 1983, 31	致癌性
亞拉生長素 (Daminozide)	1962 1990, 28	致腫瘤性
巴拉松 (Parathion)	1946 1997, 51	極劇毒，致癌性C級
一品松 (EPN)	1949 1998, 49	極劇毒，遲發性神經毒

經驗的農藥，有些也是在使用了五十一年後才找到適當的指標項目 (Indicator) 予以禁用 (表四)。

基改植物的管理自第一個基改番茄在一九九一年八月十二日向美國藥物食品檢驗所 (USFDA) 申請許可使用於食品後，迄今美國的基改作物的管理經驗進入第十四年，與農藥登記審查的近六十年經驗相比 (一九四七到二 五，五十九年) 仍有許多需改善的。因此藉由一件一件的個案 (Case by case) 累積經驗，及邊作邊修改是必然的。例如對食用安全性之評估項目過敏原的鑑定，早期是以在人工消化液中穩定的時間長短作為過敏原的依據。但引起爭議後，則改以更多的測試項目來評估過敏

表五、美國EPA對基改植物的風險評估與註冊登記審查之費用估算

項 目	美金(千元)	臺幣(1:32) (千元)
基本資料(殘留, 宿命, 急毒性, 消化等)	20	640
環境宿命(研究)	735	23,520
人類安全與哺乳類急毒性	1,667	53,344
非目標生物	411	13,152
註冊登記, 資料審查 (21個月以內)	420	13,440
合 計	3,253	104,096

性。對環境安全性之評估項目，早期著重在基改蛋白在環境中之宿命，現在則增加基改基因在環境的宿命調查。臺灣對於基改植物的管理才剛起步，在可預見的將來仍需投入更多人力，經費 (表五)，及工作項目，但只要持續去做，終將會整理出比現在更好的指標項目群 (Indicators)，及更適當的評估技術與結論。

基改生物的管理本身是一個技術應用，工作量大，且價值不易突出的服務工作。國際上對基改作物進行的各種指標項目調查雖然經常的結論是：基改與非基改間無顯著差異；有改變，但為暫時性；或此改變無顯著差

異。但隨著指標項目群的增加，累積的經驗愈多，基改植物的安全性評估也就會愈接近完善。目前臺灣也注意到這問題，有關基改生物安全管理的經費也陸續調整增加，這對於未來基改生物的生物安全評估，對人畜的健康，及對其他生物的影響調查是很有幫助的。

