

基因轉殖水產生物之田 間試驗管理概況與展望

撰文/葉信利·朱永桐

前言

依據2007年聯合國糧農組織(FAO)報告指出，全球捕撈漁業的生產量約已達93.8百萬公噸的極限。然而，由於世界人口持續增加，加上水產食品有益健康的意識抬頭，全球對水產食品需求不斷攀升，因此水產養殖將成為解決人類水產食品不足的最大寄望。自1970年代起，全球水產養殖生產維持平均每年8.8%的成長，相對高於捕撈漁業之1.2%。過去十年來全球水產養殖業，每年更以10%~15%的成長率持續增加，2005年全球水產養殖的產量為47.8百萬公噸，預估水產養殖業必須在2010年增產至52.0百萬公噸、2020年達70百萬公噸，2025年增產至77百萬公噸，2030年將再增至83百萬公噸，才足以應付全球市場對水產品的強大需求，可以預見水產養殖在未來產業之重要性。亞太地區水產養殖是全球水產養殖的大本營，產量占90%以上，可推知亞太地區國家對於優質水產技術產業的需求非常龐大，因此掌握重要水產生物種原，發展高科技水產技術產業將有很大的商機。目前台灣在水產科技產業之競爭，以養殖漁業配合生技產業之發展，具有強大潛能與優勢，在新品種開發、種苗培育、繁殖與生產、養殖管理技術、飼料生產、漁產加工及行銷系統等策略，皆已發展出完整之水產養殖產業技術，在國際市場上占重要一席之地。也從原本的養殖和撈捕，轉變成為種苗生產、養殖管理、品

種改良技術的提供者，並積極朝向基因轉殖水產生物之產品功能與商業價值發展。生物技術的進步，使得許多水產養殖上的難題獲得解決，這些解決之道中，基因轉殖技術是最主要的關鍵，許多應用的方法，都必須依賴基因轉殖技術來進行特定基因的表現。對於基因轉殖技術所產生之基因改造產品，人們一般最大的疑慮在於其食用的安全性和對環境的損害，然而這些基因改造產品，在完整且嚴密的檢查標準下，是可以管控而不至於造成損害的。

基因轉殖應用於水產養殖

基因轉殖魚自Zhu等人(1985)發表以來，已超過30種魚類進行基因遺傳工程之研究，其中許多為世界上已養殖之主要魚種，如鯉、吳郭魚、鮭、鮭、鱒...等(Devlin, Sundstrom and Muir, 2006)。水產生物常用基因轉殖的方法包括(1)顯微注射(microinjection)：利用微細針將所需基因直接注入目標生物細胞中；(2)電破法(electroporation)：細胞膜在適當的直流電場下會產生暫時性開孔，而使得外來基因得以進入細胞內；(3)基因槍法(infection with particle gun bombardment)：將基因塗抹在微小的金粉或其它惰性金屬微粒上，再施以氣壓使金屬微粒如子彈般打入目標生物細胞中；(4)脂質融合法(infection with lipofection)：以化學物質模擬細胞膜構造，包裹基因後再與目標生物細胞膜融合而達到基因轉殖的目的；(5)病毒媒介法(infection

with pantropic retroviral vectors)：將病毒致病基因除去後加入要轉殖之基因，再以此經人工改造過的病毒感染目標生物而使要轉殖之基因進入細胞內並插入染色體；(6) 精子媒介法 (Sperm-Mediated Gene Transfer) 則是先使精子與要轉殖的基因接觸，附著或進入精子後，再經由受精作用穿過卵細胞膜、細胞質進入細胞核。並依研究目的使用上述之方法在生物的生命週期中將外來基因帶入，一般選擇在配子（精、卵）時期或合子胚胎時期可增加外來基因插入被轉殖生物染色體上之機率，減少轉殖基因進入細胞後沒有插入染色體上，會隨著細胞分裂而稀釋及受到酵素分解而消失。因此，當轉殖基因插入染色體上，會隨著細胞分裂之染色體複製而同時被複製，並被傳遞到子代，展現轉殖基因的穩定性。

近年來，基因轉殖水產生物主要研發重點有發展基因轉殖技術平台、生殖控制基因轉殖生物不具有生殖能力 (Wong and Van Eenennaam, 2008)、生長促進以達到快速生長之研究等 (表一) (Devlin, Sundstrom and Muir, 2006)。國內學者利用精子當載體攜帶一段外源性生長基因片段，轉殖成功之泥鰱、九孔及蝦類成為具有快速成長的優勢 (蔡, 2007)。又從吳郭魚基因體中找到類胰島素生長因子 (IGF)，注射這種激素的吳郭魚，魚的體重及體長都可在十週內增加為未注射者的 1.5 倍，而利用餵食 IGF 方式進行吳郭魚的成長實驗，也已經證實有效，

將 IGF 基因轉殖入吳郭魚，確定可在魚的肝臟獲得表現 (吳, 2005)。抗病研究乃利用免疫有效分子基因表現，發現皆可以使轉殖生物具有抗病菌功能 (Adams and Thompson, 2006)、轉殖抗寒相關基因亦會增加水生生物的抗低溫能力，如轉殖其他魚種具有抗寒能力的特定激酶，可以讓斑馬魚模式的魚種表現出原本不具備的抗寒能力 (Sun *et al.*, 2002)；風險評估研究已漸注重各基因轉殖水生生物之生態影響，以作為上市前之生物安全評估的基礎資料、生物指標或生物反應器如對外來物質呈現陽性的反應器魚 (bioreactor)，作為利用基因轉殖的水生生物成為環境監測指標 (Gong *et al.*, 2003)，另藉由基因

表一 基因轉殖魚類功能標的表現顯著之例子

Phenotype targeted	Species	Transgene	Reference
Growth(>twofold)	Atlantic salmon	Growth hormone	(61)
	Tilapia		(62,63)
	Rainbow trout		(11,15,64)
	Coho salmon		(12,65)
	Chinock salmon		(11)
	Rohu		(66)
	Loach		(14,67)
Freeze tolerance	Atlantic salmon	Antifreeze protein	(68)
Disease resistance	Catfish	Cecropin	(69)
	Carp	Lactoferrin	(70)
	Medaka	Cecropin	(71)
Carbohydrate metabolism	Rainbow trout	Glucose transporter	(72)
	Rainbow trout	Hexokinase	(72)
Reproduction	Rainbow trout	Antisense GnRH	(57)
Lipid metabolism	Zebrafish	D6-desaturase	(73)
Phosphorus metabolism	Zebrafish	Phytase	(74)
Vitamin C metabolism	Rainbow trout	L-gulonolactone oxidase	(75,76)

資料來源：Devlin et al. (2006)

轉殖水生生物來生產生物活性物質 (bioactive) 以滿足醫藥需要, 或生產具有螢光心臟的斑馬魚 (Huang *et al.*, 2003), 以瞭解心臟再生的機制 (Raya *et al.*, 2003) 以及 N, K-ATPase 在心臟發育的角色 (Shu *et al.*, 2003)、觀賞魚如螢光魚 (Hsiao *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2001) 即非食用之基因轉殖水生動物, 因沒有食品安全之問題較容易被消費者接受, 同時也引起了人們的重視。因此, 生物技術之基因轉殖操作技術應用於水產養殖方面, 主要範疇已囊括遺傳育種、生長的促進、環境適應性的改良、水產疫苗的研發, 以及水產生物基因操作應用等 (Melamed *et al.*, 2002)。

風險評估

然應用基因轉殖生物可能引起之衝擊 (impact), 比較被關心的議題有 (1) 影響到動物之健康與福祉 (impacts of genetic modifications on the health and welfare of the animals): 由於轉基因產生之新的蛋白質 (protein) 可能會有未預期之影響, 如是否適合人類利用? 或具毒性? 或新的蛋白質生物活性對人類有害? 或產生過敏 (allergenic to humans) 等皆未知, 因此對產品必須針對毒性的測定 (toxicity determination)、過敏的分析 (assay for allergenic) 進行嚴格評估 (stringent assessment)。(2) 影響環境 (impacts of genetic modified animals on environment): 主要有二, 第一為基因性之影響 (genetic impacts), 顯示受適合度之影響 (transgene affects fitness) 如配對成功 (mating success), 稚魚生存能力 (juvenile viability) 等。據觀察 GH 基因轉殖魚顯示需高 O₂, 低臨界游泳速度, 高風險暴露於被獵食及較低幼魚生存能力中 (Devlin, Sundstrom and Muir, 2006)。第二為生態上之影響 (ecological impacts), 如目標種與非目標種間資源競爭, 棲息地之衝擊、與野生群之混種、自然族群之獵食等, 如經由基因改造生長快速的鮭魚, 若進入常態之生態水域則可能成為優勢種, 而使野生種或其他餘種

之生存受到絕種的危機。為避免對環境影響, 基因轉殖魚應蓄養於室內密閉循環系統之設施, 且具有物理性與生物性之防患措施, 對基因轉殖動物進行嚴謹環境影響評估, 大規模養成則應研發不孕之品系。(3) 影響利用或直接使用基因轉殖生物者之健康 (impacts of human health upon consumption of genetic modified animals): 因為轉殖基因插入引起未預期之基因性效果, 如突變 (mutation) 中斷內基因及影響轉基因的促因子 (promoter) 都會影響動物之適合度 (fitness)。又如轉殖基因產生之新蛋白質會有未預期之效果, 可能是毒性效果 (toxic effect), 或不利的生物活性影響發育、新陳代謝及生殖等, 所以對標的轉殖基因之殖入及選擇需特別謹慎。基因轉殖生物是人為產物, 因此有食物及生態方面的安全性考量, 雖然食品之安全性尚未有定論, 但是世界衛生組織表示基因改造生物沒有食品安全之顧慮, 在生態安全上的考量則如上所述, 風險影響評估必須要很嚴謹的實施。水產生物基因轉殖研究於 1985 年就有基因轉殖魚被發展出來 (Zhu *et al.*, 1985), 雖目前只有螢光魚流通市面, 生長快速的鮭魚則尚未被核准上市, 但預計今後幾年內將有更多種基因轉殖水產生物會投入商業性生產, 並不可避免地有可能這些基因改造產品會流入天然水域, 由於水域環境的流通性和水生生物的游動性, 基因轉殖水產生物的安全性研究與管理需求變的非常急迫。

國內對於基因轉殖水生生物安全性評估計畫自 93 年亦積極開始執行, 由中央研究院、海洋大學、大葉大學等單位共同規劃執行, 內容包括建立「基因轉殖水生生物安全性評估平台」相關之研發技術, 包括不孕魚類技術之研發、生殖系統之調控研究、轉基因生物體不孕、基因改造魚之生長激素基因之分析、轉殖基因檢測技術、基因改造魚正常行為之影響、基因改造魚肉對食品安全影響、致過敏安全性評估等 (潘, 2006)。目標為對於基因改造產品之安全管控, 以生物技術作為科學管理的基礎,

能做到事前防範，減少有可能發生於基因操作過程中的風險、確保基改產品食用的安全性及不會對環境的損害。目前，在水產生物技術的研發上，便是在最短的時間內，把相關研究成果移轉至各產業機構，要得到最直接的經濟效益的方法，就是儘快克服基因轉殖產品田間試驗的開放和管理上的客觀限制因素，包括法規規範的訂定及田間隔離試驗設施的建置。

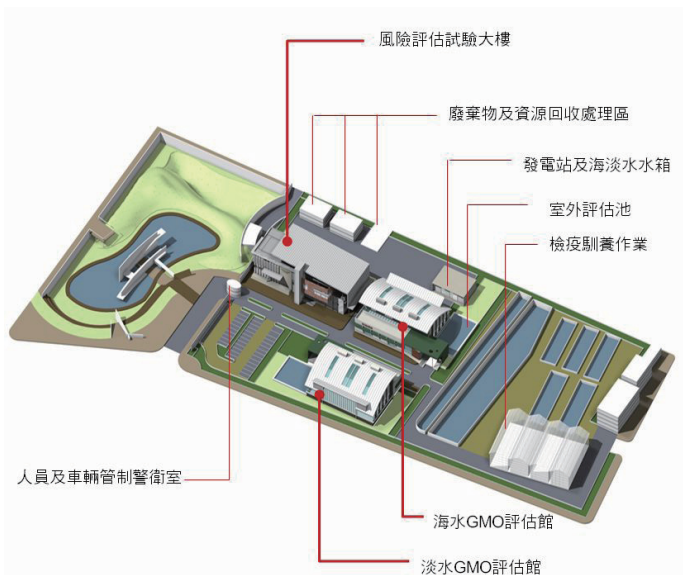
法規規範

目前國內有關基因轉殖水產動植物管理之法規規範，來自行政院農業委員會為推動生物技術研究發展，加強基因轉殖動物安全管理，並維護生態環境，曾於八十七年訂定「基因轉殖動物田間試驗管理規範」及「行政院農業委員會基因轉殖動物審議小組設置要點」各乙種。有關基因轉殖水產動植物之管理，漁業署曾於八十九年發布「陸上魚塢養殖漁業登記及管理規則」，該規則第十三條第二項明訂「經基因轉殖所產生之水產動植物，非經中央主管機關核准，不得繁殖、養殖或進口；其申請核准之程序、條件、基因轉殖水產動植物田間試驗之相關規定由中央主管機關定之」。後於九十四年同時配合「行政程序法」施行，因應「陸上魚塢養殖漁業登記及管理規則」於九十四年3月5日公告廢止，為賦予基因轉殖水產動植物管理法制定之法源依據，並依「漁業法」第六十九條第三項明定「水產動植物涉及基因轉殖者，應完成田間試驗及生物安全評估，始得推廣利用；其基因轉殖水產動植物田間試驗及繁、養殖管理規則，由中央主管機關定之。」，爰依據該規定，擬定「基因轉殖水產動植物田間試驗管理規則(草案)」，以落實基因轉殖水產動植物推廣利用前之田間試驗階段之管理。行政院農業委員會並於中華民國九十六年6月12日，依據「行政程序法第一百五十四條第一項」公告「預告訂定「基因轉殖水產動植物田間試驗管理規則」草案」，並徵詢對該公告內容之任何意見或修正建

議。草案條文共計三十一條，要點涵蓋「法源依據及用詞定義」、「基因轉殖水產動植物田間試驗之執行機構」、「設置基因轉殖水產動植物審議小組及其任務」、「田間試驗機構之設置及管理」、「田間試驗之申請規範」、「遺傳特性調查規範」、「生物安全評估規範」、「田間試驗執行與監測」、「所需書表、收費及施行日期」…等，作為田間試驗管理法律依據及田間隔離試驗設施建置之依循。

田間隔離試驗設施建置

田間試驗管理除依法規規範外，為了有效避免基因轉殖水產生物可能對環境生態造成之影響、及提供完善之隔離場地供基因轉殖水產生物在研發或未上市前進行風險評估管理，需設立標準化之隔離試驗設施來做有效之管理，兩者配合才能達成真正的安全控管。目前，台灣之基因轉殖水產生物田間隔離試驗設施正於行政院農業委員會水產試驗所海水繁殖研究中心興建，占地約5公頃，於九十三年1月開始規劃設計興建，迄今大部分建築主體結構已完成，預計九十七年底硬體應可建設完成，九十八年並進行試運轉及申請認可。而設置基因轉殖水產生物田間隔離試驗設施，首先必須所建置之軟、硬體試驗設施(場)能取得主管機關認可，以符合「基因轉殖田間試驗應在中央主管機關認可之田間試驗機構執行」之精神與規定。並且設施功能除建置能符合基因轉殖水產生物進行培育、繁殖、育苗、中間養成之要求，對於田間試驗之風險評估等需求設施均需依照「遺傳特性調查規範」、「生物安全評估規範」所訂定之項目考慮設計。就連人員、器材、車輛及基因轉殖水產動植物材料移動都須符合「田間試驗機構之設置及管理」要求。該基因轉殖水產生物田間隔離試驗場規劃分為三大區塊(圖一)，分別為前期作業區、評估作業區及成果宣導展示區。依使用目的及功能規劃設計不同之軟、硬體設施，前期作業區主要以檢疫馴養作業館(圖二)為主，提供基因轉殖水產生物進行培育、



圖一 基因轉殖水產生物田間隔離試驗設施園區



圖二 基因轉殖水產生物田間隔離試驗設施之檢疫馴養作業館

繁殖、育苗、中間養成之設施，並能達到安全隔離與防逃、防盜、防災之功能目標。評估作業區則做為基因轉殖水產生物進行研究及風險評估之場所，評估項目包括遺傳性狀調查（(1) 基因轉殖水產動植物之繁殖特性及一般性狀表現；(2) 基因轉殖水產動植物與近緣水產動植物、野生種或同種雜交之可

能性；(3) 外源基因在基因轉殖動植物之表現部位及其穩定性等）及生物安全評估（(1) 基因轉殖水產動植物與近緣水產動植物雜交之可能性，及演變成野外族群之可能性與其影響；(2) 基因轉殖水產動植物對目標生物可能之直接或間接影響；(3) 基因轉殖水產動植物對非目標生物可能之直接或間接影響；(4) 基因轉殖水產動植物所含外源基因流入其他水產動植物、病原生物之可能性與其影響；(5) 基因轉殖水產動植物發生基因外流情形時，對國內生態環境及原生種可能之影響等），建構以安全隔離之考慮與執行風險評估功能取向，分別有風險評估試驗大樓（生物安全評估實驗室、生理實驗室、生物技術實驗室、生物測定實驗室、無菌操作室…等）、海水 GMO 評估館、淡水 GMO 評估館及週邊相關設施（發電機室、廢水處理及材料處理…等），並根據基因轉殖水產生物所欲進行田間試驗之流程，與不同評估需求程度來規劃硬體設施規模。成果宣導展示區除兼有滯洪池排水功能外，並規劃以能讓民眾直接參與為目的，透過本區來展示基因轉殖水產生物產業研發成果及風險評估作業流程，提供大眾對基因轉殖水產生物產業研

發及風險安全評估試驗之瞭解。

展望與結語

基因改造生物未來之最重要課題為風險評估，而風險評估較為困難的地方，就是如何降低生態安全的顧慮及可能出現的生態危機，惟基因改造生物可能帶來的風險仍需靠科學的數據來驗證。從實驗

室的研發、田間試驗風險評估到商業化的生產皆須仰賴法律規範來管理，世界各主要國家在食品安全性及生態環境風險評估皆制定法規進行規範。基因轉殖水產生物生態環境衝擊評估與管理之執行有其特殊性，需充分考慮水產生物與周遭環境水域的關係。隨著基因轉殖技術的成熟和相應產業發展，勢必不少水產生物基因改造產品將像工業產品那樣能大量生產並商品化，不僅人們對天然生物產品長久以來的消費習慣將受到巨大衝擊，而且國際間在技術壟斷和產品推銷上將引發貿易戰，由於各國經濟發展狀況不同，基因改造產品在追求利潤的前提下，造成的影響也會有很大差異，整體而言基因改造產品可以增加大量生產及出口國之利潤。但由於各國對基因改造產品的安全看法不同，是否進口基因改造產品已成為爭論焦點，現今趨勢是有條件的輸出及輸入基因改造產品，如螢光魚外銷日本受阻事件（余和陳，2007），即顯現基因改造產品上市前田間試驗將扮演角色之重要，很容易被用來當做輸出或輸入之障礙條件。因此，若不趁早做好各種管理準備，很難在基因轉殖生物產品的國際性競爭上生存，尤其水產生物的生殖隔離遠比陸生生物困難，很容易發生與近緣野生種交配，研製和開發過程又有專一獨特的技術和運轉模式，進行風險評估也必須充分考慮水產生物的生物學特性和對生存環境水域的影響。是故需及早考慮進行基因轉殖水產生物遺傳安全性研究，包括由基因轉殖水產生物所獲得的新基因及其相應的表現能穩定地遺傳，及對後代無不良影響，並借助染色體多倍化育種技術，或性別控制技術使基因改造生物不孕、來作為有效地管制基因漂流之方法。且須建立基因轉殖水產生物的擴散及防逃措施管理機制，基因轉殖水產生物投入實用前，逃逸是其主要的擴散途徑。而逃逸的因素很多，特別是經由人有意或無意造成，為防止逃逸需謹慎選擇安全性良好的飼養場所，設置有效且嚴密的防逃措施。在非常情況下，考慮設置以物理或化學方法處理進排水，使有可能逃逸的基因轉

殖水產生物及時地全部被消滅，斷絕基因轉殖水產生物不經意之釋放或逃逸。避免長期穩定演化之生態系若受到基因轉殖水產生物個體或群體的侵入，可能會干擾及打破原有生態系的族群結構和演化過程，進而導致整個生態系的退化，及在遺傳多樣性方面亦隨着基因轉殖水產生物個體的擴散，藉同種之間或相關種間的交配，逐漸將轉殖之基因滲入生態系統的基因庫，使得失去生物的多樣性。綜之，未來必需落實基因轉殖水產生物研究之安全管理制度之建立，要求從事基因轉殖水產生物風險評估的組織或個人，皆對基因轉殖技術的安全管理問題充分瞭解，並具備相關的專業訓練和技術。基因轉殖產品在商業化生產上市前，通過主管機關及專家審議評估，搭配嚴密持續的監督管理，採標準作業程序完成風險評估之田間試驗，才能使基因轉殖水產生物產業健全發展。

AgBIO

葉信利 行政院農業委員會 水產試驗所
海水繁養殖研究中心 研究員兼主任
朱永桐 行政院農業委員會 水產試驗所
海水繁養殖研究中心 副研究員

參考文獻

1. Zhu, Z. et al. (1985) *Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (Carassius auratus L. 1758)*. J. Appl. Ichthyol. 1:31-34.
2. Devlin, R. H., Sundstrom, L. F. and Muir, W. M. (2006) *Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish*. Trends in Biotechnology 24(2):89-97.
3. Wong, A. C. and Van Eenennaam, A. L. (2008) *Transgenic approaches for the reproductive containment of genetically engineered fish*. Aquaculture 275:1-12.
4. 蔡懷禎 (2007) 研發水產經濟動物 (魚、蝦及貝類) 之轉殖的新技術。From http://cell.lifescience.ntu.edu.tw/faculty/tsai_hj.htm.
5. 吳金冽 (2005) 生物技術與水產養殖。科學發展月刊, 385: 26-31。
6. Adams, A. and Thompson, K. D. (2006) *Biotechnology offers revolution to fish health management*. Trends in Biotechnology 24(5):201-205.
7. Sun, H. W., Liu, C. W., Hu, C. F. and Wu, J. L. (2002) *The carp muscle-specific subisoenzymes of creatine kinase from distinct dimmers under different temperatures*. Biochemical Journal 368:799-808.
8. Gong, Z., Wan, H., Tay, T. L., Wang, H., Chen, M. and Yan, T. (2003) *Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle*. Biochemical and Biophysical Research Communications 308:58-63.
9. Huang, C. J., Tu, C. T., Hsiao, C. D., Hsieh, F. J. and Tsai, H. J. (2003) *Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish*. Dev. Dynamics 228:30-40.
10. Raya, A., Koth, C. M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R. M., Sternik, G., Tsai, H. J., Rodriguez-Esteban, C. and Izpisua-Belmonte, J. C. (2003) *Activation of notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:11889-11895.
11. Shu, X., Cheng, K., Pate, N., Chen, F., Joseph, E., Tsai, H. J., and Chen, J. (2003) *Na, K-ATPase is essential for embryonic heart development in the zebrafish*, Development 130:6165-6173.
12. Hsiao, C. D., Hsieh, F. J. and Tsai, H. J. (2001) *Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish*. Dev. Dynamics. 220:323-336.
13. Chou, C. Y., Horng, L. S. and Tsai, H. J. (2001) *Uniform GFP expression in transgenic medaka (Oryzias latipes) at the F0 generation*. Transgenic Res. 10: 303-315.
14. Melamed, P., Gong, Z., Fletcher, G. and Hew, C. L. (2002) *The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture*. Aquaculture 204:255-269.
15. 潘子明 (2006) 全球基因改造作物之生產現況與台灣對基因改造產品之管理。科技發展政策報導, 2006年4月, 頁341-365。
16. 余祜暉、陳葦芋 (2007) 日本基因改造觀賞魚資訊分析。台灣經濟研究院, 生物科技產業研究中心, 頁1-10。