



85种转化基因的过敏原性生物信息学评价

邹泽红^{①*}, 何颖^{①*}, 阮林^{①*}, 孙宝清^{①②}, 陈惠芳^①, 陈德^①, 刘世明^①, 杨晓光^③, 陶爱林^{①†}

① 广州医学院第二附属医院, 呼吸疾病国家重点实验室变态反应研究室, 广州市过敏反应与临床免疫重点实验室, 广州 510260;

② 广州医学院第一附属医院, 广州呼吸疾病研究所, 广州 510120;

③ 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: aerobiologiaTao@163.com

2011-06-10 收稿, 2011-12-19 接受

国家科技重大专项(2008ZX08011-005, 2009ZX08011-004B)、国家自然科学基金(30771240)和广东省医学科研基金(A2008284)资助

摘要 随着转基因生物产品的迅猛发展, 转基因生物的过敏原性已经受到广泛关注, 建立规范的转基因生物过敏原性评价是目前亟需解决的问题. 本文就近年来国内外研究的转基因生物进行了总结, 汇总了 85 个常用转化基因, 涉及 49 种植物转化基因和 36 种动物转化基因; 借助 EVALLER 2.0 软件, 对这些基因的潜在过敏原性进行评价; 同时, 在 Highwire (<http://highwire.stanford.edu/>)文献数据库中检索相关医学文献, 考察这些基因与过敏原性乃至人类健康是否存在关联. 软件分析表明, 其中 5 个转化基因为潜在过敏原基因; 文献回顾发现, 其中 11 个转化基因会引起过敏反应或临床不良反应. 通过本文的分析能够为遗传转化时基因的选择提供重要指导, 为相关转化基因过敏原性分析提供范例.

关键词

转基因生物
过敏原性
转化基因
软件
文献回顾

转基因(genetically modified organisms, GMO)是将其其他生物如病毒、细菌和非食物品种的外源基因甚至是食用品种的优良基因、抗性基因等引入另一食用物种, 或者是目标性状欠佳的另一个品种的一种生物技术. 它突破了种属概念, 具有传统育种技术无可比拟的优势, 因此, 越来越多的转基因生物得到研发和推广. 在转基因生物产生明显的社会效益的同时, 人们对转基因生物的医学安全性的关注也越来越强烈. 在转基因产品商业化应用之前进行安全性评估是消除其负面影响、减轻公众疑虑乃至减少食物不良反应和胃肠疾病的重要途径. 植物和动物作为人们的主要食物来源, 转基因生物产品中的新蛋白是否增加了过敏原性危险、是否增加过敏性疾病或免疫性疾病等问题受到各国政府和民众的高度关注. 如何全面而又准确地评估转基因生物的过敏原性已成为国内外研究与应用转基因生物过程中亟需解决的重要问题.

本文首先就近年来国内外研究的转基因生物进行了总结, 总共收集了 85 种转化基因, 涉及 49 种植物转化基因和 36 种动物转化基因, 在通用数据库中检索其编码氨基酸序列等信息, 采用 EVALLER 2.0 等软件对所得多肽序列的潜在过敏原进行评估, 然后检索各转化基因相关文献, 考察其与过敏原性乃至医学健康是否存在关联, 从而为遗传转化时基因的选择提供重要指导, 为相关转化基因过敏原性分析提供范例.

1 材料与方法

(i) 转化基因数据来源. 在 Highwire, PubMed, CNKI 等公共数据库中检索近年来国内外转基因生物的研究结果, 检索关键词为“genetically modified organism”或者“transgenic organism”, 或中文关键词“转基因”, 并获取相应的全文数据. 同时, 对于针对不同物种所转化的同一基因(即引物序列与基因名称都

相同)的重复数据,选择其中一篇文献作为代表,其余重复文献则不纳入研讨范围。

(ii) 转化基因信息获取. 根据所获得的全文中记录的相应引物及基因名称等信息,在 NCBI 数据库中采用 BLAST 程序得到基因的核苷酸序列及其编码序列,据此在 UniProt 等公共数据库检索深度信息,记录转化基因 Uniprot ID 号,获取含有其氨基酸序列信息的 FASTA 格式的文件。

(iii) 在线过敏原性评估. 打开 EVALLER (<http://www.slv.se/en-gb/Group1/Food-Safety/e-Testing-of-protein-allergenicity/>)网页^[1],进入“Food Safety”中“E-testing of protein allergenicity”页面,采用在线过敏原软件 EVALLER 2.0 分析蛋白质的潜在过敏原性。对于提示具有过敏原性的基因,在返回结果中找到对应的相似序列,在过敏原数据库中进一步确证该过敏原是否已经被公认。表 1 显示目前常用的过敏原数据库。

(iv) 搜集转化基因的医学相关负面文献信息. 以步骤 1(ii)中获得的基因信息的基因名称或其缩写为关键词,在 Highwire (<http://www.highwire.org>)等文献数据库中选择包含 PubMed 形式,进一步检索生物医学期刊的相关记录,对于摘要中有负面信息的文献,下载全文进一步查证后记录在案。

2 结果

2.1 转化基因的收集

在数据库中检索,截止 2010 年 7 月 1 日,汇总得到 85 例转化基因,包括 49 种植物转化基因和 36 种动物转化基因。转化宿主涉及水稻、大豆、小麦、玉米、油菜(含甘蓝油菜)、马铃薯、四倍体刺槐、白三

叶草、棉花、黑麦、番茄、烟草等 13 类植物及猪、牛、羊(包括绵羊和山羊)、小鼠等 4 类动物。就目标基因性状而言,植物转化基因主要涉及抗病、抗虫、抗干旱与盐碱等逆境、抗衰老、耐寒、耐除草剂、改善品质、提高光合效率、提高土壤限量元素的利用率、提高人体缺乏元素的含量等特性;动物转化基因则主要涉及提供防治人类疾病用的药物、改善品质、加速生长等几个方面。各基因的来源、转化宿主及其功能与应用的详细情况见表 2,表 S1 和 S2。例如,表 S1 中的 1 号转化基因细胞周期调节蛋白基因来源于拟南芥,可以用于控制植物的生长与发育。表 2 中的 8 号转化基因人血清白蛋白基因来源于人,转化宿主为羊、牛和猪,主要用于治疗大量失血、烧伤、休克、水肿及低蛋白血症等急症,同时也是多种生物制品、生化试剂的稳定剂和保护剂。

2.2 转化基因的过敏原性在线评估

在文献中找到各转化基因名称及对应的引物,反向引物经互补转换后与正向引物经若干“N”相连以创建一条虚拟序列,在 NCBI 中运行 BLASTN 程序,搜索与虚拟序列匹配的序列,选择起始来源和基因名称均与原文献一致的序列作为目标序列,如此得到了 85 个转化基因的全长编码序列。通过翻译软件获得他们的编码肽,在 NCBI 中运行 BLASTP 程序,确证返回序列为目标基因,至此将该转化基因编码肽录入 FASTA 格式文件。

依据转化基因编码肽进行过敏原性评估。例如,登录在线过敏原软件 EVALLER 2.0 后,在序列录入文本框中粘贴动物转化基因中的人血清白蛋白基因(8 号转化基因,见表 2)的 FASTA 格式序列,过敏原性分析结果显示见图 1 和 2。图 1 中,Query 红色表示

表 1 在线过敏原数据库

数据库名称	网址	参考文献
EVALLER	http://www.slv.se/en-gb/Group1/Food-Safety/e-Testing-of-protein-allergenicity/	[1]
GenPept	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein	[2]
UniProt/SwissProt	http://www.uniprot.org	[3,4]
IUIS allergens	http://www.allergen.org	[5]
Allergen database	http://allergen.csl.gov.uk/	[6]
Allergome	http://www.allergome.org/	[7]
Allermatch	http://www.allermatch.org	[8]
SDAP-structural database of allergenic proteins	http://fermi.utmb.edu/SDAP/	[9]
CSL allergen	http://www.fera.defra.gov.uk/	[10]
FARRP	http://allergenonline.com	[11]

表 2 转化基因的功能与过敏原性或不良反应概述^{a)}

编号	转化基因	英文名	来源	转化宿主	功能与应用	有否过敏原性	有无过敏或不良反应文献	参考文献
1	小麦胚芽凝集素	Wheat germ agglutinin (WGA)	小麦	印度芥菜	抗欧洲玉米螟	是	√	[12]
2	小麦高分子量谷白蛋白亚基	1Dx5, 1Dy10	小麦	黑麦	改良小麦加工品质, 提高烘烤品质	是	√	[13]
3	菜豆几丁质酶	Bchi	菜豆	小麦、甘蓝油菜、油菜	抗白粉病与赤霉病	是	√	[14]
4	植酸酶	Phytase [*]	黑曲霉	玉米、水稻	提高磷的利用率及铁锌的吸收	否	√	[15]
5	溶菌酶	Lysozyme [*]	人	水稻	改善奶品质、提高抗菌力	否	√	[16]
6	Beta-葡萄糖醛酸酶	Beta-glucuronidase (GUS) [*]	大肠杆菌	水稻、大豆、小麦、玉米	报告基因	否	√	[17]
7	核糖体钝化蛋白	Ribosome-inactivating proteins (RIP) [*]	大麦	小麦	抗真菌病	否	√	[18]
8	人血清白蛋白	Human serum albumin (HSA)	人	羊/牛/猪	主要用于治疗大量失血、烧伤、休克、水肿及低蛋白血症等, 同时也是多种生物制品、生化试剂的稳定剂和保护剂	是	√	[19]
9	β-酪蛋白 κ-酪蛋白	Beta casein (CSN2), kappa casein (CSN3)	牛	牛	提高牛奶中乳酪的含量	是	√	[20]
10	植酸酶	Phytase [*]	大肠杆菌	猪	提高对饲料中磷的消化率, 降低猪粪中的磷含量, 环保	否	√	[21]
11	溶菌酶	Lysozyme (LZ) [*]	人	山羊	改善奶品质、提高抗菌力	否	√	[22]
12	胰岛素	Insulin [*]	人	牛	治疗糖尿病	否	√	[23]
13	组织型纤溶酶原激活剂	Tissue-type plasminogen activator (tPA) [*]	人/小鼠	山羊/猪	溶血栓, 用于急性心肌梗塞	否	√	[24]
14	α-抗胰蛋白酶	Alpha-1-antitrypsin (AAT) [*]	人	羊	治疗肺泡纤维化病	否	√	[25]
15	乳铁蛋白	Lactoferrin (LF) [*]	人	羊/牛	可做儿童、老人和免疫功能不全病人的营养品、药品及贫血症病人的药物	否	√	[26]
16	血红蛋白	Hemoglobin [*]	人	猪	获取珍贵人血有效成分	否	√	[27]
17	抗凝血酶Ⅲ	Antithrombin Ⅲ (rhAT Ⅲ) [*]	人	山羊	治疗抗凝血酶缺乏症、预防血栓、止血	否	√	[28]
18	促衰变因子	Decay accelerating factor (hDAF) [*]	人	猪	降低异种器官移植的超敏排斥反应	否	√	[29]

a) *, 经 EVALLER 判断不是过敏原, 但有文献报道存在过敏或不良反应的转基因蛋白

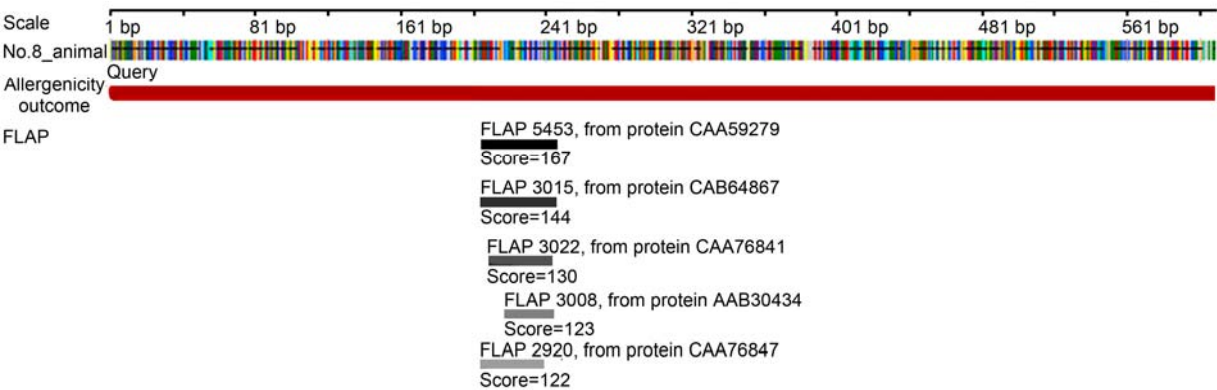


图 1 人血清白蛋白基因(表 2 中 8 号转化基因)的过敏原性评估结果
Query 红色表示阳性(“是过敏原”); 显示 5 个 FLAPs 信息, 黑色越深意味着相似度越高

EVALLER assignment

Presumably an allergen

Uncertainty of assignment: Probability of a false alarm, for this particular assignment, is 0.0%.

Top five alignments of query protein to peptides (FLAPs) of known allergens

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 5453

FLAP-origin CAA59279 [More about the protein CAA59279 \(new window\)](#)

Length of alignment 41

Position on query 204–244

Position on FLAP 1–41

Smith-Waterman score 167

FASTA gapped identity 80.49% (80.49% ungapped)

Query: PKLDELRLDEGKASSAKQRLKCSLQKFGGERAFKAWAVARLS

.....

FLAP: PKVDALREKVLSSAKERLKCASLQKFGGERAFKAWSVARLS

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 3015

FLAP-origin CAB64867 [More about the protein CAB64867 \(new window\)](#)

Length of alignment 39

Position on query 204–242

Position on FLAP 2–40

Smith-Waterman score 144

FASTA gapped identity 69.23% (69.23% ungapped)

Query: PKLDELRLDEGKASSAKQRLKCSLQKFGGERAFKAWAVAR

.....

FLAP: PKTEALREKVLSSAKERFKCASLQKFGDRAFKAWSVAR

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 3022

FLAP-origin CAA76841 [More about the protein CAA76841 \(new window\)](#)

Length of alignment 36

Position on query 207–242

Position on FLAP 1–36

Smith-Waterman score 130

FASTA gapped identity 69.44% (69.44% ungapped)

Query: DELRLDEGKASSAKQRLKCSLQKFGGERAFKAWAVAR

.....

FLAP: EALREKVLSSAKERFKCASLQKFGDRAFKAWSVAR

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 3008

FLAP-origin AAB30434 [More about the protein AAB30434 \(new window\)](#)

Length of alignment 27

Position on query 216–242

Position on FLAP 2–28

Smith-Waterman score 123

FASTA gapped identity 85.19% (85.19% ungapped)

Query: SSAKQRLKCSLQKFGGERAFKAWAVAR

.....

FLAP: SSAKERFKCASLQKFGDRAFKAWSVAR

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 2920

FLAP-origin CAA76847 [More about the protein CAA76847 \(new window\)](#)

Length of alignment 36

Position on query 202–237

Position on FLAP 1–36

Smith-Waterman score 122

FASTA gapped identity 63.89% (63.89% ungapped)

Query: LLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCSLQKFGGERAFKA

.....

FLAP: LLPKIETMREKVLTSARQRLCASLQKFGGERALKA

图 2 血清白蛋白的过敏原性评估得出的 5 个最佳匹配 FLAPs

阳性,表明该蛋白是过敏原.图2中显示5个与人血清白蛋白最佳匹配序列信息,即5个筛选到的长度经过调整的过敏原肽段(filtered length-adjusted allergen peptides, FLAPs).该结果不仅给出是否为过敏原的判断,而且给出了评价结果的错误概率,例如,判断此血清白蛋白为过敏原的错误概率为0,即是说,可以完全肯定血清白蛋白具有过敏性.然而,在过敏原检测实验或其他实验中常将血清白蛋白作为无过敏原性的阴性对照或稳定剂使用^[30].Frew等人^[31]的研究表明,血清白蛋白与大侧柏酸或其他半抗原结合后可能引起过敏反应,这一报道支持了我们的分析结果.

图3和4显示为植物转化基因细胞周期调节蛋白(1号转化基因,见表S1)的过敏性评估结果,与上述血清白蛋白的评估过程类似.结果不同的是,Query序列条为绿色表示阴性,表明该蛋白不具有过敏性.图4显示5个FLAPs信息,但此结果的错误概率为6.8%,即如果不认为该蛋白是过敏原的话,犯错误的可能性大于5%.对于这类结果,要进行严格实验来验证方能确证.

2.3 一个特殊案例分析

豇豆胰蛋白酶抑制剂(5号转化基因,见表S1)作为一个抗虫基因已经在不同作物中进行了转化,一般认为该蛋白并不存在过敏性.但是,如果保留其信号肽,EVALLER软件明确判定其为过敏原.有文献推定,在转基因植株的细胞内,N端的信号肽序列可以将新合成的抗虫融合蛋白引入到内质网,信号肽被细胞内的识别机制识别并被切除^[32].切除信号肽后,EVALLER软件则判定其为非过敏原.如果能确证转基因产品中的豇豆胰蛋白酶抑制剂只有成熟

肽(没有信号肽)形式,而没有前体肽形式,辅之以敏原性评价实验证实后,则可以判断该转基因产品的过敏性问题是否明显.

2.4 文献回顾表明 EVALLER 预测存在假阴性

如表2所示,在49种植物转化基因中,小麦胚芽凝集素(1号转化基因)、小麦高分子量谷蛋白(2号转化基因)和菜豆几丁质酶(3号转化基因)被判断为过敏原;在36种动物转化基因中,人血清白蛋白(8号转化基因)和牛酪蛋白(9号转化基因)被判断为过敏原,而其他转化基因都被软件判断为非过敏原.经过文献检索后,如下转化基因虽然并不被判断为过敏原,但有文献报道与过敏或临床上的不良反应事件相联系,这些蛋白用星号标记归纳在表2中,分别是:植酸酶(4号植物转化基因和10号动物转化基因)、溶菌酶(5号植物转化基因和11号动物转化基因)、 β -葡萄糖醛酸酶(6号转化基因)、核糖体钝化蛋白(7号转化基因)、胰岛素(12号转化基因)、组织型纤溶酶原激活剂(13号转化基因)、 α -抗胰蛋白酶(14号转化基因)、乳铁蛋白(15号转化基因)、血红蛋白(16号转化基因)、抗凝血酶Ⅲ(17号转化基因)和促衰变因子(18号转化基因)等.因此,转化这11例基因时要十分慎重.例如,关于抗凝血酶Ⅲ(17号转化基因),基因本身并不是过敏原,但是,通过文献追踪分析发现,该蛋白在一些严重疾病人群身上却不能应用^[33].

另一个例子是,硫氧还蛋白(thioredoxin)是一个已经明确的过敏原^[34],一般并不会转化这样的基因.但是,文献报道认为,硫氧还蛋白本身具有破坏二硫结构、降低过敏原性的特性^[35],可以认为,其反义基因的转化可能增加转基因产品的过敏性,因此,针对该基因的敲除或反义操作要慎重考虑.

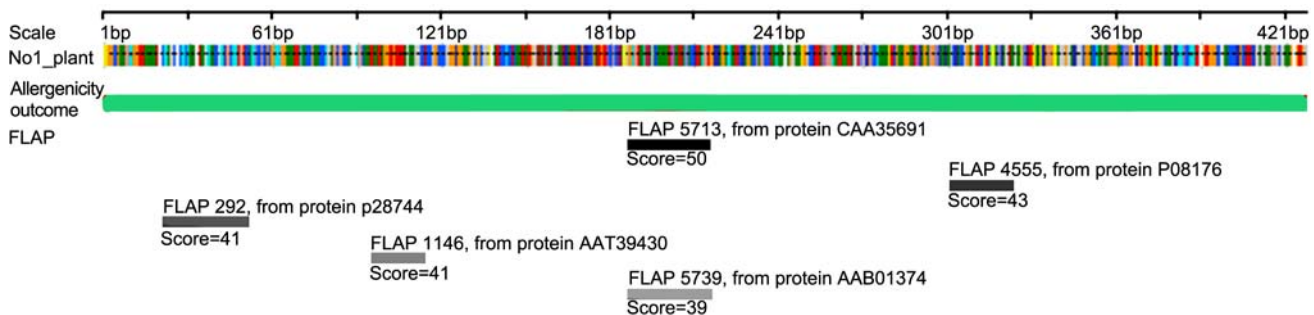


图3 细胞周期调节蛋白基因(表S1中1号转化基因)的过敏性评估结果

Query 绿色表示阴性(“非过敏原”);黑色颜色最深表示最佳匹配滤过调长的过敏原肽段(filtered length-adjusted allergen peptides, FLAP)

EVALLER assignment

Presumably not an allergen

Uncertainty of assignment: Probability of overlooking an allergen, for this particular assignment, is 6.8%.

Top five alignments of query protein to peptides (FLAPs) of known allergens

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 5713

FLAP-origin CAA35691 [More about the protein CAA35691 \(new window\)](#)

Length of alignment 29

Position on query 184–212

Position on FLAP 5–33

Smith-Waterman score 50

FASTA gapped identity 37.93% (37.93% ungapped)

Query: DYMASQPDINEKMRLILVEWLDVHVRFE

.

FLAP: TYYVNPNDNENLRLITLAIPVKNKPGRFE

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 4555

FLAP-origin P08176 [More about the protein P08176 \(new window\)](#)

Length of alignment 16

Position on query 338–353

Position on FLAP 4–19

Smith-Waterman score 43

FASTA gapped identity 50.00% (50.00% ungapped)

Query: SMVAASAIYAARSSLR

.

FLAP: SLLALSAVYARPSSIK

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 292

FLAP-origin P28744 [More about the protein P28744 \(new window\)](#)

Length of alignment 34

Position on query 21–54

Position on FLAP 7–40

Smith-Waterman score 41

FASTA gapped identity 32.35% (32.35% ungapped)

Query: GKNVAKGRNRQVLGDIGNVVRGNYPKNNEPEKIN

.

FLAP: GPTILSQGNRFLASDIKKEVVGRYGESAMESIN

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 1146

FLAP-origin AAT39430 [More about the protein AAT39430 \(new window\)](#)

Length of alignment 14

Position on query 72–85

Position on FLAP 20–33

Smith-Waterman score 41

FASTA gapped identity 42.86% (42.86% ungapped)

Query: LKKPVVKRNAVPKP

.

FLAP: LSRTLRRNALRRP

Alignment of query protein to peptide (FLAP) 5739

FLAP-origin AAB01374 [More about the protein AAB01374 \(new window\)](#)

Length of alignment 29

Position on query 184–212

Position on FLAP 6–34

Smith-Waterman score 39

FASTA gapped identity 27.59% (27.59% ungapped)

Query: DYMASQPDINEKMRLILVEWLDVHVRFE

.

FLAP: TFYVNPNDNENLRLITLAIPVKNKPGRFE

图 4 细胞周期调节蛋白基因的 5 个最佳匹配 FLAPs

3 讨论

近年来,转基因生物的安全性问题得到各国政府、科学家及民众的广泛关注.安全性评价是能否将转基因生物转变为商品并走上人们餐桌的必经之路.而在安全性评价项目中,转基因生物的过敏原性评价显得尤为重要.最重要的例子就是早在1996年 Pioneer HiBred 公司将巴西坚果中的 2S 蛋白基因转入大豆,可以提高大豆的蛋白质含量,然而经过免疫学鉴定发现这个基因是一个过敏原,这种转基因大豆极有可能引起人类过敏反应.该转基因大豆因此最终没能上市^[36],浪费了前期投入的大量人力、物力和财力.另外,2001年美国 CDC 汇总了数百例食用含有杀虫晶体蛋白 CRY9C 玉米的病例,但美国 FDA 的 ELISA 检测结果却判断为与 CRY9C 无关,此事件就此搁置而无最后定论^[37],由此也说明了获得临床医学证据对于过敏原性评价十分重要.

本研究汇总了 85 例转化基因,并列示了这些转化基因的来源、转化宿主、功能与应用,特别是过敏原性及医学相关的负面效应,其基本操作流程值得规范化.本研究先通过文献及序列数据库检索,获取这 85 例转化基因的氨基酸序列等信息,借助 EVALLER 2.0 软件对其过敏原进行评估,共发现 85 种转化基因中的小麦胚芽凝集素、小麦高分子量谷白蛋白、菜豆几丁质酶、人血清白蛋白和牛酪蛋白等 5 种基因直接判断为过敏原.软件分析提示,豇豆胰蛋白酶抑制剂不同成熟形式的肽的过敏原性不同.另外,进一步通过文献搜索发现,植酸酶、溶菌酶、 β -葡萄糖醛酸酶、核糖体钝化蛋白、胰岛素、组织型纤溶酶原激活剂、 α -抗胰蛋白酶、乳铁蛋白、血红蛋白、抗凝血酶 III 和促衰变因子等 11 例转化基因虽然没有被判断为过敏原,但有文献报道与过敏反应或临床不良反应有关

联.显然,这些分析步骤的相互补充,可以将一些可能存在危险的基因转化阻止在项目启动之初,避免造成大量的人力、物力和财力的浪费,同时也可消除公众的疑虑.

2003 年 Codex 指南提出证据权重方案被一定程度上接受,即采用一系列的方法来综合评定转基因产品的过敏原性,包括基因资源的安全记录、蛋白质结构、胃蛋白酶消化稳定性、新蛋白在胃肠道可能暴露的程度、特异性 IgE 结合实验乃至皮肤挑刺,甚至动物实验及目标血清筛选^[38].但是,采用这些方法得到的过敏原性并没有得到全面的评估和证实^[38],而且没有一个方法得到了人体证实^[39].原来被广泛采用的过敏原性判定标准之间也有一些出入,而 Herman 等人^[40]的研究显示,只有 8 个氨基酸残基相同、但 80 个氨基酸残基窗口上未达到 35% 同一性的不同蛋白之间并不具有交叉反应性,而应采用一条比较公认的经验值进行过敏原性评估,即 80 个氨基酸残基的窗口上有 35% 的序列相同则认为可能存在相似的过敏原性.

EVALLER 2.0 在线过敏原评价软件里包含了 578 种过敏原,一共有 2890 条过敏原代表性肽段^[1],该软件通过检索与 24 个氨基酸滑动肽的序列相似性来评价转化基因编码的蛋白是否为过敏原,可靠性好.但是,由于产生过敏主要是顺序决定簇起作用,序列相似性分析只能作出初步判断.然而,产生过敏除了顺序决定簇还存在构象决定簇,序列相似性分析并不能包括构象决定簇分析,因此在序列相似性分析之后,需要做血清学及其他免疫学实验来验证目的基因编码的蛋白是否能与特定的 IgE 结合,从而更准确地判断转化的基因是否引起过敏.这也解释了为什么在通过文献搜索后能进一步发现上述 β -葡萄糖醛酸酶等 11 例基因存在过敏或临床不良反应.

参考文献

- 1 Barrio A M, Soeria-Atmadja D, Nistér A, et al. EVALLER: A web server for *in silico* assessment of potential protein allergenicity. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Suppl 2): W694–W700
- 2 Miotto O, Tan T W, Brusic V. Rule-based knowledge aggregation for large-scale protein sequence analysis of influenza A viruses. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(Suppl 1): S7
- 3 Jain E, Bairoch A, Duvaud S, et al. Infrastructure for the life sciences: Design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 136
- 4 McMillan L, Martin A. Automatically extracting functionally equivalent proteins from SwissProt. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 418
- 5 Chapman M D, Pomes A, Breiteneder H, et al. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119: 414–420
- 6 Bairoch A, Boeckmann B, Ferro S, et al. Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 39–55

- 7 Lopata A L, O'Hehir R E, Lehrer S B. Shellfish allergy. Clin Exp Allergy, 2010, 40: 850–858
- 8 Fiers M W, Kleter G A, Nijland H, et al. Allermatch, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. BMC Bioinformatics, 2004, 5: 133
- 9 Ivanciuc O, Midoro-Horiuti T, Schein C H, et al. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. Mol Immunol, 2009, 46: 873–883
- 10 Brusic V, Millot M, Petrovsky N, et al. Allergen databases. Allergy, 2003, 58: 1093–1100
- 11 Goodman R E, Hefle S L, Taylor S L, et al. Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: A review. Int Arch Allergy Immunol, 2005, 137: 153–166
- 12 Kanrar S, Venkateswari J, Kirti P, et al. Transgenic indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). Plant Cell Rep, 2002, 20: 976–981
- 13 Altpeter F, Popelka J C, Wieser H. Stable expression of *1Dx5* and *1Dy10* high-molecular-weight glutenin subunit genes in transgenic rye drastically increases the polymeric glutelin fraction in rye flour. Plant Mol Biol, 2004, 54: 783–792
- 14 Huang Y S, Li H M. *Arabidopsis* CHLI2 can substitute for CHLI1. Plant Physiol, 2009, 150: 636–645
- 15 Veum T L, Eilersieck M R. Effect of low doses of *Aspergillus niger* phytase on growth performance, bone strength, and nutrient absorption and excretion by growing and finishing swine fed corn-soybean meal diets deficient in available phosphorus and calcium. J Anim Sci, 2008, 86: 858–870
- 16 Yang D, Guo F, Liu B, et al. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. Planta, 2003, 216: 597–603
- 17 Wang W Q, Li Y, Zhang Y Y, et al. Comparative expression analysis of three genes from the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter (AtNHX) family in relation to abiotic stresses. Chin Sci Bull, 2007, 52: 1754–1763
- 18 Oldach K H, Becker D, Lorz H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. Mol Plant Microbe In, 2001, 14: 832–838
- 19 黄英, 黄纓, 黄赞, 等. 山羊β-酪蛋白基因启动区指导人血清白蛋白在转基因小鼠乳汁中的高效表达. 科学通报, 2000, 45: 2081–2086
- 20 Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. Nat Biotechnol, 2003, 21: 157–162
- 21 Nyannor E K D, Williams P, Bedford M R, et al. Corn expressing an *Escherichia coli*-derived phytase gene: A proof-of-concept nutritional study in pigs. J Anim Sci, 2007, 85: 1946–1952
- 22 于政权, 樊宝良, 戴蕴平, 等. 转基因小鼠乳腺表达重组人溶菌酶. 科学通报, 2003, 48: 2149–2153
- 23 Valera A, Fillat C, Costa C, et al. Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations. FASEB J, 1994, 8: 440–447
- 24 Ebert K M, Selgrath J P, DiTullio P, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. Nat Biotechnol, 1991, 9: 835–838
- 25 Wright G, Carver A, Cottom D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Nat Biotechnol, 1991, 9: 830–834
- 26 Zhang J, Li L, Cai Y, et al. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. Protein Express Purif, 2008, 57: 127–135
- 27 Sharma A, Martin M J, Okabe J F, et al. An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine. Nat Biotechnol, 1994, 12: 55–59
- 28 Adiguzel C, Iqbal O, Demir M, et al. European community and US-FDA approval of recombinant human antithrombin produced in genetically altered goats. Clin Appl Thromb-Hem, 2009, 15: 645–651
- 29 Murakami H, Nagashima H, Takahagi Y, et al. Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. Mol Reprod Dev, 2002, 61: 302–311
- 30 Norman P S, Marsh D G. Human serum albumin and Tween 80 as stabilizers of allergen solutions. J Allergy Clin Immunol, 1978, 62: 314–319
- 31 Frew A, Chang J H, Chan H, et al. T-lymphocyte responses to plicatic acid-human serum albumin conjugate in occupational asthma caused by western red cedar. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101: 841–847
- 32 徐鸿林, 翟红利, 王锋, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)及其在抗虫转基因作物中的应用. 中国农业科技导报, 2008, 10: 18–27
- 33 Afshari A, Wetterslev J, Brok J, et al. Antithrombin III in critically ill patients: Systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. BMJ, 2007, 335: 1248–1251

- 34 Weichel M, Glaser A G, Ballmer-Weber B K, et al. Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117: 676–681
 - 35 del Val G, Yee B C, Lozano R M, et al. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103: 690–697
 - 36 Nordlee J A, Taylor S L, Townsend J A, et al. Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med*, 1996, 334: 688–692
 - 37 Centers for Disease Control. Investigation of human health effects associated with potential exposure to genetically modified corn. A report to the US Food and Drug Administration from the Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/nceh/ehhe/cry9creport/research.htm>, 2001
 - 38 Ladics G S. Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46 (Suppl 10): S20–S23
 - 39 Dearman R J, Kimber I. Animal models of protein allergenicity: Potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39: 458–468
 - 40 Herman R A, Song P, Thirumalaiswamyse A. Value of eight-amino-acid matches in predicting the allergenicity status of proteins: An empirical bioinformatic investigation. *Clin Mol Allergy*, 2009, 7: 9
-

补充材料

表 S1 植物转化基因的功能与过敏原性概述

表 S2 动物转化基因的功能与过敏原性概述

本文的以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.



表 S1 植物转化基因的功能与过敏性概述

编号	转化基因	英文名	来源	转化宿主	功能与应用	有否过 敏原性	有无过敏或不 良反应文献	参考 文献
1	细胞周期调节蛋白	CyclAt	拟南芥	水稻	控制植物的生长 与发育	否	/	[1]
2	潮霉素磷酸转移酶	Hygromycin phosphotrans- ferase (HPT)	吸水链霉菌	水稻、大豆、小 麦、玉米	筛选标记基因	否	/	[2]
3	新霉素磷酸转移酶	Neomycin phosphotransfer- ase (npt-II)	表皮葡萄球菌	水稻、大豆、小 麦、玉米	辅助筛选标记	否	/	[3]
4	杀虫晶体蛋白	Insecticidal crystal protein 1A (Cry1A, Bt)	苏云氏杆菌	水稻、油菜、玉 米、小麦、大豆	抗虫	否	/	[4]
5	豇豆胰蛋白酶抑制剂	Cowpea trypsin inhibitor (CPTI)	豇豆	水稻、大豆、小 麦	抗虫	否	/	[5]
6	磷酸烯醇式丙酮酸羧 化酶	Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)	玉米	水稻	提高光合效率	否	/	[6]
7	丙酮酸磷酸二激酶	Pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK)	玉米	水稻、马铃薯	提高光合效率	否	/	[7]
8	NADP-苹果酸酶	NADP-malic enzyme (NADP-ME)	玉米	水稻、马铃薯	提高光合效率	否	/	[7]
9	抗菌肽 B	CecropinB (Cecb1)	家蚕	水稻	抗白叶枯病	否	/	[8]
10	抗白叶枯病基因 Xa21	Xa21 gene for receptor kinase-like protein (Xa 21)	水稻	水稻	抗白叶枯病	否	/	[9]
11	组蛋白 H3 与绿色荧 光蛋白嵌合蛋白	OsCENH3-GFP	水稻	水稻	遗传标志	否	/	[10]
12	雪花莲凝集素	Galanthus nivalis agglutinin (GNA)	雪花莲	水稻	抗蚜虫、叶蝉、 稻飞虱等同翅目 吸食性害虫	否	/	[11]
13	CBF 表达诱导子	ICE1	拟南芥	水稻	耐寒	否	/	[12]
14	C-重复结合因子 1	C-repeat binding factor 1 (CBF1)	拟南芥	水稻	耐寒	否	/	[13]
15	膦丝菌素乙酰转移酶 β-胡萝卜素生物合成 途径	Phosphinothricin acetyl- transferase (PAT)	吸水链霉菌	水稻、小麦	抗除草剂 PPT	否	/	[14]
16	a) 八氢番茄红素合 酶 b) 番茄红素β环化酶 c) 八氢番茄红素脱 氢酶	Beta carotene a) phytoene synthase (psy) b) lycopene β-cyclase(β-lyc) c) phytoene desaturase (crtI)	a) 水仙花 b) 水仙花 c) 噬夏孢欧文菌	水稻	治疗维生素 A 缺 乏症	否	/	[15]
17	Oryza sativa WRKY 转录因子	OsiWRKY	水稻	水稻	转录因子, 参与 调控抗逆、生长 发育、衰老、休 眠等生理过程, 能抗稻瘟病菌和 白叶枯菌 提高稻米铁含 量, 以增人体强 免疫力	否	/	[16]
18	铁蛋白	Ferritin	豌豆	水稻		否	/	[17]
19	抗黑穗病基因	Ustilago maydis virus P4 KP4 toxin gene (KP4)	Ustilago maydis-infect ing virus	小麦/玉米	抗黑穗病	否	/	[18]
20	谷氨酰胺合成酶 a) 谷氨酰胺合成酶 1 b) 谷氨酰胺合成酶 2	Glutamine synthetase a) glutamine synthetase (GS1) b) glutamine synthetase (GS2)	豌豆	水稻	增加水稻对氮素 缺乏的耐受性	否	/	[19]

续表 S1

编号	转化基因	英文名	来源	转化宿主	功能与应用	有否过敏原性	有无过敏或不良反应文献	参考文献
21	甜菜碱醛脱氢酶	Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)	山菠菜	水稻、小麦、四倍体刺槐、白三叶草	抗逆性、耐盐耐旱	否	/	[20]
22	5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶	5-Enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)	鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌	大豆/小麦、玉米、油菜、棉花	抗农药草甘膦	否	/	[21]
23	乙酰羟酸合成酶	Acetohydroxy acid synthetase (ahas)	拟南芥	大豆	抗磺酰脲类、咪唑啉酮类、三唑嘧啶磺酰胺类及水杨酸类除草剂	否	/	[22]
24	葡萄糖氧化酶	Glucose oxidase (Gox)	黑曲霉	小麦、土豆	抗白粉病	否	/	[23]
25	小麦黄花叶病毒复制酶	WYMV-Nib8	小麦黄花叶病	小麦	抗黄矮病毒	否	/	[24]
26	大麦黄矮病毒缺失复制酶	Defective of replicase gene of GPV (BYDV- GPV)	大麦黄矮病毒	小麦	抗黄矮病毒	否	/	[25]
27	大麦黄矮病毒单价外壳蛋白	PAV+GPV	大麦黄矮病毒	小麦	抗黄矮病毒	否	/	[26]
28	小麦土传花叶病毒外壳蛋白	Wheat soilborne mosaic virus (CWMV-CP)	小麦土传花叶病毒	小麦	抗黄矮病毒	否	/	[27]
29	慈菇蛋白酶抑制剂 A	Arrowhead Proteinase inhibitor A (API-A)	慈菇储藏器官 (根茎)	小麦、棉花	抗鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫	否	/	[28]
30	慈菇蛋白酶抑制剂 B	Arrowhead Proteinase inhibitor B (API-B)	慈菇储藏器官 (根茎)	小麦、棉花	抗鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫	否	/	[29]
31	抗叶锈病基因	Lr21	小麦	小麦	抗叶锈病	否	/	[30]
32	抗叶锈病基因	Lr10	小麦	小麦	抗叶锈病	否	/	[31]
33	抗叶锈病基因	Lr1	小麦	小麦	抗叶锈病	否	/	[32]
34	叶片衰老抑制基因	Isopentenyl phosphotransferase (PSAG12- IPT)	根瘤农杆菌	小麦	具有延缓叶片后期早衰特性	否	/	[33]
35	Na ⁺ /H ⁺ 反向转运离子通道蛋白	Na ⁺ /H ⁺ antiporter (AtNHX1)	拟南芥	小麦	抗盐碱及干旱	否	/	[34]
36	胆碱脱氢酶	Choline dehydrogenase (betA)	大肠杆菌	小麦	抗盐碱及干旱	否	/	[35]
37	胚胎晚期丰富蛋白	Late embryogenesis abundant proteins (LEA/HVA1)	大麦	小麦	抗盐碱及干旱	否	/	[36]
38	水分胁迫反应转录因子	dehydration Responsive element binding protein (DREB)	棉花	小麦、水稻、番茄	抗盐碱及干旱	否	/	[37]
39	海藻糖合酶	Trehalose-6-phosphate synthase (TPS1)	酿酒酵母	小麦	抗盐碱及干旱	否	/	[38]
40	乙烯合成酶	Stilbene synthase 1 (Vst1)	葡萄藤	小麦	抗白粉病	否	/	[39]
41	TsVP	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump (TsVP)	盐芥	烟草、玉米、棉花	提高作物抗盐能力	否	/	[40]
42	磷脂酰肌醇合成酶	Phosphatidyl inositol synthase (ZmPIS)	玉米	棉花	增强抗逆性	否	/	[41]

表 S2 动物转化基因的功能与过敏原性概述

编号	转化基因	英文名	来源	转化宿主	功能与应用	是否过 敏原	有无过敏或不 良反应文献	参考 文献
1	凝血因子 IX	Coagulation factor IX (hFIX)	人	绵羊	治疗血友病 B	否	/	[42]
2	丝氨酸乙酰转移酶和 O-乙酰丝氨酸硫化氢酶	Serine acetyltransferase and O-acetylserine sulfhydrylase	鼠伤寒沙门氏菌	绵羊胃上皮细胞	提高羊毛产量	否	/	[43]
3	毛角蛋白 II 型中间细丝基因	Wool type II intermediate filament keratin gene	绵羊	绵羊	使羊毛更富光泽,毛脂的含量明显提高	否	/	[44]
4	绵羊生长激素	Ovine growth hormone (oGH)	绵羊	绵羊	提高母羊排卵数、生长速度及羊毛产量	否	/	[45]
5	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶	Stearoyl-CoA desaturase (SCD)	大鼠	山羊	使奶样中单不饱和脂肪酸和共轭亚油酸含量显著提高	否	/	[46]
6	绵羊病毒性脑膜脑炎病毒的衣壳蛋白	Visna virus envelope protein (Eve)	绵羊髓鞘脱落病毒	绵羊	提高羊的抗病能力	否	/	[47]
7	拖牵丝蛋白	Dragline silk protein (MaSp)	蜘蛛	山羊/小鼠	奶样中的重组蛛丝蛋白 可以“纺”成高强度丝线,用于军工和医用材料等	否	/	[48]
8	类胰岛素生长因子-1	Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	人	绵羊	提高羊毛产毛率	否	/	[49]
9	乙肝病毒表面抗原	Hepatitis B virus surface antigen (HbsAg)	人	羊/猪	用作乙肝疫苗	否	/	[50]
10	促红细胞生成素	Erythropoietin (EPO)	人	山羊	增加红血球的数目,用于贫血	否	/	[51]
11	传染性法氏囊病毒蛋白	Infectious bursal disease virus protein (IBDV)	鸡	羊	做鸡的传染性法氏囊病的疫苗	否	/	[52]
12	人膜辅助因子蛋白	Human membrane cofactor protein (hMCP)	人	猪	抑制人血清补体的细胞毒作用	否	/	[53]
13	β -半乳糖苷酶	Beta -galactosidase (gus)	大肠杆菌	牛	产生低乳糖牛奶,缓解乳糖不耐症,提高乳制品的营养价值,还可作为报告基因	否	/	[54]
14	溶葡萄球菌酶	Lysostaphin	溶血性葡萄球菌	牛	预防由葡萄球菌引起的乳房炎	否	/	[55]
15	α 1,2-岩藻糖转移酶	α 1,2-fucosyltransferase	人	猪	降低异种移植的排异反应	否	/	[56]
16	人生长激素	Human growth hormone (hGH)	人	猪	加速动物的生长速度	否	/	[57]
17	牛生长激素	Bovine growth hormone (bGH)	牛	猪	加速动物的生长速度	否	/	[58]
18	猪生长激素	Pig growth hormone (pGH)	猪	猪	提高生长速率,饲料利用率,瘦肉率	否	/	[59]
19	抗猪瘟病毒核酶	Capsid of classical swine fever virus and staphylococcal nuclease (PMHR)	抗猪瘟病毒	猪	抵抗猪瘟病毒	否	/	[60]
20	黏病毒抗性蛋白	Myxovirus resistance (Mx1)	小鼠	猪	预防流感	否	/	[61]
21	油酸去饱和酶 12	Δ 12 fatty acid desaturase (FAD12)	菠菜	猪	提高不饱和脂肪酸含量	否	/	[62]
22	n-6 脂肪酸去饱和酶	n-3 fatty acid desaturase (FAT-1)	秀丽线虫	猪	可使普通猪肉的 OMEGA-6 脂肪酸转变成 OMEGA-3 脂肪酸	否	/	[63]
23	乳清酸蛋白	Whey acidic protein precursor (WAP)	小鼠	猪/羊	研究小鼠乳清酸蛋白的功能	否	/	[64]
24	人体蛋白 C	Protein C (hPC)	人	猪	抗炎药或免疫抑制剂	否	/	[65]
25	凝血因子 VIII	Coagulation factor VIII isoform	人	猪	防治甲型血友病、获得性凝血因子 VIII 缺乏而致的出血症状	否	/	[66]

参考文献

- 1 Ferreira P, Hemerly A S, Engler J, et al. Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell*, 1994, 6: 1763–1774
- 2 Zheng Z W, Hayashimoto A, Li Z J, et al. Hygromycin resistance gene cassettes for vector construction and selection of transformed rice protoplasts. *Plant Physiol*, 1991, 97: 832–835
- 3 Peng J, Wen F, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 91–104
- 4 Jin W W, Li Z Y, Fang Q, et al. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of alien genes in agrobacterium-mediated Cry1A(b)-transformed rice. *Ann Bot*, 2002, 90: 31–36
- 5 Chen L Y, Snow A A, Wang F, et al. Effects of insect-resistance transgenes on fecundity in rice (*Oryza sativa*, Poaceae): A test for underlying costs. *Am J Botany*, 2006, 93: 94–101
- 6 Ku M S, Agarie S, Nomura M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 76–80
- 7 Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, et al. Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: An approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot*, 2008, 59: 17997
- 8 Sharma A, Sharma R, Imamura M, et al. Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Lett*, 2000, 484: 7–11
- 9 Zhao B, Wang W M, Zheng X W, et al. Introduction of wide spectrum rice bacterial blight resistance gene *Xa21* into two-line genic male sterile rice variety Pei'ai 64S. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2000, 16: 137–141
- 10 Yu H X, Wang X, Gong Z Y, et al. Generating of rice OsCENH3-GFP transgenic plants and their genetic applications. *Chin Sci Bull*, 2008, 53: 2981–2988
- 11 Sun X F, Tang K X, Wan B L, et al. Transgenic rice homozygous lines expressing GNA showed enhanced resistance to rice brown planthopper. *Chinese Sci Bull*, 2001, 46: 1698–1703
- 12 Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2003, 17: 1043–1054
- 13 Takahashi H, Shintani T, Sakuta H, et al. CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. *Development*, 2003, 130: 5203–5215
- 14 Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 1990, 2: 603–618
- 15 Beyer P, Al-Babili S, Ye X D, et al. Golden rice: Introducing the {beta}-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr*, 2002, 132: 506–510
- 16 Shimono M, Sugano S, Nakayama A, et al. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell*, 2007, 19: 2064–2076
- 17 Drakakaki G, Christou P, Stoger E. Constitutive expression of soybean ferritin cDNA in transgenic wheat and rice results in increased iron levels in vegetative tissues but not in seeds. *Transgenic Res*, 2000, 9: 445–452
- 18 Clausen M, Krauter R, Schachermayr G, et al. Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 446–449
- 19 Sun H, Huang Q, Su J. Highly effective expression of glutamine synthetase genes GS1 and GS2 in transgenic rice plants increases nitrogen-deficiency tolerance. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*, 2005, 31: 492–498
- 20 Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2843–2854
- 21 Dun B Q, Lu W, Zhang W, et al. Reconstruction of enzymatic activity from split genes encoding glyphosate-tolerant EPSPS protein of *Pseudomonas fluorescens* G2 strain by intein mediated protein complementation. *Chinese Sci Bull*, 2006, 51: 1652–1654
- 22 Gabard J M, Charest P J, Iyer V N, et al. Cross-resistance to short residual sulfonylurea herbicides in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*, 1989, 91: 574–580
- 23 Wu G, Shortt B J, Lawrence E B, et al. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 1995, 7: 1357–1368
- 24 Koev G, Mohan B, Dinesh-Kumar S, et al. Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5' half of the barley yellow dwarf virus-PAV genome. *Phytopathology*, 1998, 88: 1013–1019

- 25 Yan F, Zhang W W, Xiao H, et al. Transgenic wheat expressing virus-derived hairpin RNA is resistant to Barley yellow dwarf virus. *Yi Chuan*, 2007, 29: 97–102 (Chinese with English Abstract)
- 26 Jimenez-Martinez E S, Bosque-Perez N A, Berger P H, et al. Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae), on transgenic and untransformed wheat challenged with barley yellow dwarf virus. *J Econ Entomol*, 2004, 97: 203–212
- 27 Canto T, Palukaitis P. A cucumber mosaic virus (CMV) RNA 1 transgene mediates suppression of the homologous viral RNA 1 constitutively and prevents CMV entry into the phloem. *J Virol*, 2001, 75: 9114–9120
- 28 Bao R, Zhou C Z, Jiang C H, et al. The ternary structure of the double-headed arrowhead protease inhibitor API-A complexed with two trypsins reveals a novel reactive site conformation. *J Biol Chem*, 2009, 284: 26676–26684
- 29 Mu H M, Liu S J, Zhou W J, et al. Transformation of wheat with insecticide gene of arrowhead proteinase inhibitor by pollen tube pathway and analysis of transgenic plants. *Yi Chuan Xue Bao*, 1999, 26: 634–642
- 30 Huang L, Brooks S A, Li W L, et al. Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*, 2003, 164: 655–664
- 31 Feuillet C, Travella S, Stein N, et al. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *PNAS*, 2003, 100: 15253–15258
- 32 Cloutier S, McCallum B D, Loutre C, et al. Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 93–106
- 33 Hahn F M, Hurlburt A P, Poulter C D. *Escherichia coli* open reading frame 696 is idi, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol*, 1999, 181: 4499–4504
- 34 Xu K, Zhang H, Blumwald E, et al. A novel plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene evolved by DNA shuffling confers improved salt tolerance in yeast. *J Biol Chem*, 2010, 285: 22999–23006
- 35 Gadda G, McAllister-Wilkins E E. Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 2126–2132
- 36 Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249–257
- 37 Gao S Q, Xu H J, Cheng X G, et al. Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *Gm DREB* of soybean (*Glycine max*). *Chinese Sci Bull*, 2005, 50: 2714–2723
- 38 Zaragoza O, Blazquez M A, Gancedo C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *J Bacteriol*, 1998, 180: 3809–3815
- 39 Serazetdinova L, Oldach K H, Lorz H. Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 985–1002
- 40 Gao F, Gao Q, Duan X G, et al. Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J Exp Bot*, 2006, 57: 3259–3270
- 41 Sui Z, Niu L, Yue G, et al. Cloning and expression analysis of some genes involved in the phosphoinositide and phospholipid signaling pathways from maize (*Zea mays* L.). *Gene*, 2008, 426: 47–56
- 42 Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278: 2130–2133
- 43 Sivaprasad A V, Kuczek E S, Bawden C S, et al. Coexpression of the cys E and cys M genes of *Salmonella typhimurium* in mammalian cells: a step towards establishing cysteine biosynthesis in sheep by transgenesis. *Transgenic Res*, 1992, 1: 79–92
- 44 Bawden C S, Powell B C, Walker S K, et al. Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure. *Transgenic Res*, 1998, 7: 273–287
- 45 Murray J D, Nancarrow C D, Marshall J T, et al. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod Fertil Dev*, 1989, 1: 147–155
- 46 Reh W A, Maga E A, Collette N M, et al. Hot topic: using a stearoyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J Dairy Sci*, 2004, 87: 3510–3514
- 47 Clements J E, Wall R J, Narayan O, et al. Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virology*, 1994, 200: 370–380
- 48 Xu H T, Fan B L, Yu S Y, et al. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Anim Biotechnol*, 2007, 18: 1–12
- 49 Damak S, Su H, Jay N P, et al. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology (N Y)*, 1996, 14: 185–188

- 50 Valenzuela P, Medina A, Rutter W J, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982, 298: 347–350
- 51 Semenza G L, Dureza R C, Traystman M D, et al. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 930–938
- 52 Li L, Fang W H, Fan Y J, et al. Expression of the infectious bursal disease virus polyprotein in Vero cells using attenuated *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2004, 20: 437–440
- 53 Zhou C Y, McInnes E, Copeman L, et al. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation*, 2005, 12: 142–148
- 54 Mozdziak P E, Pophal S, Borwornpinyo S, et al. Transgenic chickens expressing {beta}-galactosidase hydrolyze lactose in the intestine. *J Nutr*, 2003, 133: 3076–3079
- 55 Fan W, Plaut K, Bramley A J, et al. Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 1709–1716
- 56 Costa C, Zhao L, Burton W V, et al. Expression of the human {alpha}1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J*, 1999, 13: 1762–1773
- 57 Salamone D, Baranao L, Santos C, et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol*, 2006, 124: 469–472
- 58 Solomon M B, Pursel V G, Paroczay E W, et al. Lipid composition of carcass tissue from transgenic pigs expressing a bovine growth hormone gene. *J Anim Sci*, 1994, 72: 1242–1246
- 59 Vize P D, Michalska A E, Ashman R, et al. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci*, 1988, 90: 295–300
- 60 Shi Z X, Sun J F, Guo H C, et al. Genomic expression profiling of peripheral blood leukocytes of pigs infected with highly virulent classical swine fever virus strain Shimen. *J Gen Virol*, 2009, 90: 1670–1680
- 61 Muller M, Brenig B, Winnacker E L, et al. Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene*, 1992, 121: 263–270
- 62 Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, et al. Functional expression of a {Delta}12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *PNAS*, 2004, 101: 6361–6366
- 63 Lai L, Kang J, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 435–436
- 64 Shamay A, Solinas S, Pursel V G, et al. Production of the mouse whey acidic protein in transgenic pigs during lactation. *J Anim Sci*, 1991, 69: 4552–4562
- 65 Paleyanda R K, Zhang D W, Hennighausen L, et al. Regulation of human protein C gene expression by the mouse WAP promoter. *Transgenic Res*, 1994, 3: 335–343
- 66 Paleyanda R K, Velander W H, Lee T K, et al. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 971–975