

动物用转基因微生物安全评价指南

二〇一〇年十月二十七日

动物用转基因微生物安全评价指南

一、定义和分类

动物用转基因微生物，是指利用基因工程技术改变基因组构成，在农业生产或者农产品加工中用于动物的重组微生物及其产品。动物用转基因微生物主要分为基因工程亚单位疫苗、基因工程重组活载体疫苗、基因缺失疫苗、核酸疫苗、基因工程激素类疫苗及治疗制剂、饲料用转基因微生物、基因工程抗原与诊断试剂盒等。

(一) 基因工程亚单位疫苗

是指利用细菌、病毒、哺乳动物细胞、酵母、植物等体系表达的病原微生物保护性抗原蛋白制备的疫苗。该疫苗可以是纯化的抗原蛋白，也可以是未纯化的灭活混合物，其特点是含有目的抗原蛋白，无复制特性。

(二) 基因工程重组活载体疫苗

是指利用基因重组技术将病原微生物的保护性抗原蛋白基因插入到低毒或无毒的细菌、病毒、支原体等载体微生物基因组中获得的活载体疫苗。该疫苗的特点是在体内可复制，且低毒或无毒。

(三) 基因缺失疫苗

是指利用同源重组技术将病原微生物的致病或(和)毒力相关的、且复制非必需的基因或基因片段全部或部分删除后获得的低毒或无毒微生物制备的疫苗。该疫苗的特点是带有基因缺失的遗传标记，可以据此区分疫苗毒株和野生毒株。

(四) 核酸疫苗

是指将病原微生物的主要保护性抗原基因插入到真核表达质粒(含真核启动子)中形成DNA重组体，纯化获得的重组质粒即为核

酸疫苗。核酸疫苗的特点是质粒 DNA，而非蛋白，质粒 DNA 进入细胞后表达抗原蛋白，可以诱导机体免疫反应。

(五) 基因工程激素类疫苗及治疗制剂

是指利用基因工程技术体外表达的激素（如生长激素、生长抑素等）、细胞因子（如干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子等）和其它具有重要生物活性的因子。这些制剂的特点是和正常动物体内相应因子的生物学功能相似或相同，在机体内可发挥调节、干扰、或增强相应的生理功能。

(六) 饲料用转基因微生物

是指利用细菌、病毒、哺乳动物细胞、酵母、植物等体系表达的功能性蛋白或肽类（如植酸酶、抗菌肽等）作为饲料添加剂。转基因微生物产品可以是纯化蛋白、活性转基因微生物或灭活转基因微生物。

(七) 基因工程抗原与诊断试剂盒

是指利用基因工程技术，通过细菌、病毒、哺乳动物细胞、酵母、植物等体系表达的病原微生物功能蛋白，以此蛋白作为诊断抗原建立诊断方法，并组装诊断试剂盒。此类制剂的特点是不含有病原微生物，只含有病原微生物的一种或几种蛋白；不用于动物体内，只用于体外检测。

(八) 其它

无法纳入上述 7 类的其他动物用转基因微生物，如利用反向遗传操作技术体系构建的疫苗。

二、申报程序

根据《农业转基因生物安全管理条例》和《农业转基因生物安全评价管理办法》规定，农业转基因生物安全评价试验，一般应当经过

中间试验、环境释放、生产性试验三个阶段。中外合作、合资或者外方独资在中华人民共和国境内从事农业转基因生物研究与试验的，应当在实验研究开始前向农业部申请。

农业转基因生物试验结束后，可以申请农业转基因生物安全证书。不同类别动物用转基因微生物的申报程序可参照如下要求进行。

(一) 基因工程亚单位疫苗

1. 利用基因工程技术表达的抗原并经纯化后制备的基因工程亚单位疫苗，在中间试验结束后，可直接申请安全证书。

2. 利用基因工程技术表达的抗原未经纯化后制备的基因工程亚单位疫苗，在中间试验和环境释放结束后，依据安全评价情况，可直接申请安全证书。

(二) 基因工程重组活载体疫苗

1. 利用已知的、安全的载体与已知的、安全的外源基因构建的基因工程重组活载体疫苗，在中间试验和环境释放结束后，可直接申请安全证书。

2. 利用新型的、安全性不明的载体或外源基因制备的基因工程重组活载体疫苗，应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。

(三) 基因缺失疫苗

1. 基因缺失活疫苗应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。

2. 基因缺失灭活疫苗在中间试验结束后，可直接申请安全证书。

(四) 核酸疫苗

应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。

(五) 基因工程激素类疫苗及治疗制剂

1. 表达蛋白作为激素使用的，在中间试验和环境释放结束后，依据安全评价情况，可直接申请安全证书。
2. 以核酸疫苗应用的激素应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。
3. 用活载体表达的激素应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。
4. 以纯化表达蛋白使用且安全的基因工程治疗制剂（如细胞因子和其它具有重要生物活性的因子），在中间试验结束后，可直接申请安全证书。

(六) 饲料用转基因微生物

1. 利用转基因微生物的表达产物（如植酸酶、抗菌肽）或代谢物，以及转基因微生物灭活制备的产品，在中间试验和环境释放结束后，依据安全评价情况，可直接申请安全证书。
2. 利用活性转基因微生物制备的产品，应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。

(七) 基因工程抗原与诊断试剂盒

中间试验结束后，可直接申请安全证书。

(八) 其他

1. 利用反向遗传操作技术体系构建的基因组序列与原毒株一致且无基因插入或缺失的活疫苗，在中间试验结束后，可直接申请安全证书。
2. 利用反向遗传操作技术体系构建的经基因缺失、插入或重组制备的活疫苗，应按中间试验、环境释放、生产性试验、安全证书四个阶段申报安全评价。

3. 凡是经过基因操作的毒株，终产品为灭活的，在中间试验结束后，可直接申请安全证书。

三、总体要求

(一) 分子特征

从基因水平和翻译水平，考察外源基因插入和表达情况。

1. 表达载体相关情况

(1) 目的基因与载体构建的物理图谱

详细注明表达载体所有元件名称、位置和酶切位点。

(2) 目的基因

详细描述目的基因的供体微生物、结构（包括基因中的酶切位点）、功能和安全性。

供体微生物：如 VP1 基因来源于口蹄疫病毒 XX 毒株。

结构：完整的 DNA 或 cDNA 序列和推导的氨基酸序列。

功能：生物学功能，如免疫原性、致病性。

安全性：从供体微生物特性、安全使用历史、基因结构、功能及有关安全性试验数据等方面综合评价目的基因的安全性。

(3) 表达载体其他主要元件

启动子：供体（微）生物来源、大小、DNA 序列（或文献）、功能、安全应用记录。

标记基因和（或）报告基因：供体（微）生物来源、大小、DNA 序列（或文献）、功能、安全应用记录。

其他表达调控序列：来源（如人工合成或供体生物名称）、名称、大小、DNA 序列（或文献）、功能、安全应用记录。

2. 目的基因在微生物基因组中的插入或缺失情况

采用 PCR 扩增外源基因片段，进行扩增产物的序列测定，分析

外源基因片段的插入情况或分析微生物基因缺失情况。

3. 目的基因在微生物体中的表达情况

采用 Western-Blot 等血清学方法，从蛋白质水平分析外源基因的表达情况。

(二) 遗传稳定性

评价转基因微生物菌（毒）种的遗传稳定性和目的基因在转基因微生物中表达的稳定性

1. 目的基因整合的稳定性

用 Southern 或 PCR 技术检测目的基因在转基因微生物菌（毒）种中的整合情况，提供不少于 5 代的试验数据。

2. 目的基因表达的稳定性

用 Western-Blot 等血清学方法分析目的基因在转基因微生物菌（毒）种中蛋白水平表达的稳定性，提供不少于 5 代的试验数据。

(三) 转基因微生物的生物学特性

转基因微生物的生长或培养特性、理化特性（细菌）、致病性与免疫特性。

(四) 转基因微生物对动物的安全性

转基因微生物对靶动物和非靶动物的安全性、高剂量使用对靶动物的安全性、对妊娠动物的安全性。

(五) 转基因微生物对人类的安全性

评价转基因微生物对人类的感染性和致病性。以提供资料为主，涉及到人兽共患病病原应提供在历史上有无对人类感染或致病记录，必要时应提供人体细胞、特定模型动物和灵长类动物感染性试验报告。

(六) 转基因微生物对生态环境的安全性

评价转基因微生物在应用环境中的存活情况，在靶动物之间的水平和垂直传播能力，以及与其他相近微生物发生遗传重组的可能性，对动物体内正常菌群和环境微生物的影响。

四、各类动物用转基因微生物安全评价要求

动物用转基因微生物安全评价应按照《农业转基因生物安全评价管理办法》的规定撰写申报书，并参照如下要求提供各类动物用转基因微生物安全评价材料。

申请动物用转基因微生物实验研究的，项目名称应包含目的基因名称、受体微生物名称、实验研究所在省（市、自治区）名称和实验研究阶段等内容，如表达新城疫病毒 HA 基因的重组鸡痘病毒基因工程疫苗在江苏省的实验研究。一份申报书只能包含同一种受体微生物和相同的基因。外源基因包括目的基因、标记基因、报告基因以及启动子、终止子和其他调控序列。外源基因名称应当是按国际通行规则正式命名的名称或 GenBank 中的序列号，未正式命名或无 GenBank 序列号的应提供基因序列。实验年限一般为一至两年。

（一）基因工程亚单位疫苗

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括表达载体的构建、外源基因的表达和蛋白纯化工艺等。

评价产品对靶动物的安全性，重点是产品用于靶动物后的临床反应。

2. 申请环境释放

提交中间试验阶段安全性试验的总结报告。

未经纯化的产品用于靶动物后，产品中抗性质粒在环境中的转移情况。

3. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(二) 基因工程重组活载体疫苗

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括重组活载体疫苗的构建、外源基因的表达、重组微生物的遗传稳定性、生物学特性等。

评价产品对靶动物致病性，以及产品用于非靶动物后的临床反应。

2. 申请环境释放

提交中间试验阶段安全性试验的总结报告。

评价疫苗毒株的水平传播和垂直传播能力；检测疫苗毒株在应用环境中的存活能力，以及疫苗毒株在靶动物的存留和排毒情况。

涉及人兽共患病病原的产品，还应评价产品对人类的安全性，以及疫苗毒株与其他微生物发生遗传重组的可能性

3. 申请生产性试验

提交中间试验和环境释放阶段安全性试验的总结报告。

继续检测疫苗毒株在应用环境中的存活能力，以及疫苗毒株在靶动物的存留和排毒情况。

4. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(三) 基因缺失疫苗

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括基因缺失疫苗的构建、遗传稳定性和生物学特性等。

基因缺失活疫苗：评价基因缺失疫苗毒株对靶动物致病性，以及以用于非靶动物后的临床反应；提供实验室内基因缺失毒株与野生毒

株重组获得缺失致病基因能力的研究报告。

基因缺失灭活疫苗：评价产品对靶动物的安全性，重点是产品用于靶动物后的临床反应。

2. 申请环境释放

提交中间试验阶段安全性试验的总结报告。

评价基因缺失疫苗毒株在靶动物体内的增殖、分布和存活情况；评价基因缺失疫苗毒株水平传播和垂直传播能力。

涉及人兽共患病病原的产品，还应评价产品对人类的安全性，以及疫苗毒株与其他微生物发生遗传重组的可能性

3. 申请生产性试验

提交中间试验和环境释放阶段安全性试验的总结报告。

继续观察基因缺失疫苗毒株的水平传播和垂直传播能力。监测缺失毒株与野生毒株重组获得缺失致病基因的能力。

4. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(四) 核酸疫苗

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括核酸疫苗的构建、外源基因的表达、制备工艺等。

评价核酸疫苗质粒 DNA 在靶动物注射部位存留情况，以及在靶动物体内相关组织分布情况；监测靶动物血液中质粒 DNA 的存在和持续时间；评价重组质粒与宿主细胞染色体（基因组）的整合情况。

2. 申请环境释放

提供中间试验阶段安全性试验的总结报告。

监测靶动物粪便中核酸疫苗质粒 DNA 的存在；检测重组质粒

DNA 抗性基因向环境微生物（如以大肠杆菌作为指示菌）中转移的可能性。

3. 申请生产性试验

提供中间试验和环境释放阶段安全性试验的总结报告。

继续检测重组质粒 DNA 抗性基因向环境微生物（如以大肠杆菌作为指示菌）中转移的可能性。

4. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(五) 基因工程激素类疫苗及治疗制剂

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括表达载体构建、外源基因的表达、重组微生物的遗传稳定性等。

在实验室可控条件下，检测靶动物的临床安全性、生理学和病理学变化；监测产品在体内的代谢（消长规律）。

以核酸疫苗应用的应评价质粒 DNA 在靶动物注射部位存留情况，以及在体内相关组织分布情况；监测靶动物血液中质粒 DNA 的存在和持续时间；评价重组质粒与宿主细胞染色体（基因组）的整合情况。

2. 申请环境释放

提交中间试验阶段安全性试验的总结报告。

分析靶动物的食用安全性；检测靶动物的生理学和病理学变化。

以核酸疫苗应用的应监测靶动物粪便中核酸疫苗质粒 DNA 的存在；检测重组质粒 DNA 抗性基因向环境微生物（如以大肠杆菌作为指示菌）中转移的可能性。

以活载体疫苗应用的应评价疫苗毒株的水平传播和垂直传播能

力；检测疫苗毒株在应用环境中的存活能力，以及疫苗毒株在靶动物的存留和排毒情况。涉及人兽共患病病原的产品，还应评价产品对人类的安全性，以及疫苗毒株与其他微生物发生遗传重组的可能性。

3. 申请生产性试验

提交中间试验和环境释放阶段安全性试验的总结报告。

继续检测靶动物的生理学和病理学变化。

以核酸疫苗应用的继续检测重组质粒 DNA 抗性基因向环境微生物（如以大肠杆菌作为指示菌）中转移的可能性。

以活载体疫苗应用的继续检测疫苗毒株在应用环境中的存活能力，以及疫苗毒株在靶动物的存留和排毒情况。

4. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(六) 饲料用转基因微生物

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括重组微生物的构建、外源基因的表达、遗传稳定性等。

在实验室可控条件下，检测产品对靶动物的安全性，重点是产品用于靶动物后的临床反应，以及产品的食用安全性（如分析产品对小鼠的急性毒性）。

2. 申请环境释放

提交中间试验阶段安全性试验的总结报告。

检测产品对靶动物的安全性；分析产品中抗性质粒在环境中的转移情况。

以活载体微生物应用的应评价重组微生物的水平传播和垂直传播能力；检测重组微生物在应用环境中的存活能力，以及重组微生物

在靶动物的存留和排毒情况。涉及人兽共患病病原的产品，还应评价产品对人类的安全性，以及重组微生物与其他微生物发生遗传重组的可能性。

3. 申请生产性试验

提交中间试验和环境释放阶段安全性试验的总结报告。

继续检测产品对靶动物的安全性。继续分析产品中抗性质粒在环境中的转移情况。

以活载体微生物应用的继续检测重组微生物在应用环境中的存活能力，以及重组微生物在靶动物的存留和排毒情况。

4. 申请生物安全证书

提交各阶段的安全评价试验总结报告。

(七) 基因工程抗原与诊断试剂盒

1. 申请中间试验

提供前期研究报告，包括表达载体的构建、外源基因的表达、蛋白纯化工艺等。

2. 申请生物安全证书

提交中间试验安全评价总结报告。

(八) 其它

1. 利用反向遗传操作技术体系构建的基因组序列与原毒株一致而且无基因插入或缺失的活疫苗，只进行基因操作评价。

2. 利用反向遗传操作技术体系构建的经基因缺失、插入或重组制备的活疫苗，按基因缺失疫苗安全评价要求进行评价。

3. 凡是经过基因操作的毒株，终产品为灭活的，按基因工程亚单位疫苗安全评价要求进行评价。