

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申 报 书

转 *cry1Ac* 基因抗虫保铃棉 531 进口用作加工原料的安
全证书

孟山都远东有限公司

2004 年 1 月 20 日

中华人民共和国农业部制

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价

申 报 书

项目名称: 转 *cry1Ac* 基因抗虫保铃棉 531 进口用作加工原料的安全

证书

申请单位: 孟山都远东有限公司

地 址: 北京朝阳区工体北路甲 2 号盈科中心 IBM 大厦 916 室

邮政编码: 100027

填报日期: 2004 年 1 月 20 日

中华人民共和国农业部制



孟山都公司文件

© 2004 孟山都公司 版权所有

本申请书受著作权法保护。本申请书只限于由孟山都公司提交的农业转基因生物安全行政主管部门使用，并且只能用于本申请书的申请目的。没有孟山都公司的事先书面同意，任何出于其它目的使用本申请书将被严格禁止。孟山都公司提交本申请书给相关行政主管部门并不表示孟山都公司批准任何个人或实体获得任何权利对本申请书中涉及的知识产权进行授权许可或使用。

填 写 说 明

1. 在填写申报书之前，应认真阅读《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理方法》等有关法规，了解相关要求。
2. 此申报书同样适用于法规规定的报告类实验研究和中间试验的报告，名称分别改为“农业转基因生物实验研究报告书”和“农业转基因生物中间试验报告书”。
3. 申报书内容应当包括以下部分：申请表、项目内容摘要、工作目的和意义、国内外研究的相关背景资料、安全性评价、试验方案、相关附件资料、本单位农业转基因生物安全小组审查意见、本单位审查意见、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见。
4. 申请实验研究的，申请表按表 2 填写，项目名称应包含转基因性状、受体生物名称、实验研究所在省（市、自治区）名称和实验研究阶段等内容，如“转基因抗虫棉花在河北省的实验研究”。一份申报书只能包含同一物种的受体生物和相同的转基因性状。“安全性评价”可不填写。“试验方案”包括研究目标、外源基因的名称和来源、载体构建图谱、转化方法和规模、地点、安全控制措施等。“相关附件资料”包括法人证书和营业执照的复印件，若涉及合作项目，应提交双方合作或转让协议等。“所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送实验研究所在省（市、自治区）的农业行政主管部门。
5. 申请中间试验的，申请表按表 2 填写。申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。“所在省（市、自治区）级农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送中间试验所在省（市、自治区）级农业行政主管部门。
6. 申请环境释放和生产性试验的，申请表按表 2 填写；申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。对于已批准过的环境释放或生产性试验，在试验结束后，若同一转基因生物在原批准地点以相同规模重复试验，在申报时“安全性评价”部分可省略。
7. 申请农业转基因生物安全证书的，申请表按表 3 填写；申报书中“安全性评价”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写，“试验方案”不用填写；转基因植物的品种命名应符合《农业植物品种命名规定》；首次申请农业转基因生物品种（或品系）生产应用安全证书的，需提供《农业转基因生物品种（或品系）生产应用综合评价报告》，主要包括对我国生产、贸易、社会等方面影响。
8. 首次申请农业转基因生物生产性试验和安全证书的，在申请截止日 30 个工作日前提供所申报转基因生物活性样品和技术资料。样品要求：符合要求的，有活性的植物种子 2.5kg，动物 5ml 血样或 3g 组织各三份，微生物 3 批次，各 10 管样品。技术资料要求：申请生产性试验提供外源片段整合进基因组的 Southern 杂交结果、拷贝数及检测方法等；申请安全证书提供外源插入片段信息及转化体特异性 PCR 检测方法等。
9. 申报书应当用中文填写，一式十份，一律使用 A4 纸，正文用小四宋体打印，标准字间距和单倍行距，并提供光盘。对于不符合要求的申报书，不予受理。
10. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。
11. 受理时间：每年 3 次，截止日期分别为 3 月 1 日、7 月 1 日和 11 月 1 日。
12. 受理单位：农业部行政审批综合办公室科教窗口。地址：北京市朝阳区农展馆南里 11 号。邮政编码：100125。收款单位：农业部科技发展中心；开户行：中信银行北京朝阳支行；帐号：7111110189800000419。

目 录

相关技术报告目录	I
保密商业资料（CBI）声明	II
一、农业转基因生物安全证书申请表	1
二、项目内容摘要	4
三、工作目的和意义	6
四、国内外相关研究的最新动态	7
五、安全性评价	9
六、相关附件资料	61
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见	102
八、本单位审查意见	103
九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见.....	104

相关技术报告目录

编号	题目
报告 1	Bollgard 棉花转化事件 531 的进一步分子学特性分析(孟山都公司研究报告: MSL16882)
报告 2	1992 年抗虫棉花田间试验采集的幼叶和种子组织中特异蛋白表达水平评估(孟山都公司研究报告: MSL13275)
报告 3	抗虫棉田间试验中收获的棉花品系 757、1076、531 和 C312 棉籽质量和组成成分分析(孟山都公司研究报告: MSL14055)
报告 4	1998 和 1999 年田间试验中 MON531 抗虫棉农艺性状和表型特性数据的统计学分析(孟山都公司研究报告: RAR-09-439)
报告 5	大肠杆菌和抗虫棉来源 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白等同性评价及抗虫棉表达的 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白特性鉴定(孟山都公司研究报告: MSL13170)
报告 6	利用毒蛋白和公共序列数据库对 Cry1Ac 蛋白进行生物信息学分析(孟山都公司研究报告: MSL-18204)
报告 7	苏云金芽孢杆菌库斯亚克变种 HD-73 蛋白离体消化特征的评价(孟山都公司研究报告: MSL13299)
报告 8	新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 蛋白的安全性评价(孟山都公司发表文献, 1993)
报告 9	苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种[Cry IA(c)] HD-73 蛋白对小鼠的急性口服毒性研究(孟山都公司研究报告: MSL12708)
报告 10	新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 对小鼠的急性经口毒性研究(孟山都公司研究报告: MSL11940)
报告 11	抗虫保铃棉 531 在 1991、1992 和 1993 年抗虫效果试验总结(孟山都公司研究报告: RAR-2012-0612)
报告 12	抗虫保铃棉 531 对非靶标生物影响的研究 12-1、纯化 <i>B.t.k.</i> 蛋白对蜜蜂成虫的摄食影响评价(孟山都公司研究报告: CAR 181-92) 12-2、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白对寄生膜翅目丽蝇蛹集金小蜂 (<i>Nasonia vitripennis</i>) 食物毒性研究(孟山都公司研究报告: WL-93-234) 12-3、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白对瓢虫 (<i>Hippodamia convergens</i>) 的食物毒性研究(孟山都公司研究报告: WL-93-232) 12-4、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白: 对草蛉 (<i>Chrysopa carnea</i>) 的毒性研究(孟山都公司研究报告: WL-93-233) 12-5、棉籽粕对北方山齿鹑的膳食毒性研究(孟山都公司研究报告: WL-93-13)
报告 13	保铃棉 531 的食用安全性检测结果(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 2004) 13a. 大鼠 30 天喂养试验 13b. 游离棉酚检测

保密商业资料（CBI）声明

本申请书包含了许多属于孟山都公司开发并拥有的商业保密资料（CBI, Confidential Business Information）。这些商业保密资料（CBI）是由孟山都公司投入巨大的人力物力，经过长时间的研究获得的，包括研究路线的制定、各种表达调控元件的DNA序列、遗传操作策略和各种安全评价的数据等资料。孟山都公司目前只向世界各国农业转基因生物行政主管部门提交这些商业保密资料，用于法规安全评价和审批。一旦孟山都公司的竞争对手获得这些资料，竞争对手将会以很少人力物力投入在很短的时间内开发出类似保铃棉531的相应产品，这对孟山都公司来说是不公平的。孟山都公司在中国国内外面临着许多技术实力很强的竞争对手。因此，孟山都公司依据《农业转基因生物安全评价管理办法》第三章第二十七条的有关规定以及本申请书的填写说明，要求对本申请书的商业保密资料进行保密。

一、农业转基因生物安全证书申请表

项目概况	项目名称	转 <i>cry1Ac</i> 基因抗虫保铃棉 531 进口用作加工原料的安全证书					
	项目来源	孟山都公司					
转基因生物概况	类别	动物 <input type="checkbox"/> 植物 <input checked="" type="checkbox"/> 微生物 <input type="checkbox"/> (选√)					
	转基因生物名称		保铃棉 531				
	受体生物	中文名	棉花	学名	<i>Gossypium hirsutum</i>		
		分类学地位	锦葵科、棉属	品种(品系)名称	Coker312	安全等级	I
	目的基因 1	名称	<i>Cry1Ac</i>	供体生物	苏云金芽孢杆菌 (<i>Bacillus thuringensis</i>)		
		生物学功能	编码 <i>Cry1Ac</i> 蛋白, 抵御鳞翅目害虫对棉花的侵害				
		启动子	<i>P-e35S</i>	终止子	7S 3'		
	载体 1	PV-GHBK04		供体生物	大肠杆菌		
	* 标记基因 1	名称	<i>nptII</i>	供体生物	Tn5		
		启动子	<i>P-35S</i>	终止子	Nos 3'		
	* 报告基因 1	名称	无	供体生物	无		
		启动子	无	终止子	无		
	调控序列 1	名称		来源			
		功能					
转基因方法	农杆菌介导转化			基因操作类型	2		
转基因生物品系(株系)名称			保铃棉 531	转基因生物品系(株系)个数	1		
转基因生物安全等级		I	转基因生物产品安全等级	I			
试验概况	中间试验情况	转基因生物名称及编号	可以不填写				
		批准文号	可以不填写				
		试验的时间、地点和规模	可以不填写				
环境释放情况	环境释放情况	转基因生物名称及编号	可以不填写				
		批准文号	可以不填写				
		批准时间、地点和规模	可以不填写				

生产性试验情况	转基因生物名称及编号	可以不填写			
	批准文号	可以不填写			
	批准时间、地点和规模	可以不填写			
拟申请使用范围(省、自治区、直辖市)		境内			
拟申请使用年限		5年			
申请单位概况	单位名称	孟山都远东有限公司	地址	北京朝阳区工体北路甲2号盈科中心IBM大厦916室	
	邮编	100027	电话		
	传真		电子邮件		
	单位性质	境内单位(事业 <input type="checkbox"/> 企业 <input type="checkbox"/> 中外合作 <input type="checkbox"/> 中外合资 <input type="checkbox"/> 外方独资 <input type="checkbox"/>) 境外单位(企业 <input checked="" type="checkbox"/> 其它 <input type="checkbox"/> (选√))			
	申请人姓名		电话		
	传真		电子邮箱		
	联系人姓名		电话		
	传真		电子邮箱		
	单位名称	孟山都公司	法人代表		
联系人姓名		电话			
传真		电子邮箱			
主要完成人					
姓名			性别		
学历			专业技术职务		
何时何地曾从事何种基因工程工作					
参与完成人					
姓名	年龄	学历	职称	单位	在本项目中的分工

注: 1. 申请农业转基因生物实验研究的,“受体生物品种(品系)名称、目的基因启动子和终止子、载体、标记基因、报告基因、调控序列、转基因生物品系(株系)”栏目不用填写。

2. 如果“标记基因”或“报告基因”已删除,应在表中标注。
3. 申请人指所申请项目的安全监管具体负责人。

二、项目内容摘要

抗虫保铃棉 531 (孟山都公司编号 MON 531) 是孟山都公司应用二元质粒载体 PV-GHBK04 通过土壤农杆菌介导方法, 将来自于苏云金芽孢杆菌的 *Cry1Ac* 基因编码序列整合到常规棉花品种 Coker 312 的基因组中所得到的。

对保铃棉 531 中整合的外源基因的分子生物学分析最初应用 Southern 杂交、Western 印迹和 ELISA 方法于 1994 年完成。其后随着分子生物学研究的发展, 各项试验鉴定技术的灵敏度和精确性都有了很大进步, 所以孟山都公司于 2001 年对保铃棉 531 的分子生物学特性进行了重新鉴定, 鉴定结果表明保铃棉 531 中含有如下插入: 1) 功能性插入: 该插入中依次含有一个不完整的 *cry1Ac* 表达盒、一个完整的 *cry1Ac* 表达盒、一个 *aad* 基因编码序列、一个完整的 *nptII* 基因表达盒和来自质粒 PV-GHBK04 的 *oriV* 序列。其中不完整的 *cry1Ac* 表达盒片段包含部分 *cry1Ac* 基因的 3'序列和 7S 3'终止子, 该片段与完整 *cry1Ac* 表达盒中的相应序列插入方向相反。完整的 *cry1Ac* 基因表达盒由 e35S 启动子、全长 *cry1Ac* 基因和 7S 3'终止子组成, 能够表达 Cry1Ac 杀虫蛋白, 使保铃棉 531 具有鳞翅目害虫抗性。*nptII* 基因表达盒由 35S 启动子、全长 *nptII* 基因和 NOS 3'终止子组成, 可以表达新霉素磷酸转移酶 II (NPTII), 该蛋白在产品开发初期作为选择性标记, 用来选择转化体植株。插入中的 *aad* 序列包括细菌启动子和一个 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷酰基转移酶基因 (*aad*) 序列, 该基因作为选择性标记, 在基因克隆过程中用于筛选大肠杆菌转化菌株。由于 *aad* 基因在细菌启动子的控制下, 所以其只能在细菌中表达, 而不能在植物体内表达, 最初对保铃棉 531 进行的分子生物学鉴定也证实了这一点。*oriV* 序列是质粒在农杆菌中维持拷贝数所需要的复制起始位点, 在保铃棉 531 中不参与基因调控。2) 非功能性插入: 含有部分 7S 3'序列。该插入大小为 242bp, 不能产生任何表达产物。Southern 杂交分析表明, 保铃棉 531 功能性插入序列和非功能性插入序列都是在单一插入位点单拷贝插入的。插入的世代稳定性分析表明, 功能性插入能够稳定存在于保铃棉 531 自交后代及通过常规育种得到的商业化品种中。

对保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白和 NPT II 蛋白的安全性也进行了详细评价, 评价内容包括: 蛋白的安全使用历史、与已知毒蛋白和致敏原的序列相似性、在模拟胃肠液中的消化性、小鼠急性毒性试验。Cry1Ac 蛋白来源于苏云金芽孢杆菌, 含有 Cry 蛋白的苏云金芽孢杆菌作为微生物杀虫剂, 已经安全使用了 40 多年。Cry1Ac 与已知的毒蛋白、致敏原和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性, 在模拟胃肠液中能被迅速消化, 用极高剂量的 Cry1Ac 蛋白 (数千毫克每千克体重) 灌胃小鼠也不会出现毒性效应。NPT II 是最常用的抗生素标记, 它可以使受体具有新霉素和卡那霉素抗性。NPT II 蛋白广泛存在于大肠杆菌细胞内, 因此人类的肠道中经常可以发现这种酶 (Jefferson et al., 1986; Fuchs 等, 1993)。NPT II 在很多商业化转基因作物产品中都有应用, 其安全性也被详细研究及评价过, NPT II 蛋白与已知的毒蛋白、致敏原和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性, 在模拟胃肠液中能被迅速消化, 用高达 5000mg/kg 体重的剂量灌胃小鼠后, 不会产生任何毒性效应。因此, Cry1Ac 和

NPT II 对人类及动物健康不会产生不良影响。此外，人类可能摄入的棉花产品主要是棉籽油，棉籽油中蛋白的含量非常低，甚至可以忽略不计，所以人类摄入保铃棉 531 中表达的外源蛋白的可能性非常低。对保铃棉 531 产生棉籽的成分分析也表明，保铃棉 531 与常规对照棉花的组成成分实质等同。所有证据均表明，保铃棉 531 与常规对照的安全性相当，对人类及动物健康不会产生不良影响。

在环境安全性方面，保铃棉 531 转化体与常规对照相比，除了能够抵抗鳞翅目害虫危害，减少杀虫剂的使用外，在农艺性状和农业实践上没有任何区别。通过对多点种植的保铃棉 531 品系进行田间观察和监测，发现保铃棉 531 与非转基因对照在演变为杂草的可能性、表型及农艺性状、对病虫害敏感程度等方面均无显著差异。保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白通过结合靶标害虫中肠上的特异性受体发挥杀虫作用，其对鳞翅目害虫具有高度的专一性，而对非靶标生物无害。保铃棉 531 饲喂蜜蜂、草蛉、寄生蜂、瓢虫、弹尾目昆虫、跳虫、鹌鹑等非靶标生物，均为发现任何不良影响，也验证了 Cry1Ac 蛋白对鳞翅目靶标害虫的专一性。

按照相关法律法规的要求，孟山都公司向农业部转基因生物安全管理办公室提交了《转 *cry1Ac* 基因抗虫保铃棉 531 进口用作加工原料的安全证书》的申请，经农业部指定，中国疾病预防控制中心营养与食品安全所用含有保铃棉 531 及其亲本对照棉籽的饲料进行了 30 天大鼠喂养实验。结果发现，在整个试验阶段，动物未出现拒食现象，生长活动正常，被毛浓密有光泽。保铃棉 531 棉籽饲喂组和非转基因对照棉籽饲喂组的体重和食物利用率也无显著性差异。血液学检测结果表明：保铃棉 531 组雄性大鼠的淋巴细胞和中性细胞较亲本组差异有显著性，但均在实验室的历史检测范围内。其他包括白细胞计数、红细胞计数、血小板计数等的指标均无显著性差异。血生化检测的结果中，保铃棉 531 组和亲本组的谷丙转氨酶、尿素氮、甘油三酯等指标都观察到显著性差异，但是都在实验室的历史检测范围之内，不认为有生物学意义。病理学检查也未见保铃棉 531 棉籽对被检脏器有任何不良影响。所以认为，保铃棉 531 棉籽对动物体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理学组织观察会产生不利影响。此外，对保铃棉 531 及其亲本对照棉籽中游离棉酚的分析结果显示保铃棉 531 与亲本对照棉籽中游离棉酚含量分别为 6.30g/kg 和 5.83g/kg，含量相当。

综上所述，所有对保铃棉 531 的安全性评价数据均支持保铃棉 531 对人类健康及环境没有不良影响的结论。保铃棉 531 于 1995 年在美国获得栽培及食用/饲用批准以后，又先后在南非、阿根廷、澳大利亚/新西兰和哥伦比亚获得栽培审批，此外，还在加拿大、墨西哥、日本、韩国和欧盟获得了进口批准。按照中华人民共和国农业部的有关法规要求，现申请保铃棉 531 作为加工原料进口中国的安全证书，请农业部农业转基因安全管理办公室予以批准。

三、工作目的和意义

棉铃虫是世界棉花生产的一大“公害”，特别是在中国，因棉铃虫危害所造成的直接经济损失每年超过上百亿元人民币。孟山都公司经过多年研究开发，应用生物工程技术培育了能够防治包括棉铃虫，红铃虫在内的多种鳞翅目害虫的“保铃[®]”棉531。

保铃棉531含有来自于苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）的*cry1Ac*基因，使植株产生有杀虫作用的Cry1Ac蛋白，该蛋白可分布于棉花植株的茎、叶、棉铃等部位，能有效地控制棉铃虫的危害。

Cry1Ac蛋白对靶标害虫有很高的特异性，对益虫、鸟类、鱼类和哺乳动物等非靶标生物不产生任何影响，历时六年的安全性研究证实了MON 531及其产品在食用/饲用和环境方面的安全性。在对有关数据进行严格审查后，美国环保署（EPA）将MON 531中所含Cry1Ac蛋白列为“安全”级，免除耐量要求。美国食品和药品管理局（FDA）确定MON 531及其产品作为食品和饲料具有与常规棉种同样的安全性和营养价值。美国农业部（USDA）也解除了对MON 531的监管状态。截至目前，已有数十个保铃棉品种在美国、墨西哥、澳大利亚、阿根廷、南非等国进入了商业化生产。

大力推广含有保铃棉531转化事件的保铃棉品种，对棉农、环境和社会经济都可从中获益，保铃棉可以：

- 有效地防治鳞翅目害虫及其抗性的增加，大幅度提高棉花产量和棉农效益。
- 大量减少农药的使用和人工投入，降低生产成本。
- 减少化学药剂的生产、运输、储存和喷施，有利于环境保护和人类的安全。
- 符合病虫害综合防治原理，代表现代农业的发展方向。
- 促进可持续农业的发展。
- 提高农业科技含量，促进种子产业化进程。

四、国内外相关研究的最新动态

棉花是重要的经济作物和纤维作物，近年来由于气候条件和生态环境的变化、害虫抗药性的增强，以棉铃虫为主的棉花害虫为害一度十分猖獗。对此人们虽在积极探讨有效防治棉铃虫的措施，广泛使用化学防治、生物防治、农业防治等措施，虽取得了一定的成效，但仍没有达到有效防治的目的，目前仍以化学防治为主，且还伴随着用药次数不断增多、用药浓度不断提高、用药量不断增加的趋势；这样一方面造成棉成本提高，另一方面造成环境污染、人畜受害增多，破坏了生态平衡，还造成害虫抗药性的不断增强，据统计目前棉铃虫对菊脂类农药的抗性比1980年已增加几百倍，因而造成了棉铃虫防治的更加困难。而且目前我国棉铃虫的为害面积还在不断扩大，为害程度还在不断加重，造成不少地区棉花大面积减产或绝产，严重挫伤了农民的植棉积极性，使我国的棉花生产长期处于低谷状态，因而可以说棉铃虫已成为制约我国棉花生产及其相关产业(如纺织业、出口创汇业、农业可持续发展等)的一个重要因子。

除中国外，世界上其它植棉大国，如美国、澳大利亚等也都面临着棉花害虫日益为害严重的局面，因而世界各国都十分重视探讨新的害虫管理措施，其中利用基因工程手段培育抗虫棉品种是当今棉花害虫管理最经济最有效的方法。它不仅能使棉花自身产生抗（或杀死）害虫的物质，提高自身防御机制，而且能减少化学农药的使用，减少环境污染和农药残留，简化劳动操作和降低植棉成本，从而可提高棉农的植棉积极性，有利于棉花生产及有关行业如纺织业等的发展。因而世界各国都十分重视将外源抗虫基因导入棉花的研究、开发与利用，并取得了显著的进展，培育出了一大批高抗棉铃虫、红铃虫等棉花害虫的转基因抗虫棉，并已在生产上大面积推广使用，对棉花害虫尤其是棉铃虫的有效防治立下了汗马功劳。

棉花基因工程的研究起始于1987年，美国Agracetus公司首次报道获得带有外源标记基因的基因工程棉花。至今棉花基因工程的研究发展很快，先后经历了探索阶段、发展和应用阶段两个时期。

探索阶段（1987-1988）

这个时期主要是棉花基因工程的起步和探索阶段，主要是根据前人在其它作物上的成功经验，将外源标记基因（如抗卡那霉素基因等）导入到棉花品种中，并得到表达。这个时期的研究虽然在棉花育种和生产上没有多大的应用价值，但它却为以后基因工程在棉花上的应用探明了方法，奠定了基础。

发展和应用阶段（1989年至今）

在探索阶段成功经验的基础上，人们逐渐将棉花基因工程转向应用。1989年Barton、Rice、McCall、Firoozabadi等同时将Bt基因、Bxn基因导入到棉花品种中，获得的转基因棉株分别表现为抗虫、抗除草剂等性状，从而使棉花基因工程研究转入到快速发展和应用阶段。

目前在转基因抗虫植株培育中最常用的外源抗虫基因有苏云金芽孢杆菌毒素蛋白基因（简称Bt基因）、蛋白酶抑制基因、淀粉酶抑制基因、外源凝集

素基因、几丁质酶基因、褐毒素基因、蜘蛛毒素基因等，其中转化和抗虫效果较好的是Bt基因和豇豆胰蛋白酶抑制基因（简称CpTI基因）两种，因而转基因抗虫植株的培育大多选用这两类基因。目前人们已将这两类基因分别导入棉花植株，并已获得抗虫性极强并能稳定遗传的转化植株。关于CpTI基因对人畜的安全性问题，学术界仍有争议。

Bt乳剂作为一种生物杀虫剂农业上应用已有二三十年的历史，虽然它具有专一性强、效果好、对人畜无害等优点，但在自然界中它易被阳光钝化、雨水冲淋、且成本较高，从而限制了其在生产上的广泛应用。现代分子生物学证明，Bt乳剂之所以具有较好的杀虫效果，是因为它能产生一种伴孢晶体蛋白，当害虫吞食后，该蛋白在昆虫肠道碱性条件下被水解成毒性肽，并很快发生毒性，破坏昆虫肠的上皮细胞及其体内器官，从而导致昆虫死亡。

随着分子生物学研究的进一步深入，Schneppf和Whielry等首次从苏云金芽孢杆菌的*kurstaki*亚种HD-Dipei变种中分离并克隆了Bt基因。随后人们又从不同苏云金芽孢杆菌变种分离克隆了出50多个不同的Bt基因。在此基础上，Agracetus公司的研究者克隆了与Bt内毒素有关的DNA片段，并进行了必要的修饰，然后利用农杆菌介导法将其导入植株体内，是棉株的每个细胞都能形成自己的杀虫蛋白，四年的室内和田间试验证明：转基因棉花对鳞翅目害虫具有一定的抗性，且抗性能够稳定遗传。

除美国将Bt基因、CpTI基因导入棉花品种外，澳大利亚学者也已将美国Monsanto公司提供的改良Bt基因导入自育品种，获得了抗虫性较好的转化后代。80年代中后期，中国农业科学院技术研究中心（现更名为中国农科院生物技术研究所）、中国科学院微生物所、中国科学院上海植物生理研究所等单位也得到了转基因植株。经生物杀虫检测，结果证明虽有一定的杀虫性，但都难以或几乎检测不到Bt晶体蛋白的表达。1989年后，科学家们把注意力集中在杀虫晶体蛋白基因编码序列的改造和人工合成基因上，所构建的基因分别称为PM cryIA (b)、FM cryIA (b) 和 FM cryIVA。1990年将这些基因导入植物后，获得的转基因植株晶体蛋白表达量提高50~100倍，抗虫能力提高70%以上。

1991年，“转基因抗虫棉研制”项目获国家高技术研究发展计划（“863”计划）立项资助。在“863”计划资助下，我国开始了cryIA杀虫基因的全合成。1992年底，中国农科院生物技术研究所在国内首先合成了CryIA杀虫晶体蛋白的结构基因GFM cryIA(cryIA (b)、cryIA (c))，1993年将GFM cryIA基因导入棉花，1994年得到高抗虫能力的转基因棉花植株。1998年其核心技术“编码杀虫蛋白酶融合基因和表达载体及其应用”获国家技术发明专利，迄今，中国农科院生物技术研究所已成功地研制出Bt基因和CpTI（豇豆胰蛋白酶抑制剂）的双价抗虫基因、含GNA的抗蚜基因以及抗真菌病的抗病基因第一系列棉花抗虫、抗病基因。现已成功将改造后的Bt基因导入我过自育品种晋棉7号、中棉所12号、泗棉2号中。与此同时，山西棉花所还将中国农科学院生物技术研究中心提供的CpTI基因导入了我过自育品种并且还获得了转双基因的多抗虫基因工程棉花。

五、安全性评价

1 受体植物的安全性评价

1.1 受体植物的背景资料

1.1.1 学名、俗名和其他名称

棉花的拉丁名称为 *Gossypium hirsutum* L., 在中国统称棉花, 简称棉; 其它名称: 陆地棉。

1.1.2 分类学地位

属于植物界(Plantae)、被子植物门(Anthophyta)、双子叶植物纲(Dicotyledonopsida)、锦葵目(Malvales)、锦葵科(Malvaceae)、棉族(Gossypieae)、棉属(*Gossypium*), 拉丁学名 *Gossypium hirsutum*。

1.1.3 试验用受体植物品种(或品系)名称

试验用受体植物品种为 Coker312 栽培品系 (*Gossypium hirsutum* L.) , 是美国 Coker Pedigree 种子有限公司所拥有的种质资源。它是一种较老的棉花品种, 现在几乎已经不再种植。现在 Coker312 栽培品种主要用于转化, 是因为它在转基因过程中的组织培养系统较成熟。几位研究者 (Trolinder 和 Goodin, 1987; Umbeck 等, 1987) 认为, Coker312 及相关的栽培系在遗传上具有组织培养容易的特点。尽管 Coker312 已不再大面积种植, 但它仍具有商业价值。并且, 因为转基因保铃®棉是从 Coker312 得到的, 所以从农业角度来看, 此品种在用于试验目的时仍是可接受的、合适的。

1.1.4 是野生种还是栽培种

受体棉花属于栽培种, 但目前在美国已经不再商业化种植。

1.1.5 原产地及引进时间

棉花原产于高温、干旱、短日照的热带和亚热带的荒漠草原, 其起源是多中心的。

中国于 1865 年开始从美国引种陆地棉, 首先在上海试种。1914 年以后, 从美国大量引入陆地棉品种, 至 1958 年, 陆地棉品种基本取代了以前广泛栽培多年的中棉 (*G. arboreum*) 品种。(见《中国农业百科全书-农作物卷》)

1.1.6 用途

棉花是唯一一种由种子生产纤维的农作物, 它是世界上产量最高的植物纤维作物。棉纤维是纺织工业的主要原料; 棉籽含油分、蛋白质, 是食品工业的原料, 也用作饲料添加剂, 据文献记载, 有很长的安全使用历史。棉短绒也是化学工业和国防工业的重要物资。

1.1.7 在国内的应用情况

中国于 1865 年开始从美国引种陆地棉，首先在上海试种。1914 年以后，从美国大量引入陆地棉品种，至 1958 年，陆地棉品种基本取代了以前广泛栽培多年的中棉 (*G. arboreum*) 品种。自 1982 年以来，中国已跃居世界棉花生产和消费的首位，年产皮棉 400 万吨以上。以棉花纤维为原料的棉纺织工业已成为中国重要的支柱和创汇产业。棉籽油在棉产区为主要的食用油，脱毒棉籽饼是优质的高蛋白饲料，棉籽壳被用作生产食用菌的原料，棉短绒被用于化工和国防工业。（见《中国农业百科全书-农作物卷》）

1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响

棉花有着长期安全应用的历史，不会对人类健康和生态环境产生不利影响。但如不进行脱酚处理，棉籽油中的棉酚不利于人类健康，引起一疾病和造成不育。

1.1.9 从历史上看，受体植物演变成有害植物(如杂草等)的可能性

棉花作为一种野生植物对环境并无多少影响力。野生种群很少，并且局限于海滨地区或小岛 (Lee, 1984)。它有可能影响刚开发的土地，但很难侵扰已建立的生态系统。在中国的棉花栽培历史上，棉花演变成杂草或其他有害植物的现象还没有发现。其演变有害植物的可能性也是没有的，并且也未发现能与棉花在自然条件下进行杂交的其它种群存在。

1.1.10 是否有长期安全应用的记录

棉花作为一种主要的、最早被人类驯化的栽培作物，至少已在世界上存在了 5500 年。从古代文献记载和 18 世纪工业革命以来棉花的在全世界范围迅速推广的过程中，均未见到不安全应用的记录。

1.2 受体植物的生物学特性

1.2.1 是一年生还是多年生

受体品种和目前栽培的棉花品种一样，具有潜在的多年生习性，但从商业种植的角度而言，是典型的一年生植物。

1.2.2 对人及其他生物是否有毒，如有毒，应说明毒性存在的部位及其毒性的性质

已经知道，棉花能与环境中的其它物种相互作用，这些物种包括有益的及有害的节肢动物、微生物及周围的野草。棉花很早就在中国栽种，有很长的安全使用历史。一般认为棉花对人体无害，也不会致病，但它能产生棉酚和环丙烯脂肪酸，这两种物质都是天然的有毒物质。

棉酚是一种萜类物质，产生于棉花多种组织（包括种子）的分泌腺体 (Abou-Donia, 1876)。在棉籽食品及饲料产品中的棉酚含量应减至最低，因为它能引起人和单胃动物中毒，例如食欲不振、体重降低和呼吸困难 (Berardi 和 Goldblatt, 1980) 和精子活力降低。

环丙烯脂肪酸、梧桐脂酸和锦葵酸是所有棉花中特有的脂肪酸。梧桐脂酸和锦葵酸分别为 18 和 17 个碳原子长，并在丙烯环上包含一个双键。由于环丙烯脂肪酸的不良影响，其含量也应降低至最低，否则它会导致不安全的食品和饲料产品（Cherry 和 Leffler, 1984; Phelps 等, 1965）。环丙烯脂肪酸能抑制硬脂肪酸去饱和为油酸，这种硬脂肪酸能改变膜的渗透能力。

黄曲霉毒素是一组由 *Aspergillus flavus* 和 *Aspergillus parasiticus* 产生的真菌毒素，能污染食品和饲料产品（Jorgensen 和 Price, 1981）。棉籽则是最容易被黄曲霉菌污染的商品之一（Bagley, 1979）。防止或控制污染是很难的，因为污染可以是收获前在地里发生，也可以是收获后在储存期间发生（Goldblatt 和 Dollear, 1977）。由于它给人类和动物健康的危害，食品或饲料产品中黄曲霉素的检测和去毒是很关键的（Scott, 1991）。

1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏原存在的部位及其致敏的特性

棉花的主要产品为棉纤维，不存在致敏问题。棉籽的加工品通常也不被认为是致敏源。

1.2.4 繁殖方式是有性繁殖还是无性繁殖，如为有性繁殖，是自花授粉还是异花授粉或常异花授粉；是虫媒传粉还是风媒传粉

棉花的繁殖方式为有性繁殖，通常被认为属于常异花授粉作物，可以发生自然异交。但也有人将棉花归于自花授粉作物（Niles 和 Feaster, 1984）。它的花粉重而有粘性，不可能由风来传播，而通常是由昆虫来传播的，尤其是各种野蜂、熊蜂（*Bombus spp.*）和蜜蜂（*Apis mellifera*）等。

1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率

1.2.5.1 基因向栽培基因型的转移

因为相似的棉花基因型是完全亲合的，所以任何传授的花粉都有可能产生杂交种子。某块生产地里的异型杂交度主要取决于这块地的地理位置（Simpson, 1954），也就是取决于作物生态环境。最重要的因素是昆虫媒体的种类和数量。熊蜂（*Bombus spp.*）和蜜蜂（*Apis mellifera*）是最重要的（Theis, 1953; McGregor, 1959; Moffett 和 Stith, 1972; Simpson 和 Duncan, 1956），而前者则是最有效的传粉者。这在 Meredith 和 Bridge 的报告（1973）中特别提到，他们的结果表明异型杂交在美国密西西比三角洲已大为下降（在 11 个测试地点，从 1965 年 Simpson 和 Duncan 报道的 28% 下降到平均 2%，变化范围 0.0%—5.9%）。这在许多棉花种植区是很典型的，因为在这些种植区内昆虫栖居地的丧失和杀虫剂的大量使用司空见惯。

在栽培棉花的相邻植株、行及地块间的异型杂交度方面做了大量的工作（Afzal&Rahn, 1950a, b; Green&Jones, 1953; Thies, 1953; 其它汇总于 Brown, 1938）。Agracetus 公司（Umbeck 等, 1992）利用分子技术来测定由棉花缓冲的转基因棉花地块的异型杂交。此报告表明，边界行中异型杂交发生率不超过 6%，

而随着离地块距离的加大，各行的百分率迅速下降。

1.2.5.2 对野生植物种类的基因转移

有性生殖亲合性的尺度大大限制了中国境内栽培棉花的基因流动潜力。棉亚科 (Grossypieae) 中没有一个属是在这个国家起源的。棉属 (*Gossypium* sp.) 和其它属之间的远缘杂交很少，仅报道一例，即秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) (Brown, 1947)。在该例中，棉花是母本，所得一个杂交株发育不良，并且雄性、雌性均不育。Stewart(未发表)曾利用木槿 (*Hibiscus acetosella*, *H. syriacus*)、秋葵和 *Alyogyne* spp. 对半配子棉进行过无数次授粉。许多情况下得到了种子，但所得植株都是棉花。这表明可能发生了孤雌生殖。无数实验试图利用木槿作为母本与海岛棉 (半配子 *G. barbadense*) 杂交，均未成功 (Stewart, 未发表)。上述经验和文献表明，棉属 (*Gossypium*) 与其它棉葵科各属进行异型杂交的潜力很小，几乎为零。

1.2.6 育性 (可育还是不育，育性高低，如果不育，应说明属何种不育类型)

棉花是可育植物，并且因为相似的棉花基因型是完全亲合的，所以任何传授的花粉都有产生杂合种子的潜力(正如上面 1.2.5 所述)。

1.2.7 全生育期

棉花的栽培周期从出苗到棉桃成熟吐絮一般为 120-200 个生长日不等 (Waddle, 1984)，按其生育期间形态的变化通常分为苗期(出苗到现蕾)、蕾期(现蕾到开花)、花铃期(开花到吐絮)和成熟吐絮期。温度、光照、水分、土壤、空气及养分均会影响棉株的内在生理活动和外部形态结构，从而影响其最适生长。

1.2.8 在自然界中生存繁殖的能力，包括越冬性、越夏性及抗逆性等

棉花种子是唯一的继代结构。一般认为，棉花种子不能在环境中长时间生存。如果在地温到达 15℃ 之前种植，种子会在土壤中烂掉。发芽后，幼苗非常“脆弱”，甚至不能破土而出 (Hughes 和 Nelson, 1957)。另外栽培的棉花没有任何与长期生存相关的特性，例如种子休眠、长期的土壤存活能力、各种环境条件下的发芽能力、快速营养生长能力、短生活周期、高产籽率、种子的高扩散力或长距离扩散力 (Stewart, 1992)。在中国南部的一些棉花种植区，某些种植及收获后仍留在地里的种子，如果条件合适的话，会在秋天发芽。没有发芽的种子会烂掉或失去活力，而这些自行发芽的棉花可以很容易地通过一些现代农业措施加以控制，这些措施包括栽培措施和使用适当的除草剂，例如阿特拉津、草甘膦、溴苯腈、草胺膦和百草枯等。

1.3 受体植物的生态环境

1.3.1 在国内的地理分布和自然生境

中国是世界主要产棉大国，植棉历史悠久，植棉地域辽阔。植棉区东起辽河流域及长江三角洲，西至塔里木盆地边缘，南至海南岛崖县，北抵马纳斯河流

域，在北纬 18 度至 46 度、东经 76 度至 124 度之间。

如 1.2.8 中所述，棉花作为一种栽培作物在自然条件下难于存活，在中国未见有关于自然种群存在的报道。在农田中，棉花构成其所处农业生态环境的一部分。

1.3.2 生长发育所要求的生态环境条件，包括自然条件和栽培条件的改变对其地理分布区域和范围影响的可能性

棉花生长发育对生态环境条件的要求主要有以下几个方面：

- 温度和热量：棉花为喜温作物，种子萌发最低温度为 $10-12^{\circ}\text{C}$ ，棉苗生长的最低温度为 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。现蕾最低温度为 $19-20^{\circ}\text{C}$ ，开花结铃期的最适温度为 $25-35^{\circ}\text{C}$ ，低于 15°C 或高于 35°C ，则不利于花粉发育，引起蕾铃脱落。棉铃吐絮期要求温度在 20°C 以上。

陆地棉整个生育期所需 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 的活动积温约 $3000-3600^{\circ}\text{C}$ 。早熟品种和晚熟品种对活动积温要求不同，所需生育期分别为 120-220 天左右。

- 光照：棉花为短日照作物。一般棉苗需要在日平均温度 $20-25^{\circ}\text{C}$ 条件下，经过 18-30 天的 8-12 小时短日照才能现蕾开花。由于大多数陆地棉栽培品种长期在高纬度驯化和选择，对短日照已不甚敏感。棉花在生育期间喜光照，不耐荫蔽。棉叶的光饱和点较高，为 7 万-8 万勒克斯，其光补偿点亦较高，为 1000-2000 勒克斯。
- 水分：棉花生育期长，枝多叶大，蒸腾系数大，需水较多。由于根系发达，吸水力强，也较能耐旱。苗期需水较少，蕾期需水逐渐增多，到盛花期需水最多，吐絮后又日趋减少。土壤含水率宜保持在田间最大持水量的 60% 左右，低于 55% 或高于 80%，均对棉株发育不利。
- 空气：棉花进行光合作用时，要求二氧化碳最适浓度为 0.1% 左右；二氧化碳的补偿点为 0.01% 左右，饱和点在 0.03% 以下。土壤中空气容量以 30% 为宜。
- 土壤：棉花要求土壤深厚，土质疏松，土壤水分适宜，地下水位低。棉花具有轻度耐盐碱能力，在 pH 值 6.5-8.5 范围内均能正常生长，但以中性至微碱性为宜。
- 养分：棉花生育期间除了需要大量的氮、磷、钾及钙、硫、镁、钠、铁等元素外，同时需要硼、锰、锌、铜、钼等微量元素。

以上各种外界环境因素都会影响棉株的内在生理活动和外部形态结构，而且这些因素是相互交错发生作用的。

从理论上讲，自然环境条件(主要是温度)的变化，可以改变棉花的适生范围，但在中国，正如上面 1.2.8 中所述，已被驯化多年的棉花在自然条件下的繁殖能力、抗逆性等均较差，不会成为杂草，只能在人工栽培的条件下扩大或缩小其地

理其分布区域。人工栽培条件的改变确实可以改变棉花的地理分布区域，如保护地种植等。

1.3.3 是否为生态环境中的组成部分

棉花种植田在棉花种植区的整个农业生态系统中，为重要的生态环境组成部分。其所起作用的大小与方式，则取决于其所处农业生态区的棉田种植制度。在我国主要棉区，种植制度基本上可分为两种类型：1) 冬季休闲的棉花一年一熟制；2) 以棉花为主与大麦、小麦、油菜、蚕豆、马铃薯、洋葱等作物套种、复种或与甘薯、玉米、花生等间作的一年两熟制。

1.3.4 与生态系统中其他植物的生态关系，包括生态环境的改变对这种（些）关系的影响以及是否会因此而产生或增加对人类健康和生态环境的不利影响；

在一年一熟制棉田生态系统中，棉花与其它田间植物(杂草)互相争夺光能、土壤养分、水分等资源，会互相影响生长发育。生产实践中，棉农会采用中耕、施用除草剂、覆盖地膜、手工拔除等方法控制或去除杂草，以最大限度地减少杂草对棉花生长的不利影响。

在与多种作物间作、套种或复种的一年两熟制棉田生态系统中，棉花除了会与杂草相互影响外，还会与其它间作、套种、复种的作物产生互作，相互影响。在生产实践中，常采取下列措施以减少不利影响：

- 棉田套种：在同一田块，以大麦、小麦油菜等冬作物为前茬，按一定比例条播或点播(栽)，并预留棉行。春季套种或套栽棉花。通过套栽，可缩短共生期；选择最适种植比例，可有效地缓和两熟作物相互争光、争肥水的矛盾。
- 棉田复种：在同一田块，冬作物收获后播种或移栽棉花的两熟种植制。不需预留棉行。
- 棉田间作：在同一田块，以棉花为主，与甘薯、花生、西瓜等春作物组成等幅或宽窄幅相间的带状种植，共生期虽长，但由于高矮搭配，既提高了前中期的光能利用率，又在后期保持了较好的通风透光。
- 棉田轮作：有计划地将棉田和其它作物轮作换茬，能充分利用、保持和提高土壤肥力，减轻病虫害，防除田间杂草，如南方棉区的棉稻轮作，北方棉区的棉粮轮作，西北棉区的棉花与苜蓿轮作等。

生态环境的改变对这种（些）关系没有显著影响，更不会因此而产生或增加对人类健康和生态环境的不利影响。

1.3.5 与生态系统中其他生物（动物和微生物）的生态关系，包括生态环境的改变对这种（些）关系的影响以及是否会因此而产生或增加对人类健康或生态环境的不利影响

棉花与棉田生态系统中的动物(主要为节肢动物)和微生物的关系，受生态环

境影响很大，但这种影响不会直接对人类健康或生态环境产生或增加不利影响。

- 棉花与节肢动物的关系：主要体现为棉花与田间害虫及益虫之间的关系。据不完全统计，中国的棉花害虫有300余种，较常见的有30余种，主要为昆虫纲和蛛型纲等节肢动物，而这些害虫的天敌动物种类数量则更多。棉花与这些动物之间的关系错综复杂，相互制约。生态环境的变化会影响田间动物的虫口密度、消长变化及棉花受害程度。
- 棉花与其它微生物的关系：主要体现为棉花与寄生性棉花病害及有益菌群和共生菌群之间的关系。据不完全统计，中国的棉花病害有40余种，较常见的有20余种，其病原物主要是真菌、细菌和病毒等微生物，此外，还有多种有益菌群和一些共生菌群。棉花与这些微生物之间的关系错综复杂，相互制约。生态环境的变化会影响这些微生物存活和繁殖，进而表现为影响病害的发病与否、病害扩散速度与流行规模及棉花受害程度。

1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度；

棉花在中国已安全种植多年，为常见的主要栽培作物。未见过棉花对生态环境有任何影响及其存在潜在危险的报道。

1.3.7 涉及到国内非通常种植的植物物种时，应描述该植物的自然生境和有关其天然捕食者、寄生物、竞争物和共生物的资料

棉花属于主要农作物，在中国已种植多年。

1.4 受体植物的遗传变异

1.4.1 遗传稳定性

在人工栽培及自然条件下，陆地棉品种具较高遗传稳定性。

1.4.2 是否有发生遗传变异而对人类健康或生态环境产生不利影响的资料

目前未见棉花发生遗传变异而对人类健康或环境产生不利影响的报道。

1.4.3 在自然条件下与其他植物种属进行遗传物质交换的可能性

有性生殖亲合性的尺度大大限制了中国境内栽培棉花的基因流动潜力。棉亚科（Grossypieae）中没有一个属是在这个国家起源的。棉属（*Gossypium* sp.）和其它属之间的远缘杂交很少，仅报道一例，即秋葵（*Abelmoschus esculentus*）（Brown, 1947）。在该例中，棉花是母本，所得一个杂交株发育不良，并且雄性、雌性均不育。Stewart（未发表）曾利用木槿（*Hibiscus acetosella*, *H. syriacus*）、秋葵和 *Alyogyne* spp. 对半配子棉进行过无数次授粉。许多情况下得到了种子，但所得植株都是棉花。这表明可能发生了孤雌生殖。无数实验试图利用木槿作为母本与海岛棉（半配子 *G. barbadense*）杂交，均未成功（Stewart, 未发表）。上述经验和文献表明，棉属（*Gossypium*）与其它棉葵科各属进行异型杂交的潜力很小，几乎为零。因此，在自然条件下，棉花与其它植物种属进行遗传物质交换的可能性极小，几乎为零。

1.4.4 在自然条件下与其他生物（例如微生物）进行遗传物质交换的可能性

理论和实践均已证明，作为以有性繁殖为唯一繁殖方式的高等被子植物，陆地棉在自然条件下与其他生物进行遗传物质交换的可能性非常小，近乎为零。确有理论推测，高等植物在其漫长的进化过程中，有可能从低等的寄生性微生物或植物中获得过一些异源基因，但这只是理论推测，而且该过程是以数十万、数百万年计的，现实发生的可能性极小。

1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性

转基因棉花已在我国大面积种植，除了传统的遗传育种方法对受体作物进行监测外。还可利用现代生物技术象 PCR、RFLP 等对受体植物进行监测，而且十分有效。

1.6 受体植物的其他资料

目前没有关于受体植物的其它资料。

1.7 根据上述评价，参照本办法第十一条有关标准划分受体植物的安全等级。

综上所述，棉花对人体或者动物不具有毒性，对环境产生负面效应或者演变成为一种有害的生物的可能性极小。因此，根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十一条的规定，本项目的受体植物的安全等级为 I。

2 基因操作的安全性评价

2.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的叙述

保铃棉 531 是孟山都公司利用生物技术开发的抗虫棉转化事件。保铃棉 531 通过将编码苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)中杀虫蛋白 Cry1Ac 的 DNA 序列插入到棉花品种 Coker 312 的基因组中得到的, Cry1Ac 蛋白对危害棉花最为严重的鳞翅目害虫具有抗性。一个编码新霉素磷酸转移酶 II(NPTII)蛋白的 DNA 序列也被插入保铃棉 531 中, 用来在转化过程中利用卡那霉素选择和鉴定转基因细胞。此外, 被同时插入的还有一个 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷酰转移酶基因(aad)。上述基因通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)单边界二元转化载体 PV-GHBK04 被稳定地转入棉花细胞的基因组中。*cry1Ac* 和 *nptII* 基因均可在植株中表达, 而 *aad* 基因由于受细菌启动子的控制, 在植株中不产生 *aad* 的基因产物。

2.2 实际插入或删除序列的以下资料:

2.2.1 插入序列的大小和结构, 确定其特性的分析方法:

对保铃棉531中整合的外源基因的分子生物学分析最初应用Southern杂交、Western印迹和ELISA方法于1994年完成。其后随着分子生物学研究的发展, 各项试验鉴定技术的灵敏度和精确性都有了很大进步, 所以孟山都公司于2001年对保铃棉531的分子生物学特性进行了重新鉴定, 鉴定结果表明保铃棉531中含有如下插入: 1) 功能性插入: 该插入中依次含有一个不完整的*cry1Ac*表达盒、一个完整的*cry1Ac*表达盒、一个基因编码序列、一个完整的*npt II*基因表达盒和来自质粒PV-GHBK04的*oriV*序列。其中不完整的*cry1Ac*表达盒片段包含部分*cry1Ac*基因的3'序列和7S 3'终止子, 该片段与完整*cry1Ac*表达盒中的相应序列插入方向相反。完整的*cry1Ac*基因表达盒由e35S启动子、全长*cry1Ac*基因和7S 3'终止子组成, 能够表达Cry1Ac杀虫蛋白, 使保铃棉531具有鳞翅目害虫抗性。*nptII*基因表达盒由35S启动子、全长*nptII*基因和NOS 3'终止子组成, 可以表达新霉素磷酸转移酶II(NPTII), 该蛋白在产品开发初期作为选择性标记, 用来选择转化体植株。插入中的序列包括细菌启动子和一个3'(9)-O-氨基糖苷腺苷酰基转移酶基因(aad)序列, 该基因作为选择性标记, 在基因克隆过程中用于筛选大肠杆菌转化菌株。由于基因在细菌启动子的控制下, 所以其只能在细菌中表达, 而不能在植物体内表达, 最初对保铃棉531进行的分子生物学鉴定也证实了这一点。*oriV*序列是质粒在农杆菌中维持拷贝数所需要的复制起始位点, 在保铃棉531中不参与基因调控。2) 非功能性插入: 含有部分7S 3', 该插入大小为242bp, 不能产生任何表达产物。

功能性插入片段及其基因组侧翼序列分析

用位于功能性插入片段及其相邻的基因组侧翼序列的 7 对引物对保铃棉 531 插入片段的组成和排列进行 PCR 分析。每对引物扩增产物的位置、大小及 PCR 扩增结果见图 1 和图 2。同时以非转基因对照 Coker312 的基因组 DNA 和质粒 PV-GHBK04 作为阴性和阳性对照, 以无 DNA 模板对照作为系统对照进行 PCR 反应。如预期, 所有 7 对引物在非转基因对照和无 DNA 模板对照中都没有产生 PCR 产物。6 对引物在保铃棉 531 和质粒对照中产生了预期大小的扩增产

物。由于质粒中不含有基因组侧翼序列，含有基因组侧翼序列特异性引物的一对引物在质粒对照中没有产生任何扩增产物。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 序列分析后进行拼接，得到整个功能性插入的序列信息，以确定功能性插入中各遗传元件的组成及排列。与完整 *cryIAc* 表达盒反向相连的部分 *cryIAc* 表达盒序列及其相邻的基因组侧翼序列见图 5。含有完整 *cryIAc* 表达盒的插入片段序列见图 6。插入片段各元件的组成及排列示意图见图 10。表 1 列出了各遗传元件在图 6 序列中的位置。

以保铃棉 531 种子基因组 DNA 为模板，以分别位于 5' 和 3' 插入-侧翼序列区域的两对引物（引物 C/D 和引物 A/B，图 3）进行 PCR 扩增。将得到的扩增产物进行 DNA 序列分析，得到了保铃棉 531 的 5' 和 3' 端侧翼序列信息（图 7 和图 8）。

非功能性插入片段及其基因组侧翼序列分析

用位于非功能性插入序列及其相邻的基因组侧翼序列的两对引物（图 4）对保铃棉 531 的非功能性插入片段进行分析。PCR 扩增得到大小分别为~700 和~600bp 的两个产物，将两个产物进行 DNA 序列分析后进行拼接，得到了包含基因组侧翼序列的非功能性插入片段，非功能性插入片段大小为 242bp，含有来自于质粒 PV-GHBK04 的 176bp 7S 3' 序列和 66bp 的多聚接头。非功能性插入及其相邻的基因侧翼序列见图 9。

图 1. 对保铃棉531功能性插入的PCR分析（产物1-4）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 2. 对保铃棉531功能性插入的PCR分析（产物5-7）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 3. 保铃棉531功能性插入侧翼序列的PCR分析鉴定

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 4. 对保铃棉531非功能性插入的PCR分析

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 5. 保铃棉531功能性插入中与完整*cryIAc*表达盒反向相接的部分*cryIAc*表达盒及其相邻的基因组侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 6. 保铃棉531功能性插入中含有完整*cry1Ac*表达盒的插入片段序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 7. 功能性插入的5'侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 8. 功能性插入的3'侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 9. 保铃棉531非功能性插入及其相邻的基因组侧翼序列序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

A.



B.

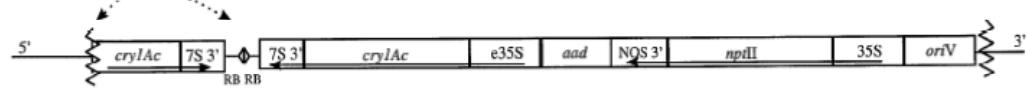


图 10. 保铃棉531中插入片段的示意图

A 图为 1994 年分子特性鉴定的结果，B 图为 2001 年应用灵敏度更高、更精确的方法对保铃棉 531 进行重新分子特性鉴定的结果。在最初的鉴定中认为部分 *cry1Ac* 表达盒与含有完整表达盒的片段顺向相连。新的分子鉴定结果表明该片段与含有完整表达盒的片段反向相连，并又鉴定出一个 242bp 的非功能性插入。

表 1. 保铃棉531中含有完整cry1Ac表达盒的插入片段中的遗传元件汇总及在附图7序列中的位置

遗传元件	在附图 7 中的位置	功能 (参考文献)
间插序列	1-38	合成序列, 多聚接头。
7S 3'	39-479	来自于大豆 7S 种子储存蛋白基因(Schuler <i>et al.</i> , 1982)的 3'非翻译区, 用于指导 cry1Ac 基因 mRNA 的多聚腺苷酸化。
间插序列	480-521	合成序列, 多聚接头。
cry1Ac	522-4058	合成的苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白变异蛋白编码序列 (Donovan <i>et al.</i> , 1992)。
间插序列	4059-4089	合成序列, 多聚接头
P-e35S	4090-4708	花椰菜花叶病毒(CaMV) 启动子(Odell <i>et al.</i> , 1985), 带有重复增强子区域(Kay <i>et al.</i> , 1987)。
间插序列	4709-4816	合成序列, 多聚接头。
aad	4817-5605	细菌启动子和来自于转座子 Tn7 的 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶基因编码序列(Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)。
间插序列	5606-5684	合成序列, 多聚接头。
NOS 3'	5685-5925	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区, 其功能是终止转录, 控制 nptII mRNA 的多腺苷化(Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
间插序列	5926-5940	合成序列, 多聚接头。
npt II	5941-6908	从 Tn5 分离出来的新霉素磷酸转移酶 II 基因编码序列(Beck <i>et al.</i> , 1982)。表达该基因可以使植物具有卡那霉素抗性, 作为选择标记用于筛选转化体(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
间插序列	6909-6941	合成序列, 多聚接头。
P-35S	6942-7265	花椰菜花叶病毒(CaMV) 的 35S 启动子区(Gardner <i>et al.</i> , 1981; Sanders <i>et al.</i> , 1987)。
间插序列	7266-7361	合成序列, 多聚接头
Ori-V	7362-7755	来自于广谱寄主质粒 RK2, 为质粒在农杆菌中的复制起点(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
间插序列	7756-7916	合成序列, 来自于质粒骨架。

2.2.2 删除区域的大小和功能;

保铃棉 531 研发过程外源序列插入时没有删除棉花基因组序列。

2.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列;

cry1Ac 基因的核苷酸序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

cry1Ac 基因的推导氨基酸序列

1	MDNNPNINEC	I PYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLSEF
51	VPGAGFVLGL	VDIIWGFGP	SQWDAFLVQI	EQLINQRIEE	FARNQAISRL
101	EGLSNLQIY	AESFREWEAD	PTNPALREEM	R1QFNDMNSA	LTTAIPLFAV
151	QNYQVPLLKV	YVQAANLHLS	VLRDVSFVGQ	RWGFDAATIN	SRYNDLTRLI
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	QFRRELTLTV	LDIVSLFPNY
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSF	RGSAAQGIEGS	IRSPLHMDIL
301	NSITIYTDAH	RGEYYWSGHQ	IMASPVGFS	PEFTFPLYGT	MGNAAAPQQRI
351	VAQLGQGVYR	TLSSTLYRRP	FNIGINNQQL	SVLDGTEFAY	GTSSNLPSAV
401	YRKSGTVDSL	DEIPPQNNNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SNSSVSIIRA
451	PMFSWIHRSA	EFNNIIASDS	ITQIPAVKGN	FLFNGSVISG	PGFTGGDLVR
501	LNSSGNNIQN	RGYIEVPFIHF	PSTSTRYRVR	VRYASVTPIH	LNVNWGNSSI
551	FSNTVPATAT	SLDNLQSSDF	GYFESANAFT	SSLGNIVGVR	NFGTAGVII
601	DRFEFIPVTA	TLEAEYNLER	AQKAVNALFT	STNQLGLKTN	VTDYHIDQVS
651	NLVTYLSDEF	CLDEKRELSE	KVKHAKRLSD	ERNLLQDSNF	KDINRQPERG
701	WGGSTGITIQ	GGDDVFKEVY	VTLSGTFDEC	YPTYLYQKID	ESKLKAFTTRY
751	QLRGYIEDSQ	DLEIYSIRYN	AKHETVNVPG	TGSLWPLSAQ	SPIGKCGEPM
801	RCAPHLEWNP	DLDCCSRDGE	KCAHHSHHFS	LDIDVGCTDL	NEDLGVVVIF
851	KIKTQDGHAR	LGNLEFLEEK	PLVGEALARV	KRAEKKWRDK	REKLEWETNI
901	VYKEAKESVD	ALFVNSQYDQ	LQADTNIAAMI	HAADKRVHSI	REAYLPPELSV
951	IPGVNAAIFE	ELEGRIFTA	SLYDARNVIK	NGDFNNGLSC	WNVKGHVVDVE
1001	EQNNQRCSVLV	VPEWEAEVSQ	EVRCVCPGRGY	ILRVTAYKEG	YGEGCVTIHE
1051	IENNTDELKF	SNCVEEEIYP	NNVTTCNDYT	VNQEYGGAY	TSRNRGYNEA
1101	PSVPADYASV	YEEKSYTDGR	RENPCFEFNRG	YRDYTPLPVG	YVTKELEYFP
1151	ETDKVWIEIG	ETEGTFIVDS	VELLMEE		

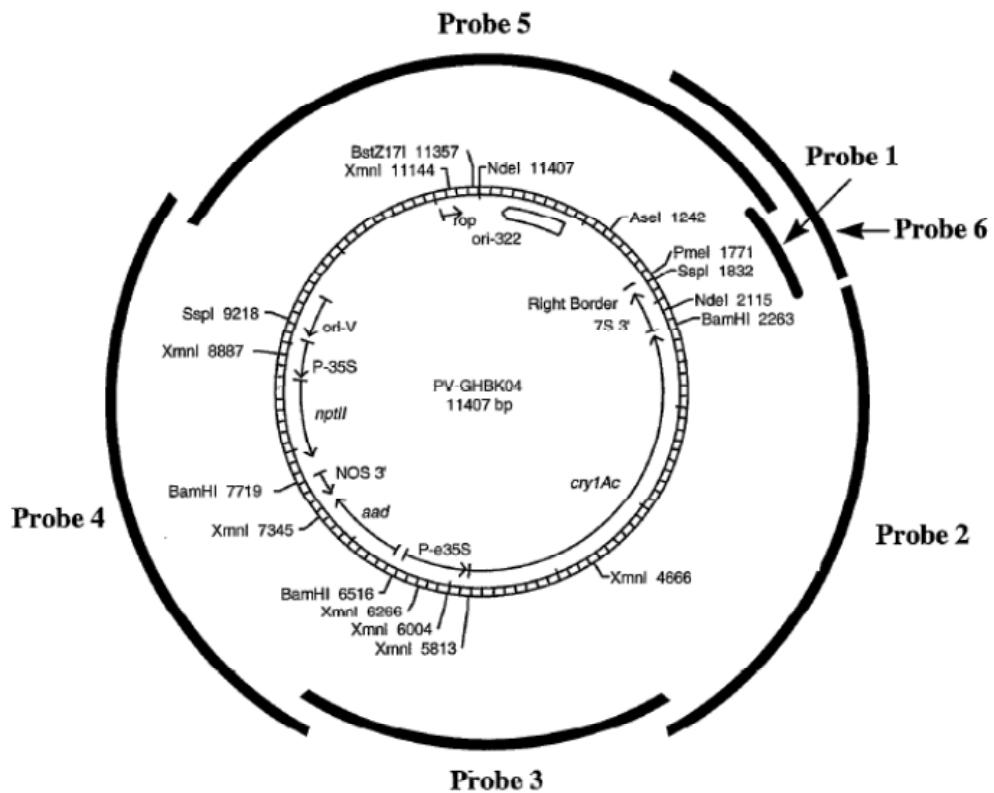
2.2.4 插入序列在植物细胞中的定位(是否整合到染色体、叶绿体、线粒体，或以非整合形式存在)及其确定方法;

利用 Southern 杂交、PCR 方法，证明保铃棉 531 中的 *cry1Ac* 基因都整合到棉花基因组 DNA 中，未整合到叶绿体、线粒体上，也不以非整合形式存在。

2.2.5 插入序列的拷贝数

利用在插入序列内和插入序列外具有不同酶切位点的多个限制性内切酶消化保铃棉 531 及非转基因受体 Coker312 的基因组 DNA，所用的限制性内切酶如下：*AseI* 和 *BstZ17I*，这两个酶在质粒 PV-GHBK04 上没有酶切位点，只在基因组侧翼序列中存在酶切位点；*SspI*，这个酶酶切后的基因组 DNA 片段进行 Southern 杂交后可以看到 3 个拷贝的 7S 3'序列存在；*XmnI*，该酶的酶切位点存在于部分 *cry1Ac* 表达盒片段相邻的基因组侧翼序列中，可以用来指示该片段与全长 *cry1Ac* 表达盒的相对方向和空间位置；*BamHI*，*BamHI+NdeI*，和 *BamHI+PmeI*，用这 3 个酶组合消化的 DNA 进行 Southern 杂交能够表明含有部分 *cry1Ac* 表达盒的插入片段与完整表达盒的插入方向相反，且该片段的 T-DNA 右边界序列与含有完整表达盒的 T-DNA 的右边界序列紧密相连。分别利用相互重叠并覆盖整个插入片段和质粒骨架序列的探针 1、探针 2、探针 3、探针 4 和探针 5（图 11，转化质粒载体 PV-GHBK04 图谱）进行杂交，其中探针 1 覆盖插

入序列 7S3'区域，因此预期也可以与非功能性插入序列产生杂交信号，探针 5 覆盖插入片段以外的质粒骨架序列。Southern 杂交结果证实了功能性插入中遗传元件的组成及排列如图 10 所示，同时，由于探针 1 杂交结果显示存在 3 个拷贝 7S3'区域，也证实了非功能性插入片段的存在。此外，Southern 杂交结果也表明保铃棉 531 功能性插入序列和非功能性插入序列都是在单一插入位点单拷贝插入，除了图 10 中所示的遗传元件外，来自质粒载体 PV-GHBK04 的其他骨架序列没有插入到保铃棉 531 的基因组中（图 12 到图 16）。



Probe	Start Position	End Position	Total Length (bp)
Probe 1	1757	2278	522
Probe 2	2252	4677	2456
Probe 3	4651	6528	1878
Probe 4	6503	9788	3286
Probe 5	9761	1783	3430
Probe 6	996	2263	1268

图 11. PV-GHBK04质粒环状图谱

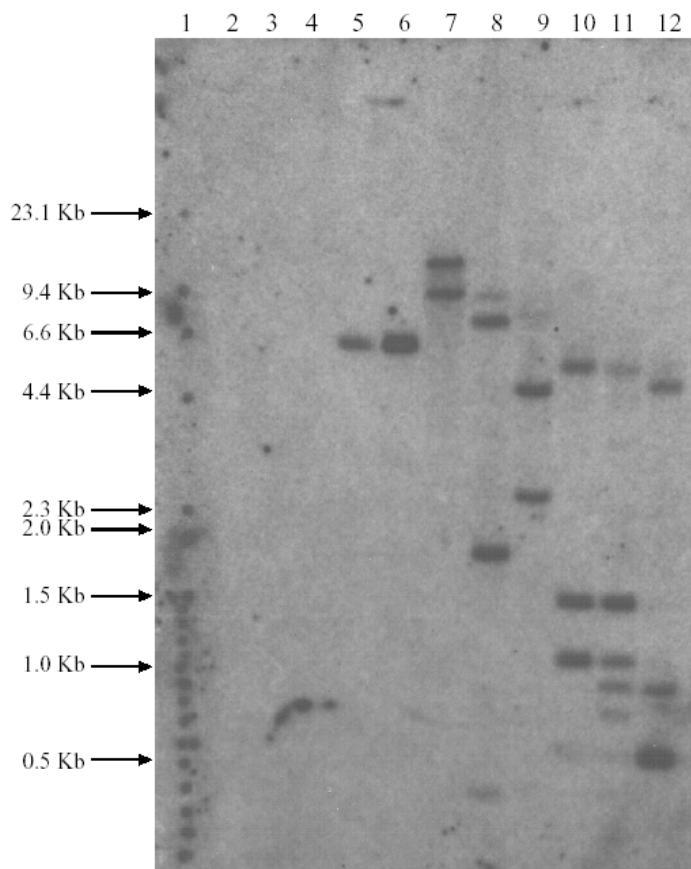


图 12. MON 531 Southern 杂交分析-探针1

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 1 (图 11) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: 空白

泳道 3: 空白

泳道 4: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 5: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 6: 与 34pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 7: *AseI+BstZ17I* 酶切的 MON 531 基因组 DNA

泳道 8: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA ()

泳道 12: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

→指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

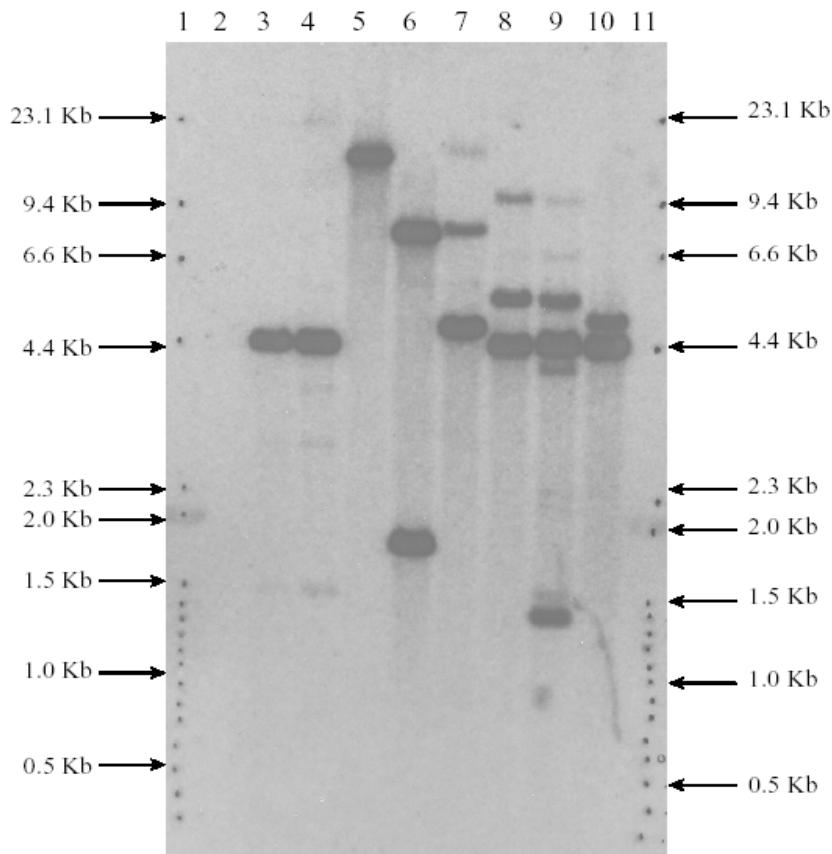


图 13. MON 531 Southern 杂交分析-探针2

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 2 (图 11) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

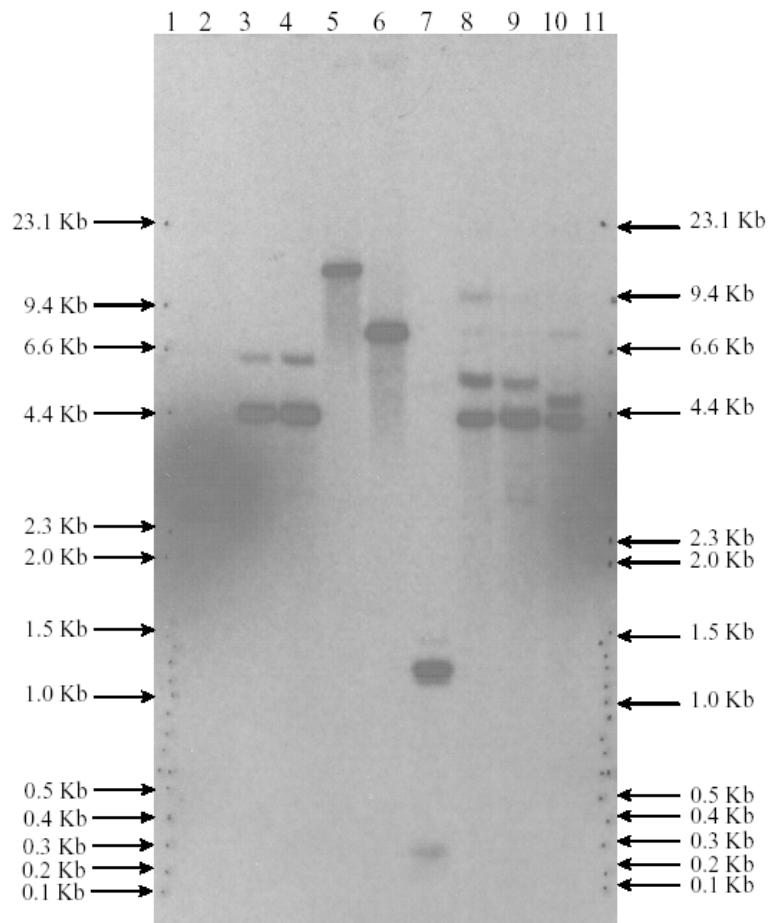


图 14. MON531 Southern 杂交分析-探针3

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 3 (图 11) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

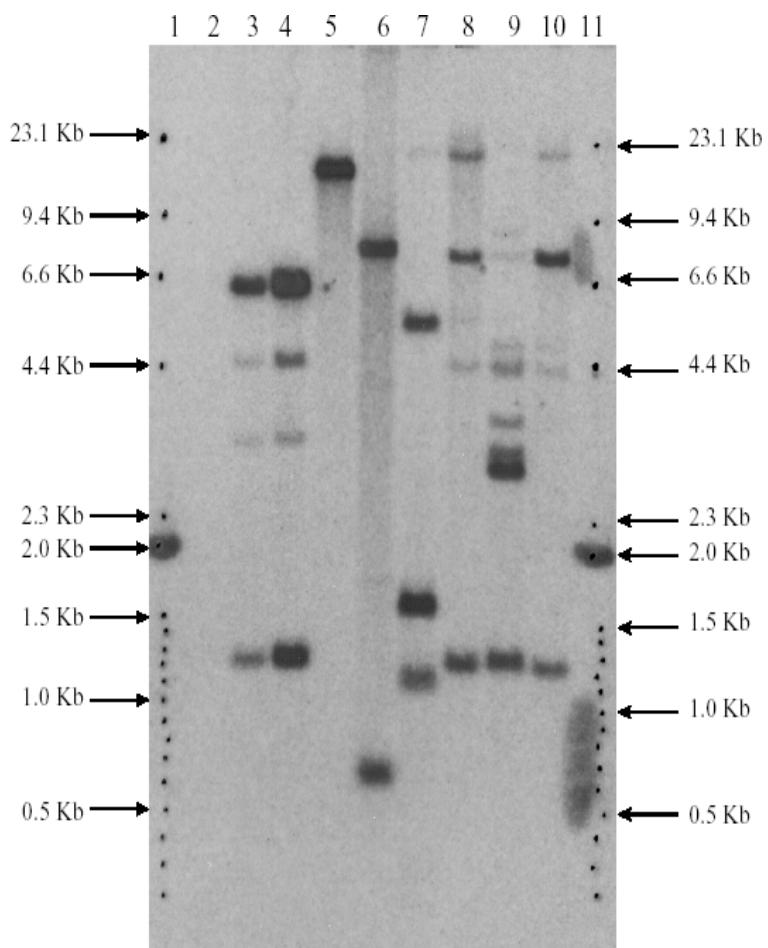


图 15. MON 531 Southern 杂交分析—探针4

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 4 (图 11) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

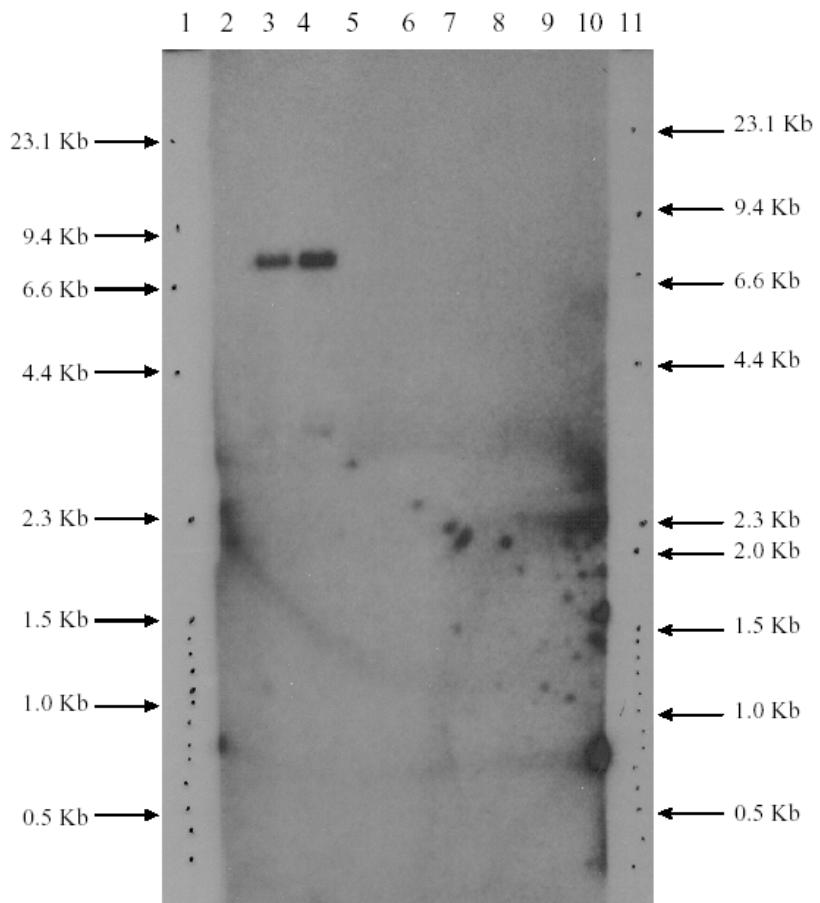


图 16. Bollgard 531的Southern 印迹杂交分析：骨架序列分析（探针5）

泳道 1: Maker

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: Maker

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

2.3 目的基因与载体构建的图谱, 载体的名称、来源、结构、特性和安全性, 包括载体是否有致病性以及是否可能演变为有致病性。

质粒载体 PV-GHBK04 是 11.4kb 的单边界二元转化载体。它含有质粒在细菌中选择和复制所需的遗传元件, 以及启动与插入植物基因组有关的 DNA 区域 (T-DNA) 的右边缘。DNA 克隆和载体构建的宿主菌都是大肠杆菌 MM-294, 即普通实验室常用的大肠杆菌 K-12 菌株衍生物。PV-GHBK04 的遗传元件详见表 2。来自 RK2 质粒的 0.70kb *oriV* 片段 (Stalker 等, 1981) 提供了在土壤农杆菌中得以保持的复制点, 并与 pBR322 中 3.4kb 的 *Sall* 至 *PvuI* 的片段融合, 该段含有在大肠杆菌中保持的复制起点(*ori322*)及向农杆菌接合转移的 *bom* 位点(Boliver 等, 1977; Sutcliffe, 1978)。这一段与来自 pTiT37 质粒的 3.36kb DNA 片段融合, 该片段含有胭脂碱型 T-DNA 的右缘 (Depicker 等, 1982; Bevan 等, 1983)。质粒 DNA 的剩余部分包括: *cryIAc* 和 *nptII* 基因表达盒以及一个在细菌启动子控制下选择标记基因 (*aad*)。*cryIAc* 表达盒包括增强型的 35S 启动子 (*e35S*, Kay 等, 1987; Odell 等, 1985), *cryIAc* 编码序列, 以及提供 mRNA 多腺苷化信号的来自于 β -大豆球蛋白基因 α 亚基非翻译区的 7S 3' 序列。该表达盒与含有 *aad* 基因(从转座子 Tn7 分离而得)的 0.93kb 的片段相连, *aad* 基因编码壮观霉素或链霉素抗性蛋白(Fling 等, 1985)。*aad* 基因下游是产生卡那霉素抗性的 *nptII* 表达盒, 该表达盒由花椰菜花叶病毒 35S 启动子、新霉素磷酸转移酶 II 型基因 (*nptII*) 和来源于胭脂碱合成酶基因 3' 非翻译区的 NOS3' 序列 (Rogers 等, 1985)。

2.4 载体中插入区域各片段的资料

2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及供体生物的名称

如前所述, 保铃棉 531 中 *cryIAc* 表达盒包括增强型的 35S 启动子 (*e35S*, Kay 等, 1987; Odell 等, 1985), *cryIAc* 编码序列, 以及提供 mRNA 多腺苷化信号的来自于 β -大豆球蛋白基因 α 亚基非翻译区的 7S 3' 序列。产生卡那霉素抗性的 *nptII* 表达盒, 该表达盒由花椰菜花叶病毒 35S 启动子、新霉素磷酸转移酶 II 型基因 (*nptII*) 和来源于胭脂碱合成酶基因 3' 非翻译区的 NOS3' 序列 (Rogers 等, 1985)。两个功能性表达盒中启动子和终止子的大小、功能和供体生物详见表 2。

表 2. PV-GHBK04质粒主要遗传元件一览表

遗传元件	大小 (kb)	功 能 (参考文献)
右边界(RB)	0.09	来自 pTiT37 质粒的片段，含有 24 bp 的胭脂碱 T-DNA 右边界，用于启动 T-DNA 从土壤农杆菌中转移(RB)到植物染色体组中(Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
P-e35S	0.62	花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子(Odell <i>et al.</i> , 1985)，带有重复增强子区域(Kay <i>et al.</i> , 1987)。
cry1Ac	3.50	合成的苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白变异蛋白编码序列 (Donovan <i>et al.</i> , 1992)。
7S 3'	0.43	来自于大豆 7S 种子储存蛋白基因(Schuler <i>et al.</i> , 1982)的 3'非翻译区，用于指导 cry1Ac 基因 mRNA 的多聚腺苷酸化。
aad	0.79	细菌启动子和来自于转座子 Tn7 的 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶基因编码序列(Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)。
P-35S	0.32	花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子区(Gardner <i>et al.</i> , 1981; Sanders <i>et al.</i> , 1987)。
nptII	0.79	从 Tn5 分离出来的新霉素磷酸转移酶 II 基因编码序列(Beck <i>et al.</i> , 1982)。表达该基因可以使植物具有卡那霉素抗性，作为选择标记用于筛选转化体(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
NOS 3'	0.26	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区，其功能是终止转录，控制 nptII mRNA 的多腺苷化 (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
oriV	0.62	来自于广谱寄主质粒 RK2，为质粒在农杆菌中的复制起点(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
ori322/rop	1.8	来自于质粒 pBR322，为质粒在大肠杆菌中保持拷贝数所需的复制起始点，并为质粒结合转移到土壤农杆菌细胞提供引物(rop)区和 bom 位点(Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978)。

2.4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称

nptII 编码序列编码一个选择性标记酶，新霉素磷酸转移酶II(NPTII)，该酶被用来鉴定含有Cry1Ac蛋白的转化体。NPTII利用三磷酸腺苷(ATP)使新霉素和相关的卡那霉素磷酸化，从而消除这类氨基糖苷抗生素的活性，从而使转化体具有卡那霉素抗性。*nptII*基因的编码序列来源于原核生物的转座子Tn5 (Beck 等, 1982)，其在保铃棉中的大小约为0.79kb。

保铃棉 531 中转入的另一个选择性标记基因为 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶基因(*aad*)，来自于转座子 Tn7，该基因编码 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶(AAD)，

用于壮观霉素或链霉素培养基上的细菌选择(Fling 等,1985), 能在含有壮观霉素或链霉素的培养基上选择带有 PV-GHBK04 质粒的细菌。*aad* 基因由于受它本身的细菌性启动子控制, 其蛋白在保铃棉 531 转化体中不表达。

2.4.3 其它表达调控序列的名称及其来源(如人工合成或供体生物名称)

除去 2.4.1 和 2.4.2 部分所描述的调调控序列以外, 保铃棉 531 中不含有其他的调控序列。

2.5 转基因方法

保铃棉 531 含有来自苏云金杆菌库斯塔基亚种的 *cryIAc* 基因, 来自原核生物转座子 Tn5 的 *npt II* 基因, 以及来自转座子 Tn7 并受细菌启动子控制的 *aad* 基因。这些基因利用植物表达载体 PV-GHBK04 通过土壤农杆菌介导已稳定地转移到棉花细胞的基因组内 (Perlak 等, 1991)。

保铃棉 531 是通过一个二元质粒载体采用土壤农杆菌介导得方法, 将 *cryIAc* 基因编码序列转移到常规棉花品种 Coker 312 的基因组中所得到的棉花转化事件。一般说来, 利用土壤农杆菌作为载体时, 只有 T-DNA 转移到植物的基因组并与之结合 (Zambryski, 1992)。普遍认为 T-DNA 这种转移过程是不可逆的 (Huttner 等, 1992)。T-DNA 插入植物基因组的过程中, 边界序列本身并不全部转移 (Bakkeren 等, 1989)。也就是说, 并插入的 DNA 不再是功能性的 T-DNA; 一旦结合, 即使再受 *vir* 基因作用, 也不能重新调动起来插入另一植物的基因组。

转化载体含有质粒在细菌中进行选择和复制以及 T-DNA 向植物细胞转移所需的功能清楚的DNA片段。参照 Ditta 等人方法, 构建植物表达载体 PV-GHBK04, 转化到大肠杆菌, 然后通过三亲融合方式依靠穿梭质粒 Prk2013, 转化到 ABI 农杆菌中 (Ditta 等, 1980)。ABI 菌株含有去毒的 (即缺少 T-DNA 植物激素基因的) pTiC58 质粒 pMP 9 ORK (Koncz 和 Schell, 1996)。去毒的 pMP9 ORK Ti 质粒不带 T-DNA 植物激素基因, 对植物不再构成威胁 (Huttner 等, 1992)。pMP9 ORK Ti 质粒经过遗传工程处理, 提供了质粒与 ABI 菌株结合后自行复制所需的 *trfA* 基因功能。当植物组织经过 ABI::质粒载体整合物接种时, T-DNA 通过去毒的 pMP 9 ODK Ti 质粒编码的 *vir* 功能转移到植物细胞里 (Klee 等, 1983; Stachel 和 Nester, 1986)。Ti 质体并不转移到植物细胞, 而留在农杆菌中。

含有 *cryIAc*、*npt II* 和 *aad* 基因的 T—DNA 转移到单个的棉花细胞的基因组中, 然后经卡那霉素筛选。数日后, 残留的农杆菌细胞被另一种抗生素杀灭。Umbeck 等(1987 年)报导了改良的植株再生技术。其后, 棉株组织经过处理以刺激转基因细胞再生成芽, 进而形成完整的幼苗, 最后在土壤中培育, 鉴定抗虫能力。

2.6 插入序列表达的资料

2.6.1 插入序列表达的器官和组织, 如根、茎、叶、花、果、种子等

插入保铃棉531基因组的DNA会出现在保铃棉531转化体的所有细胞中。加强型花椰菜花叶病毒(CaMV) *e35s*启动子驱动*cryIAc*基因在保铃棉中等表达, 而花椰菜花叶病毒(CaMV) *35s*启动子则驱动*npt II*基因的表达。*35s*启动子在多种不同

双子叶植物中的组织特异性已有许多深入的研究(Odell 等,1985; Jefferson 等, 1987; Williamson 等, 1987; Holtorf 等, 1995;Mitsuhara 等, 1996;) , 并基本达成以下共识: *35s*启动子在很多植物器官(包括根、花瓣、叶、茎及维管束、子叶、花器、未成熟及成熟种子)中, 在植株的整个生育期内均可起作用。但是, *35s*在某些特定组织的特定细胞类型中表达很少或不表达。*35s*启动子的表达通常会贯穿植物的整个生育期, 但在成熟组织中这种表达会出现停滞或下降的现象。这种表达(变化)现象究竟是由于启动子活力下降, 还是由于报告基因的蛋白质降解所致, 目前还不清楚。*35s*启动子在两类不同的双子叶植物种类中如烟草和拟南芥中的表达模式相似, 而棉花中的表达方式可能与其在其它双子叶植物中的表达方式相似。

1992年在美国田间试验的6个试验点收集的保铃棉531和非转基因对照的叶片和种子中Cry1Ac和NPT II蛋白的表达情况进行了ELISA分析, 结果显示, Cry1Ac和NPT II蛋白在种子和叶片组织中均有表达。详细结果见2.6.2部分。

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法

用经过验证的ELISA方法对收集于1992年美国田间试验的保铃棉531和非转基因对照的叶片和种子中的Cry1Ac、NPT II和ADD蛋白进行定量检测。详细方法描述如下:

棉花叶片组织蛋白的提取: 分析过程中, 根据SOP # BtC-PRO-019-02每个叶片样本(包括4片叶片)混合起来、取样, 在一个离心管里提取。从田间送达的冷冻叶片在样品袋中干冰上研磨称粗粉状。冷冻组织称重, 按照大约1 mg叶片组织/40 μL (1: 40) 的比例加入预冷的Tris-硼酸盐(T-B)提取缓冲液。T-B提取缓冲液为100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM硼酸钠, 0.05% (v/v) Tween-20, 5 mM MgCl₂, 0.2% (w/v) L-抗坏血酸。组织用配有PTA 10TS发电机的Polytron PT3000匀浆器(Brinkman, Inc., Westbwy, NY) 大约22,000 rpm下提取1分钟, 然后立即置于冰上。在10,000 ×g, 4°C下离心大约10分钟, 去除不溶解组织。取出上清液, 分装, 作为进一步分析的“棉花叶片提取物”。分装的叶片提取物在分析之前保存在-80°C下。

棉花种子组织蛋白的提取: 根据SOP # BtC-PRO-019-02, 每个脱绒种子样本取5粒种子称重, 在一个离心管中提取。每粒种子分别压碎, 置于一个塑料管中, 按照大约1 mg叶片组织/20 μL (1: 20) 的比例加入预冷的Tris-硼酸盐(T-B)提取缓冲液(如上所述)。种子用配有PTA 10TS发电机的Polytron PT3000匀浆器(Brinkman, Inc., Westbwy, NY), 脉冲处理15秒, 脉冲处理之间使组织冷却下沉。提取之后, 组织匀浆立即置于冰上。组织匀浆在10,000 ×g, 4°C下离心大约10分钟, 使之澄清。取出上清液作为进一步分析的“棉花种子提取物”。分装的种子提取物在分析之前保存在-80°C下。

棉花组织提取物总蛋白的分析: 按照Bradford (1976) 的方法采用Bio-Rad蛋白分析的微孔板(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 测定总蛋白。经过检验, 所用的方法(SOP #PRO-90-015-00) 表现的变异范围可以接受, 适合于分析棉花组织中的总蛋白。通过对蛋白分析结果与相同提取物的氨基酸成分进行比较,

选取小牛血清蛋白（BSA）（Sigma Chemical, St. Louis, MO）溶于T-B提取缓冲液（如上所述），作为适当的标准（Rogan, et al., 1992）。

B.t.k. HD-73 (Cry1Ac) 蛋白的定量分析方法：采用酶联免疫法（ELISA）（SOP# BtC-PRO-017-02）测定叶片和种子组织提取物中*B.t.k.* HD-73蛋白的含量。所用的方法为双抗体夹心法，间接检测棉花组织提取物中的*B.t.k.* HD-73蛋白。*B.t.k.* HD-73苏丹百被单克隆抗体（M19N4A6，批次7/18/91）捕获，再由一个兔多克隆抗体（F212，批次8113/91SB）形成夹心。连接的兔抗体由结合碱性磷酸酶（AP）（Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA）的驴-抗-兔抗体来检测。通过将植物产生的蛋白转换成抗胰蛋白酶核心（HD-73T），并与HD-73T蛋白（货号SMAC）的纯化参照标准制成的校正曲线进行比较，对棉花组织提取物中*B.t.k.* HD-73蛋白进行定量分析。

利用ELISA测定了植物组织提取物中的HD-73T蛋白的含量（ng/ml），分子量为130 kD的*B.t.k.* HD-73蛋白是由抗虫棉植株产生的。由于典型核心蛋白（约66 kD）的分子量大约是在植物中表达的*B.t.k.* HD-73蛋白的一半（Bietlot, et al., 1989; Hofte and Whitely, 1989；第2卷），所以ELISA分析得到的ng/ml值需乘以一个校正系数2。这样将测定的HD-73T含量转换成组织提取物中的全长*B.t.k.* HD-73蛋白（以重量/体积为基础）。

在用于本实验之前，首先确定HD-73 ELISA法的准确性和精确度。根据方法的偏差（提取效率和蛋白的回收率），ELISA法分别能够测出抗虫棉品系531种子和叶片组织中*B.t.k.* HD-73实际含量的大约45%和78%。棉籽和幼叶测定数值的变异系数百分数（%CV）分别为43%和28%。

NPTII蛋白的定量分析方法：采用酶联免疫法（ELISA）（SOP # PST-92-PRO-014, Rogan, et al., 1992）测定棉花叶片和种子组织提取物中NPTII蛋白的含量。该方法是一种检测棉花组织提取物中NPTII蛋白的直接双抗体夹心法。在固定于微孔板蛋白A-纯化兔多克隆抗体（批次3/11/93）中加入与NPTII和辣根过氧化物酶标记的抗体（制备方法与多克隆兔抗体一样），形成夹心。NPTII蛋白的含量与结合的过氧化物酶标记的抗体含量成正比。纯化的重组NPTII蛋白（批次4821020）用于生成校正曲线：由标准曲线获得的浓度和吸收值适合于一个由4个参数构成的逻辑曲线，这个曲线被用于计算棉花组织提取物中的NPTII含量。在用于本实验之前，首先确定该方法的准确性和精确度。根据方法的偏差，ELISA法分别能够测出抗虫棉品系531种子和叶片组织中NPTII实际含量的大约84%和86%。棉籽和幼叶组织测定数值的变异系数百分数（%CV）分别约为22%。

AAD蛋白的定量分析方法：采用ELISA法（SOP # PST-92-PRO-020）取得的数据证明棉花叶片和种子组织提取物中没有可检测到的AAD蛋白。ELISA法是一种两步双抗体夹心法。蛋白A-纯化多克隆兔抗体（F379，批次3/7/91）被吸收到微孔板壁上，然后加入含AAD标准品（目的是控制微孔板效应）的转基因棉花组织提取物或对照组织提取物。用AP结合多克隆抗体（F379-AP，批次1/25/93，与兔抗体同批次生产）检测结合的AAD蛋白。采用纯化参照标准（批次4454557，5/10/90）的校正曲线，利用log-log转换的数据（吸收值对AAD含量）计算棉花组织样本中的AAD蛋白含量。ELISA方法是对AAD蛋白特异的，并且在本研究开

始前经过精确度、准确性和微孔板效应验证。ELISA法平均分别能够检测到加入种子和叶片组织提取物中64%和73%的AAD蛋白。棉籽和幼叶组织AAD蛋白测定值的变异系数百分数（%CV）分别约为21%和19%。

数据处理和统计分析：收集ELISA数据后，采用经过验证的计算系统和软件计算*B.t.k.* HD-73、NPTII和AAD蛋白的含量。用BioRad分光光度计(型号3550)读取ELISA吸收读数和总蛋白测定值，并利用孟山都开发的软件(ELISAread程序)直接收录到一个Microsoft® Excel(版本3.0)文件中。利用一个经过验证的Microsoft® Excel(版本3.0)宏程序和专门为每种方法设计的模板将每个微孔板的原始数据转换成含量值。

利用提取组织：体积比将棉花组织提取物中*B.t.k.* HD-73、NPTII和AAD蛋白的含量(ELISA方法测定)由ng蛋白/mL转换成μg蛋白/g冷冻组织鲜重(fwt)。这些计算是利用经过验证的Microsoft® Excel(版本4.0)工作表进行的。

利用SAS程序以μg蛋白/g(fwt)表达水平进行统计分析。利用SAS MEANS程序计算对每一试验地点叶片和种子表达量进行简单汇总统计计算，同时计算总平均数及其标准误。利用SAS和SAS V AROCOMP程序计算方差成分。

分析结果：

1992年采自美国试验田的棉花种子中Cry1Ac蛋白水平平均为每克鲜重0.857微克，NPTII蛋白水平则为每克鲜重2.45微克，AAD蛋白未检出。由于基因由一个细菌性启动子所驱动，不应该在棉花植株中表达，因此这一结果正是所期望的。由于未检出，未对ADD蛋白进行报道。正如所期望的那样，在对非转基因棉花亲本Coker 312的叶片和种子所做的检测中均未测出Cry1Ac和NPTII蛋白。分析结果如表 3

表 3. 1992年美国田间试验收集的材料中Cry1Ac和NPT II蛋白的ELISA检测结果

年份/组织		对照	保铃棉 531	对照	保铃棉 531
1992 年 (6 点)		Cry1Ac (μg/g 组织鲜重)		NPT II (μg/g 组织鲜重)	
种子	均值	ND	0.857	ND	2.451
	范围	NA	0.40-1.32	NA	1.97-2.93
	标准误	NA	0.180	NA	0.185
叶片	均值	ND	1.562	ND	3.145
	范围	NA	1.18-1.94	NA	2.46-3.84
	标准误	NA	0.148	NA	0.269

ND:未检出； NA:不适用

2.6.3 插入序列表达的稳定性

作为品种表现和质量保证计划的一部分，保铃棉 531转化体中功能插入物的稳定性已通过以下几种方式进行评价：*cry1Ac*基因及其产物Cry1Ac蛋白所赋予的抗虫表现型的稳定性、插入物在代代相传时和不同遗传背景下的物理稳定性。自从1991年以来，已经在不同的条件和遗传背景下，对531转化体中功能插入物的遗传稳定性通过其对鳞翅目昆虫的抗性以及田间农艺表现得到了评价。这些研究的结果总结如下：

- 对许多代保铃棉所进行的Southern杂交分析表明功能性*cry1Ac*基因插入物是稳定的；
- 对来自多个试验点的种子所做的ELISA分析表明：它们的Cry1Ac和NPTII蛋白的水平是相似的；
- 在不同环境条件下、对众多保铃棉品种所做的免疫测验和/或效果试验数据都确认了Cry1Ac蛋白的产生；
- 通过半授粉或与其它棉花品种进行回交后，观察到保铃棉抗虫特性的遗传符合孟德尔遗传规律；
- 在本产品的研发过程中，以及自1996年上市以来，在美国累计1700万英亩的大田中，保铃棉一直保持着抗虫特性。
- 将*cry1Ac*基因转入不同遗传背景的棉花品种中后，保铃棉的种子质量未受影响。

这些数据证实保铃棉的转基因性状已稳定地整合到了棉花的染色体组中。

2.7 据上述评价，参照本办法第十二条有关标准划分基因操作的安全类型

综上所述，保铃棉 531 转化所采用的基因操作没有改变受体生物的安全性。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十二条的相关标准，用于保铃棉 531 转化的基因操作方法属于类型 2。

3 转基因植物安全性评价

3.1 转基因植物的遗传稳定性

以上 2.2.5 部分已经表明保铃棉中的功能性目的基因为单拷贝插入，整合进受体基因组后将表现出孟德尔遗传规律。

对保铃棉育种世代中的 R5 和 R6 代，以及两个 531 商业化品种利用 Southern 杂交分析，以确定插入序列的世代稳定性。结果表明：R5、56 和两个商业品种都产生了 4.6kb 大小的杂交信号（图 17，泳道 6, 7 和 8, 9），该片段为探针 6 与功能性插入序列的杂交结果。此外 R5 和 R6 还产生了 2.5kb 大小的杂交信号，而两个商业品种则没有产生这个 2.5kb 的杂交信号，该杂交信号为探针 6(图 11) 与含有部分 7S3' 终止子序列的 242bp 非功能性插入杂交产生的。两个商业品种是通过常规育种途径选育的保铃棉 531 衍生品种，在育种过程中 242bp 插入序列与功能性插入序列分离，因此没有检测到上述 2.5kb 的杂交信号。如预期，非转基因对照 Coker 312 没有产生任何杂交信号（图 17，泳道 4）。上述结果表明功能性插入序列在试验的 R5、R6 代和商业化品种中稳定存在。

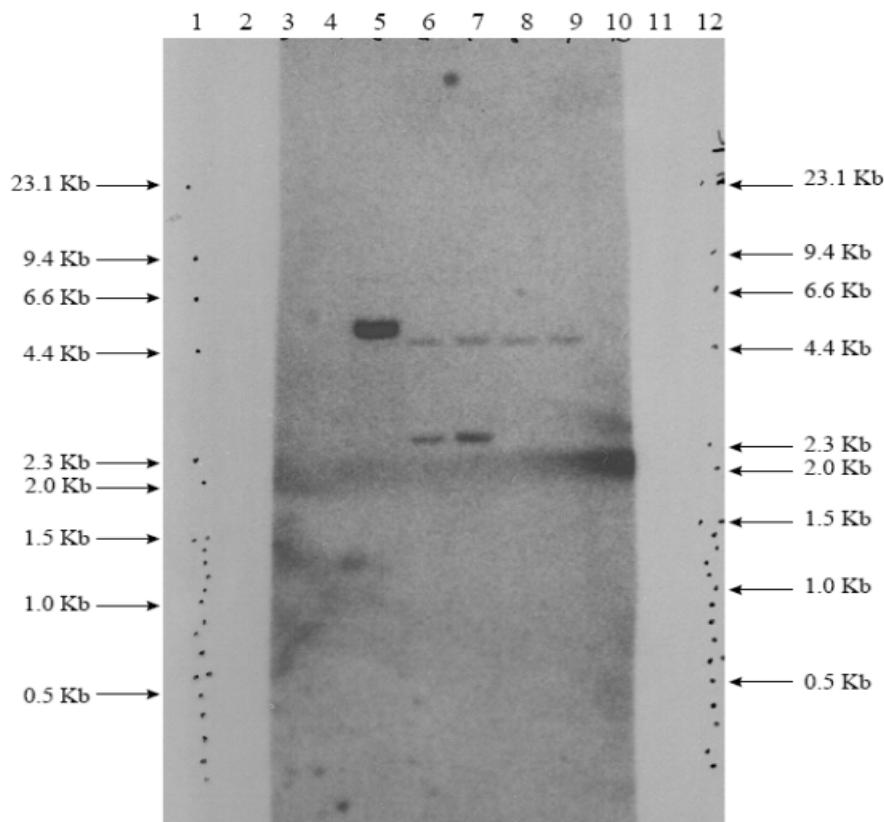


图 17. 保铃棉531四个世代遗传稳定性Southern 杂交分析

保铃棉 531 的 R5、R6 代和两个抗虫棉商业品种、非转基因对照 Coker 312、PV-GHBK04 质粒约 34pg DNA 用 *XmnI* 酶切，³²P-标记的探针 6（图 11）杂交。每泳道 10μg。泳道描述如下：

泳道 1：分子量标记

- 2: 空白
- 3: 空白
- 4: Coker 312
- 5: Coker 312 DNA 与 PV-GHBK04 质粒混合（约 34pg）
- 6: R5
- 7: R6
- 8: MON 531 商业品种 1
- 9: MON 531 商业品种 2
- 10: 空白
- 11: 空白
- 12: 分子量标记

→ 表示 DNA 分子量大小，单位 kb

3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异

3.2.1 生殖方式和生殖率

棉花主要是一种自授粉作物，但也可以通过某些昆虫进行交叉授粉。然而由于以下原因，保铃棉 531 中的 *cryIAc* 基因不太可能与其他 *Gossypium* 种属或其他锦葵属家族发生远交杂交（Percival 等，1999）：

- 栽培棉花是一种同源四倍体，与栽培或野生型的二倍体棉花种属之间存在杂交不亲和性；因此，它不能与其杂交并产生具有繁殖力的后代。
- 虽然可能与野生型同源四倍体 *Gossypium* 种属进行杂交，商品化棉花生产一般不会与野生型亲本具有相同的地理学分布。
- 目前没有非棉花植物与栽培棉花杂交成功的报道。

棉花原本是一种温暖季节生长的多年生植物，但随着栽培驯化，棉花实际上在世界范围内主要棉花产区已经变成一种一年生的栽培作物。有四种栽培化棉花种属：亚洲棉 (*Gossypium arboreum* L.)、非洲棉 (*G. herbaceum* L.)、海岛棉 (*G. barbadense* L.) 和陆地棉 (*G. hirsutum* L.)。其中陆地棉 (*G. hirsutum*) 占世界产量的 90% 左右，随后是海岛棉 (*G. barbadense*)，占大约 8%。棉花在世界范围内的热带纬度地区生长，但也能够在中国的北纬 45° 生长。

保铃棉 531 在具体生产活动中与常规非转基因棉花作物具有相同的栽培方式。没有报道表明和实验证据保铃棉 531 植株和常规非转基因棉花植株之间存在农艺性状和生物学特性的差异，除了对鳞翅目靶标害虫的抗性。在美国一些地区对保铃棉 531 农艺性状和生物学特性、杂草化倾向、生长发育特点、抗虫性和抗病性等进行了详细的调查和分析。结果表明保铃棉 531 和其受体对照之间没有显著性差异。二者在生殖方式、生殖率等方面没有显著性差异，均不会对环境造成不良影响。

3.2.2 传播方式和传播能力

在棉花中需考虑三种基因逃逸的可能途径：(1) 通过植物体；(2) 通过种子；(3) 通过花粉。一般情况下棉花的基因逃逸不通过植物体传播，即使有这种情况，其后代在自然条件下太可能在美国或在中国的大多数棉花产区的寒冷条件下存活越冬。基因通过种子进行逃逸也不太可能，因为棉花很少应用种子进行传播。还有一点需要说明，棉花生长期由于其体积和一般特性，不太可能通过任何常见的种子散布的机制如风、鸟或陆地动物进行散布。基因可能通过花粉进行传播，但也只有当花粉传播至具有适当染色体类型的 *Gossypium* 种属时才可能发生。

一般认为棉花没有杂草的特性，如种子休眠、土壤中持续存在、在多种环境条件下萌芽、快速生长、生活周期短或种子产出率高、易于散布等。保铃棉 531 棉花与对照棉花株之间在农艺学或形态学特性方面没有差异，因而不会为其在生长的生态系统中较其他的物种带来竞争优势。另外，任何 *Gossypium* 种属与保铃棉 531 棉花植株杂交后不太可能变得更加杂草化。棉花的所有野生型的亲本

都是热带生长的、木本的、多年生灌木，只有少量草本灌木(Percival *et al.*, 1999)。在大多数情况下，这些种属的分布决定于土壤和气候条件。作为多年生植物，它们没有规定特定程序，使得每年都产生种子。

3.2.3 休眠期

棉种不具有休眠特性，不能在土壤中长期存活。而且，棉种不能耐受越冬的寒冷条件。保铃棉的抗虫性状不会对棉种的休眠及越冬能力产生影响，而且在美国多年商业化种植和评价后，也未见任何相关报道。

在美国所做的越冬试验表明：保铃棉 531 转化体的种子与其亲本品种 Coker 312 的种子的表现相似。整个试验过程中没有棉苗出土。根据上述结果，保铃棉 531 转化体并未具有加强的越冬存活能力，因而并未增加其变为杂草的风险。

3.2.4 适应性

田间试验数据及包括对感病虫性在内的农艺性状进行的观察表明：保铃棉 531 转化体与非转基因棉花品种相比在农艺表现上没有区别。由于保铃棉缺乏杂草的特性，同时对非靶标生物无影响，因此，保铃棉在变为对其它植物和环境有害植物的风险性上，与常规棉花品种没有区别。

3.2.5 生存竞争能力

在上述的 3.2.2、3.2.3 部分节和下面的 3.2.6 部分指出，棉花不具备超强的生存和竞争能力，不具有转变为杂草的倾向和特性。保铃棉的广泛推广并未改变这一评价。田间亩成株数的报告和发芽数据都证实：保铃棉 531 转化体与其亲本品种 Coker 312 两个品种间在萌发率和存活力没有明显差异。

3.2.6 转基因植物的遗传物质向其他植物、动物和微生物发生转移的可能性

棉花异花授粉的评估

虽然可以发生自然杂交，但是棉花一般被认为是常异花授粉作物或者是一种自花授粉的作物 (Niles and Feaster, 1984)。根据花的结构，不存在阻止异花授粉的形态学障碍。然而，棉花花粉较为粘重，风力传播的范围有限。但棉花花粉可由昆虫传播，特别是通过各种野蜂、熊蜂 (*Bombus sp.*) 和蜜蜂 (*Apis mellifera*) 进行传播。

早期的报道表明，相近的棉株间实现异花授粉的可能性较高 (McGregor, 1976; Webber, 1903; Ricks and Brown, 1916; Simpson (1954); Simpson and Duncan, 1956)。但这些较早的研究中的作物生长条件与现在的棉花生长期有很大不同。最近的有关棉花花粉漂移的文献表明，异花授粉的次数随离花粉源的距离的增加而减少。McGregor (1976) 利用荧光颗粒跟踪花粉的运动并在棉花地周围放养大量蜂群，以保证花粉得到充分的传播机会。在这种试验条件下，在距离棉花地为 150 到 200 英尺的花里，只有 1.6% 的花上能检测到荧光颗粒。Llewellyn 和 Fitt (1996) 的研究中采用了各种田间试验设计，发现棉花的异花授粉的次数很少。在离花粉源只有一米的距离时，他们观察到异花授粉的频率为

0.15 至 0.4%，在距花粉源 16 米时下降到低于 0.3%。

Umbeck 等人 (1991) 采用可选择标记，检查了来自于一个 30×136 米的生物技术棉花花粉源的异花授粉情况。当离花粉源小区的距离从 1 米增至 7 米时，异花授粉的比率从 5% 下降到不足 1%。当采样距离最远为 25 米时，偶尔检测到较低的异花授粉率（低于 1%）。Berkey 等人 (2002) 报道说，被一条 13 英尺宽的道路分隔的二个田块，它们之间的异花授粉率从同花粉源最近的垄沟的 1.89% 下降至第 24 条垄沟的 0%。因此，在美国棉花原原种和商品种子的制种隔离距离分别为 1320 英尺和 660 英尺 (7CFR § 201.76)。

根据孟山都公司以前提交的申请书中的信息，USDA 在保铃棉 (Bollgard) 的环境评估文件中指出，“基因从基因工程棉花系渗入野生或其它栽培植物的机率非常低” (USDA, 1995)。更重要的是，花粉从保铃棉 531 向其它棉花物种或棉属相关物种的传播，我们认为其对环境的影响是可以忽略不计的，这是因为棉花花粉的移动范围有限，导入的蛋白质具有安全性，和导入野化棉或野生亲缘物种的抗农达特性缺乏选择优势。

基因向野生亲缘物种的转移

根据细胞学证据，棉属有了 7 个基因组类型，即 A 至 G，其中许多类型还有亚型 (Endrizzi *et al.*, 1984)。驯化的物种陆地棉 (*G. hirsutum*) 和海岛棉 (*G. barbadense*) 属于异源四倍体 (AADD, $2n=4x=52$)，而野生的瑟伯氏棉 (*G. thurberi*) 则是二倍体 (DD, $2n=2x=26$)，夏威夷棉 (*G. tomentosum*) 是异源四倍体 (AADD, $2n=4x=52$)。人们认为夏威夷棉能同驯化栽培棉种杂交，产生可育后代；然而在夏威夷，棉花并不是商用种植，所以基因向这些野生亲缘物种的转移的可能性是十分有限的。假若瑟伯氏棉和驯化栽培棉种之间有发生基因漂移的可能，这种基因漂移势必会形成三倍体 (ADD, $3x=39$) 不育植株，因为陆地棉和海岛棉都是异源四倍体 (AADD, $2n=4x=52$)，而瑟伯氏棉是二倍体 (DD, $2n=2x=26$)。在野生环境里，已观察到此类杂交种。尚无人报道在野生环境里发现可育异源六倍体 ($6x=78$)。

基因向其他有机体的水平转移

目前，还没有任何证据表明遗传物质可以从一个生物水平转移至另外一种生物。棉花也是如此。

3.2.7 转变成杂草的可能性

商业化的棉花品种不被认为是杂草或者是可以转变为杂草，因为它们也不能有效地侵袭现有的生态系统。在美国，不认为棉花具有杂草特性。棉花不具有通常与杂草相关的任何特性，如土壤持续性、侵袭并成为新环境或者复杂环境里的主导物种的能力、同本地植被竞争的能力等。人们认识到，在某些农业系统里，在后续的轮作作物里，可以有棉花自生苗。然而，采用耕作或者适当的除草剂，可以十分容易地控制自生苗。在美国加利福尼亚州的南部，现在还有棉属物种野生群体和陆地棉栽培品种的某些野生亚种群体。但是，其范围十分有限，其原因至少部分地是，因为在冬季结冰的地区，棉花不能是多年生植物，通过耕作和正

规的棉花除草剂可以容易地管理轮作作物里的自生苗。

至于保铃棉 531 或者同它杂交的任何棉属物种可能成为有危害性的杂草，这种可能性是极小的。对保铃棉 531 的农艺性状和环境互作评价也表明，保铃棉 531 不会比常规棉更可能成为杂草。

3.2.8 抗病虫转基因植物对靶标生物及非靶标生物的影响，包括对环境中有益和有害生物的影响

有关含有 Cry1Ac 晶体蛋白的苏芸金杆菌库斯塔基亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k)) 的微生物制剂的大量信息表明：这些蛋白对非靶标生物是无毒的(EPA, 1988; Betz 等, 2000)。文献已证实这一 Cry(晶体)蛋白对鳞翅目昆虫具极强的选择性，它只专一地与鳞翅目昆虫中肠上的受体结合，对益虫或非靶标生物无毒。

此外，也用与保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白实质等同的 Cry1Ac 对几种代表性非靶标害虫的影响进行了分析，评价了 Cry1Ac 蛋白对非靶标生物的潜在影响。所评价的非靶标昆虫种类包括传粉昆虫蜜蜂 (*Apis mellifera* L.)、棉田及其它作物田间的常见捕食性昆虫绿草蛉(*Chrysopa carnea*)、家蝇的寄生蜂 (*Nasonia vitripennis*)，以及常见于杂草与栽培作物茎叶上的捕食蚜虫和其它植物害虫的捕食性益虫瓢虫(*Hippodamia convergens*)。研究结果表明：Cry1Ac 蛋白对参试生物的生长和发育无任何不利影响。

一些文献报道也表明，用含有 Cry1Ac 蛋白的转基因棉花叶片的饲料饲喂跳虫(*Folsomia candida*)和一种粉螨(*Oppia nitens*)，未见有任何影响(Yu 等, 1997; Betz 等, 2000)。对出现在保铃棉田间的鸟类的潜在影响的评价也表明：分别用含有 10% 分别来自保铃棉和对照的棉子的粗饲料饲喂鹌鹑的幼雏(这一饲喂水平大约相当于每公斤体重的鸟消耗 400 粒种子)，饲喂保铃棉子饲料的鹌鹑与饲喂对照棉子饲料的鹌鹑在饲料消耗及体重增加上没有任何区别(Betz et al., 2000)。

田间试验数据及包括对感病虫性在内的农艺性状进行的观察表明：保铃棉 531 转化体与非转基因棉花品种相比在农艺表现上没有区别。由于保铃棉缺乏杂草的特性，同时对非靶标生物无影响，因此，保铃棉在变为对其它植物和环境有害植物的风险性上，与常规棉花品种没有区别。

3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用。

保铃棉中所产生的 Cry1Ac 蛋白在结构与活性上与自然界发现的以及商业销售的 B.t.k 微生物制剂中的 Cry1Ac 蛋白几乎完全一致。苏芸金杆菌及其制剂表现出了对靶标害虫的专一性，对非靶标生物(如包括人类在内的益虫、鸟类、鱼类和哺乳动物等生物)无害(EPA, 1988)。如 3.2.8 部分所述，除靶标害虫抗性外，保铃棉 531 不可能对包括非靶标害虫在内的生态环境产生任何不利影响。此外，由于抗虫保铃棉的应用，大大减少了杀虫剂的喷施，对生态环境具有积极作用。

3.3 转基因植物与受体或亲本植物在对人类健康影响方面的差异

保铃棉 531 能够表达 Cry1Ac 蛋白和 NPT II 蛋白，Cry1Ac 蛋白使转化体植株产生对靶标鳞翅目害虫的抗性，NPT II 是一种使新霉素和卡那霉素失活从而产

生对这两种抗生素抗性的一种酶，可作为选择标记，用于筛选最初的转化体植株。

Cry 蛋白通过与靶标害虫中肠中的特异性受体结合发挥毒性效应，而人类和哺乳动物中不含有 Cry 蛋白的特异性受体，所以 Cry 蛋白对人类和哺乳动物无毒性效应。Cry1Ac 蛋白及其供体生物具有长期的安全使用历史，此外，针对保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白的安全性评价数据也支持 Cry1Ac 蛋白对人类及哺乳动物不会产生毒性和致敏性的结论，详细的安全性评价数据见 3.1 和 3.2 部分。

作为选择性标记的 NPTII (新霉素磷酸转移酶 II) 广泛存在于大肠杆菌细胞内。作为选择标记，NPT II 曾被用于西红柿、棉花、油菜和玉米等作物的转基因操作中，并经过了美国食品与药品管理局 (FDA) 的安全评价。FDA 认定，NPT II 蛋白作为食品添加剂和在转基因作物中应用一般认为是安全的 (GRAS) (FDA, 1994; FDA, 1998)。美国环保署也免除了在未加工农业商品中作为选择标记的 NPT II 的抗性要求 (40 CFR Part 180.1134)。大量的研究表明，植物中产生的 NPT II 蛋白不会对食物的安全性产生任何的影响。

3.3.1 毒性

Cry1Ac蛋白

在保铃棉中产生的 Cry1Ac 蛋白，与苏云金杆菌亚种 *Kurstaki* (B.t.k.) 细菌品系产生的蛋白质有 >99.4% 的一致性。自以 Bt 为基础的微生物产品开始应用至今，包括 Cry1Ac 蛋白在内的 Cry 蛋白已经具有长期的安全使用历史 (EPA, 1998; IPCS, 2000)。苏云金杆菌的各种品系作为商业化微生物杀虫剂，已安全使用了 40 多年。在 B.t.k. 中天然出现的 Cry 蛋白，对鱼、鸟、哺乳动物和其他非靶标生物没有有害作用 (EPA, 1998; Betz 等, 2000)。美国环保署 (EPA) 和世界卫生组织 (WHO) 认为，在粮食作物上喷雾使用微生物制剂，可能会造成对 Cry 蛋白的膳食暴露，苏云金杆菌的孢子也可能在粗加工农产品上的残留，但接触 Cry 蛋白及苏云金杆菌对一般人群和婴幼儿不存在危险 (EPA, 1998)。

对 Cry1Ac 蛋白的生物信息学分析表明：与 PIR、核苷酸序列资料库 (欧洲) (EMBL)、蛋白质序列资料库 (Swissprot) 和核苷酸序列资料库 (GenBank) 中储存的已知毒蛋白相比较，除去以其它的 Cry 蛋白家族成员的相似性外，Cry1Ac 蛋白没有显示与已知毒蛋白存在有意义的氨基酸序列相似性。除去在人类和哺乳动物消化道内缺少 Cry1Ac 蛋白的受体外，离体蛋白消化性研究也表明 Cry1Ac 蛋白在模拟胃肠消化液中能迅速降解。研究表明，在接触模拟胃液约 30 秒内，Cry1Ac 蛋白即降解。在模拟肠液中，Cry1Ac 蛋白被消化成抗胰蛋白酶核心，并至少维持原样和生物活性达 21 个小时。这个结果是预料到的，因为已知 B.t 杀虫蛋白的杀虫活性区域对胰蛋白酶消化有抗性。在体内，Cry1Ac 蛋白在进入肠腔前，已暴露在胃液中。可以预期胃中的低 pH 值和胃蛋白酶，可以使蛋白迅速消化或使它对肠的消化更敏感。此外，小鼠急性毒性实验也表明，用最高 4200 mg/kg 体重的给药剂量饲喂小鼠，没有观察到任何与处理相关的不利效应。实验期间各组动物在体重、累积体重或食物消耗量方面没有统计学显著差异，也没有观察到异常临床症状。

NPT II 蛋白

如前所述，NPT II是最常用的抗生素标记，它可以使受体具有新霉素和卡那霉素抗性。NPT II蛋白广泛存在于大肠杆菌细胞内，因此人类的肠道中经常可以发现这种酶（Jefferson等，1986; Fuchs等，1993）。作为选择标记，NPT II曾被用于西红柿、棉花、油菜和玉米等作物的转基因操作中，并经过了美国食品与药品管理局（FDA）的安全评价。FDA认定，NPT II蛋白作为食品添加剂和在转基因作物中应用一般认为是安全的（GRAS）（FDA, 1994; FDA, 1998）。美国环保署也免除了在未加工农业商品中作为选择标记的NPT II的抗性要求（40 CFR Part 180.1134）。大量的研究表明，植物中产生的NPT II蛋白不会对食物的安全性产生任何的影响（Miki and McHugh, 2004）。Nap等（1992）对NPT II在植物中应用是否会对生态环境产生影响做了研究。研究认为，通过微生物和动物的粪便等进入土壤并在土壤中累积的自由卡那霉素的量受土壤成分吸收性的限制，，不会产生对卡那霉素抗性植物的直接选择压力。此外，NPT II发挥酶活（卡那霉素或新霉素的磷酸化作用）需要辅助因子ATP的参与。ATP在消化系统的低pH条件下不稳定，在胃中的内源浓度低于催化活性的要求。这些资料与对NPT II蛋白的其他安全性评价结果支持：摄入含NPT II蛋白的植物产品不会影响口服卡那霉素或新霉素抗生素的功效。卡那霉素或新霉素作为抗生素目前已经被更有效的氨基糖苷类抗生素所取代（例如armikacin和netilmycin），这些新型抗生素不是NPT II蛋白的底物。因此可以得出结论，在转基因作物中用NPT II蛋白作为选择标记是安全的（Flavell等，1992; Nap等，1992; Fuchs等，1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Huppertz and Fitzgerald, 2000; Miki and McHugh, 2004）。

生物信息学分析表明，NPT II蛋白与已知毒素无有意义的氨基酸序列相似性（Calgene, 1990和1993）。用纯化的NPT II进行体外模拟消化实验，Western印记分析表明，NPT II在模拟胃液中降解极为迅速。在孵育的第一个时间点（10秒钟），Western杂交就检测不到NPT II蛋白了。在模拟肠液中37°C孵育2-5分钟，NPT II也能很容易地被降解50%。酶活分析也表明，NPT II蛋白在在模拟胃液中孵育2分钟，在肠液中孵育15分钟，酶活就完全丧失了（Fuchs等，1993）。NPT II蛋白小鼠急性口服毒性研究中，用高达5000mg/kg体重的剂量饲喂小鼠，没有观察到任何与处理相关的不利效应。实验期间各组动物在体重、累积体重或食物消耗量方面没有统计学显著差异，也没有观察到异常临床症状。

中国境内用含保铃棉531棉籽的饲料进行的30天大鼠喂养实验结果：

中国疾病控制中心营养与食品安全所将保铃棉531棉籽混入饲料中，于2003年对保铃棉531进行了30天大鼠喂养试验，以确认其安全性。结果显示：

用含5%保铃棉531的饲料饲喂大鼠30天后，动物未出现拒食现象，生长活动正常，被毛浓密有光泽。保铃棉531组对雌雄大鼠的体重和食物利用率与亲本对照组合普通对照组无显著性差异。

血液学检测结果：雄性保铃棉531组白细胞分类中的淋巴细胞低于亲本对照组，中性细胞高于亲本组，有显著性差异（ $P<0.05$ ），但均在本实验室的历史检测范围内，其他雌雄保铃棉531组的白细胞计数及其分类中的其他细胞、红细胞计数、血小板计数、血红蛋白等血液学指标与亲本组和普通对照组比较无显著性差异（ $P>0.05$ ）。

血生化检测结果：雄性保铃棉531组的谷丙转氨酶低于普通对照组、胆固醇高于普通对照组、尿素氮和甘油三酯高于亲本棉籽组、血糖、总蛋白和白蛋白高于普通对照和亲本组、雄性亲本组的总蛋白和白蛋白高于普通对照组，雌性 in 本组的谷丙转氨酶和雄性保铃棉531组的肌酐低于普通对照组、雄性保铃棉531 组组合亲本组中的胆固醇、总蛋白和白蛋白均高于普通对照组、雌性保铃棉531组血糖普通对照组，上述指标均有显著性差异 ($P<0.05$)，但均在本实验室的历史检测范围内，认为无生物学意义。其他雌雄保铃棉531组中的的谷草转氨酶、碱性磷酸酶、雌性保铃棉531组谷丙转氨酶、雄性保铃棉531组肌酐、雌性保铃棉531组尿素氮、甘油三酯与亲本对照组合普通对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。

雌性肾、体比下降与亲本和普通对照组比较均有显著性差异 ($P<0.05$)，但在本实验室历史性对照范围内，认为无生物学意义。其他脏体比值与亲本和普通饲料组比较均无显著性差异。病理学检查未见保铃棉531对被检脏器产生有意义的病理变化。

故保铃棉531棉籽组与亲本棉籽组合普通对照组比较，未发现保铃棉531抗虫棉籽对动物体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理组织学观察有生物学意义的改变。

综上所述，保铃棉531中表达的Cry1Ac和NPT II蛋白不会对人类和哺乳动物健康造成不良影响。

3.3.2 过敏性

如3.1部分所述，Cry1Ac和NPT II蛋白具有长期的安全使用历史，其供体生物在自然界中广泛存在，被人类广泛接触。

Cry1Ac蛋白的供体生物Bt *subsp. kurstaki*是一个能产生孢子的、自然存在于土壤中的格兰士阳性细菌。自从1958年以来，Bt菌株一直在美国进行商业应用，以生产具有杀虫活性的微生物衍生产品 (EPA, 1988)。没有报告表明Bt菌株或由这些菌株产生的蛋白具有过敏性。*npt II*基因是从大肠杆菌K12菌株的Tn5转座子中得到的。大肠杆菌在环境中无处不在，在脊椎动物的消化道中都可以发现大肠杆菌 (Jefferson *et al.*, 1986)。FDA将大肠杆菌的安全评估归于大肠杆菌K12菌株的凝乳酶制剂的安全性评价的一部分 (Flamm, 1991)。作为FDA的安全性评价结果，供体生物体被确定为安全的，并获得了FDA的GRAS(一般认为是安全的)认证。大肠杆菌是实验室中研究最广泛的微生物，具有在实验室环境下长期安全使用的历史。大肠杆菌代表了人类所了解最深入的生物体，对它整个基因组的测序已经完成 (Blattner *et al.*, 1993)。大肠杆菌是人们进行基因克隆和表达最理想的安全载体，人们对其已经有很多商业性应用 (Bogosian and Kane, 1991)。与大肠杆菌的致病性菌株相比，K12菌株与它们没有相似性，是安全无毒的大肠杆菌株 (Mühldorfer and Hacker, 1994)。

造成特定蛋白质致敏的一个重要的重要因素是它在食物中的高浓度(Taylor 等, 1987; Taylor, 1982; Fuchs和Astwood, 1996)。但蛋白含量分析表明，Cry1Ac和NPT II蛋白质在保铃棉植株中以低水平存在。此外，棉籽油和棉纤维是人类主要接触的棉花产品，但棉籽油和棉纤维中几乎不含任何蛋白质 (Sims等, 1996)。

因此通过接触保铃棉531及其产品中的Cry1Ac和NPT II蛋白不太可能对人类产生致敏效应。此外，对Cry1Ac和NPT II蛋白的一系列安全性评价也证实这两种蛋白不可能为致敏原。主要的研究包括：通过生物信息学分析，将Cry1Ac蛋白和NPT II蛋白与已知致敏原序列进行比对，未发现这两个蛋白与已知致敏原存在有意义的序列相似性。Cry1Ac和NPT II蛋白在模拟胃肠液中能够被迅速消化，而主要的食物过敏原在胃蛋白酶消化和酸性条件下可稳定存在。因此，Cry1Ac和NPT II蛋白不可能对人类产生致敏性。此外，保铃棉531在美国多年的商业化种植，以及NPT II蛋白已被美国食品与药物管理局批准为番茄、棉花和油菜的食品加工添加剂（食品与药物管理局，1994），而且被美国环境保护局（EPA，1994）作为一个惰性成分免除了耐量要求的事实，均证明了Cry1Ac和NPT II的安全性。

3.3.3 抗营养因子

棉花中含有被认为是抗营养因子的棉酚和环丙烯类脂肪酸，抗营养因子可以在加工过程中被除去，只有高度精炼的产品才能被人类消费(Berberich 等, 1996)。

棉酚能使含有棉籽的食物和饲料产生毒性 (Berardi 和 Goldblatt, 1980)。棉酚中毒的症状包括肝脏病变以及肺和肾脏充血。反刍动物较非反刍动物更耐受棉酚。棉酚是一种萜烯醛，用于保护棉花植株免受害虫和动物的取食损伤。从乙酰基 CoA 到萜类物质的生物合成是通过甲瓦酸通路完成的。棉酚在棉花种子、叶片、茎秆和根的溶生腺中生成。检测棉酚一般检测两种形式：游离的和结合的。游离棉酚是活性形式，是粗棉籽中棉酚的主要存在形式。在粗棉籽加工成油和粕的过程中，绝大多数游离棉酚被转变成无活性的结合形式。棉酚在精炼棉籽油中一般不能检出(Berberich 等, 1996)。

棉花中的环丙烯类脂肪酸 (CPFA) 包括二氢莘婆酸、莘婆酸、锦葵酸。这些脂肪酸大约占棉籽油总重的 1-2% (Berberich 等, 1996)。锦葵酸和莘婆酸分别是 17 和 18 碳脂肪酸，并且在环丙烯环中存在双键。CPFA 主要用来抑制硬脂酸到油酸的去饱和作用，进而改变膜渗透性和增加脂类的熔点。也观察到 CPFA 使鸡蛋变色、减少产蛋量、导致大鼠发育迟缓，以及改变奶牛酪乳中的脂类含量(Phelps 等, 1965)。也有研究认为 CPFA 能够与脂蛋白上的自由硫氢基团发生反应，这种经过修饰的蛋白可能与 CPFA 的生物学效应相关。环丙烯脂肪酸与萜烯醛混合后能够加强萜烯醛的毒性，可能对植物的抗虫性有作用(Bell, 1986)。

有研究认为 CPFAs 来源于种子中的油酸(Wood, 1986)。环丙烯环是其活性基元，其对加工过程中的灭活非常敏感，所以商业化的棉籽油中此类脂肪酸的含量可以忽略不计。此外，加工棉籽粕中的残留油分已经从完整棉籽的 30% 降低到 0.5-3.5%，所以与粗棉籽相比，加工棉籽粕中 CPFA 的含量可以被降低 98%。

对收集于美国田间试验的保铃棉 531 及其亲本品系的棉籽，以及棉籽加工产品粗棉籽粕、烘焙棉籽粕和精炼棉籽油中的棉酚进行分析（表 4），结果以占样品总干重的百分比表示。结果表明，保铃棉 531 和亲本对照棉籽中棉酚含量无显著性差异，且均在不同田间条件下种植的棉花品种中报道的总棉酚含量的范围内（0.39-1.7%）(Berardi 和 Goldblatt, 1980; Abou-Donia, 1976)。粗棉籽粕中总棉酚含量与棉籽中相当，这是预料当中的，因为粗棉籽粕只是把棉籽进行简单去皮

和研磨的产物。粗棉籽粕中游离棉酚约占总棉酚的 2/3。在精炼棉籽油中，除对照品系 Coker312 中检出极低含量的总酚外，保铃棉 531 未检出总酚和游离酚。对棉籽中环丙烷脂肪酸（苹婆酸、锦葵酸和二氢苹婆酸）分析显示，保铃棉 531 与常规对照棉籽和精炼油中环丙烷脂肪酸的含量相当(表 5)。因此，在保铃棉 531 和亲本棉花中，抗营养因子的含量无显著性差异。

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所对保铃棉 531 及其亲本对照 Coker312 棉籽中的游离棉酚检测结果显示保铃棉 531 棉籽中棉酚含量为 6.3g/kg，在亲本对照棉籽中的含量为 5.83g/kg。

表 4. 保铃棉531与对照Coker312中的棉酚分析

材料	总棉酚 ^a		游离酚 ^f
	均值	范围	
棉籽 ^b			
Coker312	1.16	0.97-1.43	NA ^c
531	1.10	0.86-1.29	NA
粗制棉籽粕 ^d			
Coker312	1.06	NA	66.7%
531	1.05	NA	68.7%
烘焙棉籽粕 ^d			
Coker312	1.11	NA	0.011
531	0.87	NA	0.008
精炼油			
Coker312	0.09	≤0.01% (1 ppm) ^g	ND ^e
531	ND	≤0.01% (1 ppm)	ND

- a. 以占总样品干重的百分数记
- b. 棉籽样品的总酚为统计分析后得到的最小均方值，范围为所有样品值的最小和最大值。
- c. NA=不适用。一般不对棉籽中的自由酚进行检测。由于粗制棉籽粕和烘焙棉籽粕是由不同田间试验点收集样品混合后的混合样加工而成，所以范围值不适用。
- d. 粗制和烘焙棉籽粕是将不同实验点收集的棉籽样品混合后得到的混合样的加工品，所以其数值来自于一个值，不能进行统计分析。
- e. ND=未检出，棉籽油中总酚和自由酚的检测限分别为0.04%和0.002%。
- f. 精炼油中的游离酚以样品干重百分数表示。
- g. Cherry和Leffler(1984)。

表 5. 保铃棉531和亲本对照棉籽与棉籽油中环丙烷脂肪酸含量

检测物	均值 ^a (范围) ^b	
棉籽	Coker312	531
锦葵酸	0.37(0.22-0.45)	0.38(0.23-0.47)
莘婆酸	0.59(0.48-0.70)	0.62(0.54-0.69))
二氢莘婆酸	0.36(0.29-0.50)	0.49(0.24-0.84)
	均值 ^c (范围) ^d	
棉籽油	Coker312	531
锦葵酸	0.36(0.22-1.44)	0.46(0.22-1.44)
莘婆酸	0.48(0.08-0.56)	0.43(0.08-0.56)
二氢莘婆酸	0.22/NA ^e	0.16/NA

- a. 均值表示为占总脂的百分比，为最小均方值 (Coker312的5个样品和531的4个样品)。
- b. 范围为不同试验点样品值中的最大和最小值
- c. 表示为占总脂的百分比。来自于一个混合棉籽样品加工后得到的棉籽油。
- d. 范围来自于发表文献，Phelps等，1965.
- e. 无发表文献范围。

3.3.4 营养成分

1993 年，对收集于美国 4 个试验点的保铃棉 531，5 个试验点的亲本对照 Coker312 的棉籽及其加工产品进行了成分分析，以评价在棉籽和棉籽加工产品中主要营养成分和抗营养素的水平，抗营养因子的分析见 3.3.3 部分。其余分析的成分如下：

- 1) 常规成分：蛋白质、脂肪、灰分、水、碳水化合物、卡路里 (表 6)
- 2) 脂肪酸：包括总脂和单个脂肪酸的含量 (表 8)
- 3) 氨基酸：单个氨基酸的百分含量 (表 7)
- 4) 常见毒素：黄曲霉毒素

虽然少数分析组分，保铃棉 531 与常规对照存在显著性差异，但是由于存在显著差异的组分都落于或十分接近文献报道的范围值，不认为这些差异存在生物学意义。这些分析的结果表明，保铃棉 531 与亲本棉花品种和其它商品棉花品种在成分上是实质等同的 (Berberich 等，1996)。

保铃棉的精炼棉籽油中脂肪酸组成与商品棉籽油一致。在加工后，自由棉酚减少到检测不出的水平，生育酚的水平与商品棉籽油中的水平一致。

黄曲霉素是黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 产生的一类真菌毒素，这些毒素可能污染食品和饲料产品 (Jorgensen and Price, 1981)。棉籽是最容易被黄曲霉素污染的商品之一 (Bagley, 1979)。在红铃虫危害严重的棉花种植区域，由于红铃虫幼虫侵害棉铃，一般棉籽的黄曲霉素含量比较高 (McMeans 等，1976; Ashworth 等., 1971)。通常如果棉籽的黄曲霉素含量水平过高，就不能用作动物饲料。FDA 允许的最高水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (20 ppb) (Jorgensen 和 Price, 1981)。本研究中，抗虫棉和对照品系棉籽中都没有检测到

4种主要黄曲霉素（检测极限为1 ppb）。

综上所述，对保铃棉531的详细成分分析表明：在营养成分上，如蛋白、脂肪、纤维、灰分和氨基酸上，保铃棉531与亲本或商业栽培品种之间没有不同。因此，保铃棉籽的营养价值，与现在使用的其它棉花品种在本质上相当。

除去成分研究以外，通过用含有保铃棉和对照棉粗棉籽的饲料饲喂奶牛，表明了保铃棉种子的营养安全。奶牛研究的结果表明，保铃棉的棉种与对照棉种效果是一致的。在奶产量、牛奶成分和牛的身体条件分数上，没有显著性差别（Castillo等，2001）。这些研究的结果导出结论：新表达的蛋白质和含有这些蛋白质的棉籽，无安全性问题。

表 6. 保铃棉531和亲本对照棉籽中常规成分含量

组分 ^a	均值（范围） ^b		文献范围
	Coker312 ^c	531 ^d	
蛋白质 %	27.00 (23.3-28.4)	27.56 (22.8-31.0)	12-32 ^e
总脂 %	22.96 (19.6-25.1)	23.23(22.2-25.8)	16.1-26.7 ^f
灰分 %	4.63(4.3-5.0)	4.53(3.9-4.7)	4.1-4.9 ^g
碳水化合物 %	45.40(42.8-47.6)	44.68(42.0-46.7)	
卡路里/100g	496.32(479-508)	498.11(495-511)	
含水量 (%)	12.36(9.6-15.9)	13.43(11.2-14.7)	5.4-10.1 ^h

a. 蛋白、总脂、灰分、碳水化合物和含水量以占样品干重百分比表示。

b. 范围为不同试验点样品值得最高和最低值。

c. 以来自5个试验点样品的最小均方值表示。

d. 以来自4个试验点样品的最小均方值表示。

e. Turner等, 1976; Cherry等1978; Kohel等, 1985。

f. Cherry和Leffler,1984; Cherry等,1978。

g. Cherry等,1978; Belyea等,1989。

h. Cherry等,1978。

表 7. 保铃棉531与常规对照棉籽中氨基酸组成分析

氨基酸 ^a	均值		文献范围 ^b
	Coker312 ^c	531 ^d	
门冬氨酸	9.72	9.49	8.8-9.5
苏氨酸	3.40	3.42	2.8-3.2
丝氨酸	4.62	4.67	3.9-4.4
谷氨酸	19.56	18.21	20.5-22.4
脯氨酸	4.22	4.03	3.1-4.0
甘氨酸	4.32	4.18	3.8-4.5
丙氨酸	4.12	4.03	3.6-4.2
半胱氨酸	1.60	1.68	2.3-3.4
缬氨酸	4.50	4.09 ^e	4.3-4.7
蛋氨酸	1.48	1.94 ^e	1.3-1.8
异亮氨酸	3.26	3.02 ^e	3-3.4
亮氨酸	5.98	5.93	5.5-6.1
酪氨酸	2.92	3.08 ^e	2.8-3.3
苯丙氨酸	5.32	5.28	5-5.6
赖氨酸	4.50	4.73 ^e	3.9-4.1
组氨酸	2.72	2.94 ^e	2.6-2.8
精氨酸	11.20	11.68	10.9-12.3
色氨酸	1.04	1.00	1-1.4

a. 氨基酸以棉籽中 mg/kg 干重蛋白表示。

b. Lawhon, 1977。

c. 5 个样品的最小均方值。

d. 4 个样品的最小均方值。

e. 在 5% 水平上, 亲本与 531 存在显著性差异。

表 8. 保铃棉531与亲本对照棉籽中的脂肪酸组成分析

成分 ^a	Coker 312		531	
	均值 ^c	范围 ^b	均值	范围
总脂	33.5	30.9-35.5	33.5	30.8-35.9
豆蔻酸 (14:0)	0.94	0.67-1.07	0.88	0.75-0.98
15烷酸 (15:0)	0.40	0.32-0.60	0.62	0.32-0.90
棕榈酸 (16:0)	26.5	24.8-27.8	26.3	25.1-27.2
棕榈油酸(16:1)	0.64	0.48-0.71	0.61	0.54-0.64
17烷酸 (17:0)	0.16	0.13-0.20	0.18	0.14-0.27
硬脂酸 (18:0)	2.63	2.32-3.26	2.90	2.71-3.26
油酸 (18:1)	15.3	14.8-16.0	16.8	14.8-19.1
亚油酸 (18:2)	47.8	46.4-49.9	45.6	41.6-49.0
亚麻酸 (18:3)	0.20	0.13-0.29	0.14	0.13-0.18
二十烷酸 (20:0)	0.29	0.26-0.31	0.28	0.22-0.33
山嵛酸 (22:0)	0.15	0.12-0.17	0.14	0.13-0.15
锦葵酸 (C-17)	0.37	0.22-0.45	0.38	0.23-0.47
苹婆酸 (C-18)	0.59	0.48-0.70	0.62	0.54-0.69
二氢苹婆酸 (C-19)	0.36	0.29-0.50	0.49	0.24-0.84

a. 总脂以干重百分比表示，脂肪酸以占总脂的百分比表示。

b. 范围表示所有试验点数据中的最大值和最小值。

c. 最小均方值，Coker312 有 5 个样品，531 有 4 个样品。

表 9. 来自于保铃棉531和对照棉籽的棉籽油中脂肪酸与维生素的含量

成分	含量 ^a		文献范围
	Coker312	531	
豆蔻酸 (14:0)	0.98	0.77	0.5-2.5 ^b
棕榈酸 (16:0)	25.42	25.08	17-29 ^b
棕榈油酸(16:1)	0.64	0.58	0.5-1.5 ^b
17烷酸 (17:0)	0.19	0.10	Not available
硬脂酸 (18:0)	2.53	2.67	1.0-4.0 ^b
油酸 (18:1)	14.92	15.89	13-44 ^b
亚油酸 (18:2)	50.27	50.88	33-58 ^b
亚麻酸 (18:3)	0.16	0.17	0.1-2.1 ^b
二十烷酸 (20:0)	0.21	0.30	<0.5 ^b , 0.41 ^c
山嵛酸 (22:0)	0.12	0.13	<0.5 ^b
苹婆酸 (C-18)	0.48	0.43	0.08-0.56 ^d
锦葵酸 (C-17)	0.36	0.46	0.22-1.44 ^d
二氢苹婆酸 (C-19)	0.22	0.16	Not available
生育酚 (维生素 E)	638	568	136-660 ^e

- a. 精炼油由一份混合棉籽样品加工而成。脂肪酸以占总脂百分数表示，生育酚以占 mg/kg 精炼油表示。
- b. 脂类/油类食品法典委员会 (棉籽油, 1993)。
- c. Cherry, 1983。
- d. Phelps 等, 1965。
- e. Rossel, 1991; Dicks, 1965)

3.3.5 抗生素抗性

保铃棉 531 的插入序列中含有 *aad* 和 *npt II* 基因, 由于 *aad* 基因在细菌启动子的调控下, 所以在保铃棉 531 中不能被转录翻译, 不能产生任何蛋白。保铃棉 531 中含有完整的 *npt II* 基因表达盒, 能够产生 NPT II 蛋白, 从而使转化体植株具有卡那霉素抗性。

NPT II 常被用作转化体初步筛选过程中的抗生素抗性标记, *npt II* 基因不存在安全问题。在保铃棉 531 中表达的 NPT II 蛋白, 与在已被许多政府机关和科研机构证明是安全的转基因作物所表达的 NPT II 蛋白是一样的。*npt II* 基因及其表达的蛋白的安全性已经被美国 FDA 确认, 并准许其在转基因作物的开发期间作为食品加工助剂添加剂使用 (FDA, 1994)。对 NPT II 蛋白的安全性也在许多研究文献上有过叙述 (Fuchs 等, 1993; Flavell 等, 1992; Nap 等, 1992)。美国环保署 (EPA) 也决定免除对农产品或原材料中 NPT II 蛋白及其表达所必须的遗传物质的抗性评价要求 (40 CFR 第 180.1134)。此外, 对 NPT II 蛋白的详细安全性评价也表明: NPT II 蛋白来源于广泛存在于自然界中的大肠杆菌 K12 菌株, 该蛋白具有长期的安全应用历史, 与已知的致敏原和毒蛋白间不存在序列相似性。用高达 5000mg/kg 体重的 NPT II 蛋白饲喂小鼠也不会出现任何毒性效应。所以

NPT II 蛋白是安全的，不会对人类健康造成不良影响。

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响

基于如前所述的安全性评价和组成成分分析资料，除引入的抗虫性状外，保铃棉 531 与商业化的常规棉花品种实质等同。因此，与常规棉花品种相比，保铃棉 531 不会对人体和食品安全性产生任何不良影响。相反，由于保铃棉的应用，导致杀虫剂的喷施量降低，对人类健康具有积极作用。

3.4 根据上述评价，参照本办法第十三条有关标准划分转基因植物的安全等级。

受体生物安全等级为 I 级，基因操作类型为 2 类，按照农业部转基因生物安全等级的确定，转 cry 1 Ac 基因棉花安全等级为 I 级。

4 转基因植物产品的安全性评价

4.1 生产、加工活动对转基因植物安全性的影响。

种植棉花主要是为了应用其纤维，棉籽是其副产品。棉籽可以加工成 4 种主要的产品：油、棉籽粉、棉籽壳、棉绒。棉籽加工后一般可以产生（以重量计算）：16% 的油、45% 的棉籽粉、9% 棉短线、26% 的棉籽壳，加工过程中消耗掉 4%（Cherry 和 Leffler, 1984）。

棉籽主要是用作牛的饲料，一小部分棉籽粉可以用作家禽、羊、鲶鱼和猪的饲料（棉籽及其产品，1998）。由于棉籽油基本不含有亚麻酸，这一点增加了其稳定性，并具有中性口味，因此适用于食物油炸。棉籽油也应用于食品工业，用作沙拉的调味品（棉籽油，1990）。由于棉籽中存在抗营养成分，棉籽和棉籽油加工都受到加工规范和条例的制约，以将对人类和动物健康存在不良营养的抗营养因子含量降低到可接收范围内。棉绒是棉籽表面的短纤维，棉绒中基本上完全为纤维素 (>99%) (NCPA, 2002; Nida 等, 1996)，在碱性 PH 环境和温度高于 100 °C 的条件下进行加工后 (AOCS, 2009)，棉绒可被用作高纤膳食产品。从保铃棉 531 获得的棉籽及其加工产品与 Coker312 亲本对照株获得的棉籽及其加工产品在成分和质量上是相当的。加工活动不会对安全性产生不良影响。

棉籽油和加工后的棉绒是用于人类食物的主要棉花产品（国家棉籽产品协会，1989）。对从 Coker312 和保铃棉 531 中得到的精炼棉籽油和棉绒进行了分析，发现在精炼油和棉绒中均未检测到蛋白 (Sims 等人, 1996)，这与之前研究表明的，在油内无可检测到的蛋白相一致 (Taffrie 和 Yaguchi, 1973)。因此，人类大量接触来自于保铃棉 531 的 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白是不可能的。这也进一步证实，生产加工活动不会对保铃棉 531 的安全性产生不良影响。

4.2 转基因植物产品的稳定性。

分子特性分析表明，保铃棉 531 中的功能性插入能够在不同世代中能够稳定遗传。自 1996 年商业化至今，保铃棉 531 对靶标害虫都表现出良好的抗性，也证实了引入抗虫性状的稳定性。

4.3 转基因植物产品与转基因植物在环境安全性方面的差异。

对田间种植的保铃棉 531 对环境影响的分析表明，除对抗鳞翅目害虫的抗性外，保铃棉 531 与常规棉花品种相比，在对病虫的易感性、生存能力、种子繁殖能力等方面没有发生改变。Cry1Ac 蛋白对非靶标生物影响的分析也表明，该蛋白对非靶标生物的生长和发育均无有害作用 (Betz 等, 2000)。

自商业化至今，保铃棉 531 以其对靶标害虫良好的抗性，为农民提供了一种优良的虫害管理工具，降低了成本，减少了杀虫剂的喷施，从而减少了对种植者健康的危害，改善了有益昆虫和野生动物的生存环境 (Edge 等, 2001; Perlak 等, 2001; Carpenter 和 Gianessi, 2001; Betz 等, 2000; 经济研究处/USDA, 2000; Falck-Zepeda 等, 1998; Falck-Zepeda 等, 2000; Fernandez-Cornejo 和 McBride, 2000; Gianessi 和 Carpenter, 1999; Klotz-Ingram 等, 1999; Traxler 和 Falck-Zepeda, 1999; Wier 等, 1998; Xia 等, 1999)。

4.4 转基因植物产品与转基因植物在对人类健康影响方面的差异。

保铃棉 531 中含有的 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白无毒性和致敏性，且在人类主要接触的棉花产品中含量可忽略不计。此外，保铃棉 531 与常规棉花品种在营养成分上具有实质等同性。动物饲喂试验进一步证明了保铃棉 531 与常规棉花品种的安全性相当。保铃棉 531 在美国已经商业化多年，没有任何资料表明它对人类健康影响方面与常规棉花品种有差异。

4.5 参照本办法第十四条有关标准划分转基因植物产品的安全等级。

根据农业部转基因生物的安全等级和产品的生产、加工活动对其安全等级的影响类型和影响程度，孟山都公司通过对受体植物、基因操作、转基因植物及转基因产品的安全进行了全面的评估（包括基因操作、环境、毒性、食品安全等），认为转 *cry IAc* 基因棉花的安全登记为 I 级。

参考文献

- Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol," Residue Review **61**:126-160.
- Adang, M. J., Staver, M. J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker, R. F. and Thompson,
- D. V. 1985. Characterized Full-length and Truncated Plasmid Clones of the Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and Their Toxicity to *Manduca sexta*," Gene **36**:289-300.
- Altman, D.W., Stipanovic, R.D. and Benedict, J.H. 1989. erpenoid Aldehydes in Upland Cottons. II. Genotype-environment interactions," Crop. Sci. **29**:151-1456.
- Anonymous. 1979. Textile Monthly, February, 1979.
- Astwood, J.D. and R.L. Fuchs. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the gastrointestinal tract. Journal of Allergy and Clinical Immunology **97**: 241.
- Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nature Biotechnology **14**:1269-1273.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. and Schaller, H. 1982. Nucleotide Sequence and Exact Localization of the Neomycin Phosphotransferase Gene from Transposon Tn5," Gene **19**, 327-336.
- Bell,A. 1991. Physiologyofsecondary products. InCotton Physiology, Mauney, J. and McD. Stewart, Eds.. The Cotton Foundation, Publisher, U.S.A.
- Berardi, L.C. and L.A. Goldblatt. 1980. Gossypol. Pp. 184-237.In: Toxic Constituents of Foodstuffs..2nd Ed. Liener, I.E. (ed.), Academic Press, New York.
- Berberich, S.A., J.E. Ream, T.L. Jackson, R. Wood, R. Stipanovic, P. Harvey, S. Patzer, and R.L. Fuchs. 1996. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional Cottonseed. J. Agri. Food Chem. **44**:365-371.
- Betz, F.S., B.G. Hammond and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology **32**:156-173.
- Bevan, M., Barnes, W. M. and Chilton, M. D., 1983. Structure and Transcription of the Nopaline Synthase Gene Region of T-DNA," Nucl Acid Res. **11** (2) 369-385.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. and Boyer, H.
- W. 1977. Construction and Characterization of New Cloning Vehicles II. A Multipurpose Cloning System," Gene **2**:95-113.
- Broer, I., W. Droege-Laser, and M. Gerke. 1996. Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. Pp 67-70. In E.R. Schmidt, T. Hankeln (eds.). Transgenic organisms and biosafety. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

- Bush, R.K., S.L. Taylor, J.A. Nordlee, and W.W. Busse. 1985. Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76:242-245.
- Carpenter, J.E. and L.P. Gianessi. 2001. Agricultural biotechnology: updated benefit estimates. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, D.C.
- Castillo, A.R., M.R. Gallardo, M. Maciel, J.M. Giordano, G.A. Conti, M.C. Gaggiotti, O. Quaino, C. Gianni, and G.F. Hartnell. 2001. Effect of feeding dairy cows with either Bollgard BollgardII, Roundup Ready or control cottonseeds on feed intake, milk yield and milk composition. *J.Dairy Sci.*, Vol 84, suppl. 1, Abstract 1712.
- Cherry, J.P. and H.R. Leffler. 1984. Seed. In Cotton, Koher, R.J. and Lewis, C.F., eds. Amer. Soc. Agron. Madison, WI. Chapter 13, pp 512-558.
- Cottonseed Oil. 1993. Jones, L.A. and King,C.C. (eds.), National Cottonseed Products Associations, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis,TN.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H. M. 1982. "opaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence," *J. Molec. Appl. Genet.* **1**: 561-573.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. 1980. "road Host Range DNA Cloning System for Gram-negative Bacteria: Construction of a Gene Bank of Rhizobium meliloti," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**:7347-7351.
- Doolittle, R.F, D.F. Feng, K.L Anderson, and M.R. Alberro. 1990. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. *J. Molecular Evolution* 31:383-388.
- Economic Research Service/USDA. 2000. Geneticallyengineered crops: has adoption reduced pesticide use? Pp13-17. Agricultural Outlook, August 2000.
- Edge, J.M., J.H.Benedict, J.P.Carroll, and H.K. Reding. 2001. BollgardCotton: An assessment of global economic, environmental, and social benefits. *J. Cotton Science* 5:1-8.
- EPA, 1988. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing Bacillus Consultation on Food Allergies, Rome, Italy, November 13-14, 1995. FAO, Rome.
- Falck-Zepeda J.B., G. Traxler, and R.G. Nelson. 1998. Rent creation and distribution from biotechnology innovations: the case of Bt cotton and herbicide-tolerant soybeans in 1997. *Agribusiness* 16:1-25. ISAAA Briefs No. 14 ISAAA, Ithaca, NY.
- Falck-Zepeda J.B., G.Traxler, and R.G. Nelson. 2000. Surplus distribution from the introduction of a biotechnology innovation. *Am J of Agric Economics* 82:360-369.
- Fernandez-Cornejo J, and W.D. McBride. 2000. Genetically engineered crops for pest management in U.S. agriculture: farm level effects. Economic Research Service/U.S. Department of Agriculture-Agricultural Economic Report (AER)-786.
- Fling, M., Kopf, J. and Richards, C., 1985. Nucleotide Sequence of the Transposon Tn7 Gene Encoding an Aminoglycoside-Modifying Enzyme, 3"(9)-O-Nucleotidylyltransferase," *Nucleic Acids Res.* **13** (9):7095-7106.
- Food and Drug Administration. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register* 57(104):22984-23005.

Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. 1994. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals; aminoglycoside 3'-phosphotransferase II. Federal Register 59:26700-26711.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. and Woo, S. C. 1983. Expression of Bacterial Genes in Plant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Fuchs, R. L., Heeren, R.A., Gustafson, M.E., Rogan, G.J., Bartnicki, D. E., Leimgruber, R.M., Finn, R.F., Hershman, A, and Berberich, S.A. 1993a. Purification and Characterization of Microbially Expressed Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) Protein and its Equivalence to the Plant Expressed Protein. Biotechnology 11:1537-1542.

Fuchs, R. L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimbruger, R.M., and Berberich, S.A. 1993b. Safety Assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) Protein Biotechnology 11:1543-1546.

Fuchs, R.L. and J.D. Astwood. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. Food Technology 50: 83-88.

Gianessi, L.P. and J.E. Carpenter. 1999. Agricultural Biotechnology: Insect Control Benefits. National Center for Food and Agricultural Policy. <http://www.bio.org/food&ag/ncfap.htm>

Gardner, R. C., Howorth, A., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R. J. and Messing, J. 1981. The Complete Nucleotide Sequence of an Infectious Clone of Cauliflower Mosaic Virus by M13mp7 Shotgun Sequencing. Nucleic Acid Res. 9:2871-2898.

Green, J.M. and M.D. Jones. 1953. Isolation of cotton for seed increase. Agron. J. 45:366-368.

Halsey, A.B., M.E. Martin, M.E. Ruff, F.O. Jacobs and R.L. Jacobs. 1986. Sunflower oil is not allergenic to sunflower seed-sensitive patients. J. Allergy Clin. Immunol 78: 408-410.

Harlow, E., and Lane, D. 1988. Immunoassay". "Antibodies: A Laboratory Manual", Chapter 14:553-612.

Holtorf, S., Apel, K. and Bohlmann, H. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 29, 637-646.

Huttner, S. L., Arntzen, C., Beachy, R., Breuning, G., Nester, E., Qualset, C. and Vidaver, A. 1992. Revising Oversight of Genetically Modified Plants," Bio/Technology 10: 967-971.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2000. Environmental Health Criteria, 217: *Bacillus thuringiensis*. http://www.who.int/pcs/docs/ehc_217.html

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: ?-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6, 3901-3907.

- Kareiva, P. and W. Morris. 1992. Using field trials with transgenic crops to quantify the movement of recombinant pollen: An ecological risk analysis for transgenic cotton. A technical report for Calgene Company.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes," *Science* **236**:1299-1302.
- Kimber, I., N.I. Kerkvliet, S.L. Taylor, J.D. Astwood, K. Sarlo, and R.J. Dearman. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. *Toxicological Sciences* 48:157-162.
- Klee, H. J., White, F. F., Lyer, V. N., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1983. Nutritional Analysis of the Virulence Region of an Agrobacterium tumefaciens Ti Plasmid," *J. Bacteriol.* **153**:878-883.
- Klotz-Ingram, C., S. Jans, J. Fernandez-Cornego and W. McBride. 1999. Farm-level production effects related to the adoption of genetically modified cotton for pest management. *AgBioForum* 2(2):73-84.
- Koncz, C. and Schell, J., 1986. The Promoter of TL-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector," *Mol. Gen. Genet.* **204**:383-396.
- Mehetre, S.S. 1992. Natural crossing in cotton (*Gossypium Sp.*): Its significance in maintaining variety purity and production of hybrid seed using male sterile lines. *J. Cotton Res. & Dev.* 6(2):73-97.
- McClintock, J.T., C.R. Schaffer and R.D. Sjoblad. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.
- McGregor, S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants, Agricultural Handbook No. 496, United States Department of Agricultural Research Service, Washington, D.C.
- Mehetre, S.S. 1992. Natural crossing in cotton (*Gossypium Sp.*): Its significance in maintaining variety purity and production of hybrid seed using male sterile lines. *J. Cotton Res. & Dev.* 6(2):73-97.
- Metcalfe, D.D., J.D. Astwood, R. Townsend, H.A. Sampson, S.L. Taylor, and R.L. Fuchs. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36(S):S165-S186.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. and Ohashi, Y. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 49-59.
- Morgan S.E. 1990. Gossypol Residues in Organ Meats vs Thresholds of Toxicity", *Vet. Hum. Toxicol.* 32S:76.

- National Cottonseed Products Association. 1989. Cottonseed and Its Products, 9th ed. Memphis TN.
- NCPA, Cottonseed Oil. 1990. Jones, L.A. and King, C.C. (eds.), National Cottonseed Products Associations, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, TN.
- NCPA, Cottonseed Oil. 1993. Jones, L.A. and King, C.C. (eds.), National Cottonseed Products Associations, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, TN.
- Nielsen, K.M., F. Gebhard, K. Smalla, A.M. Bones, and J.D. van Elsas. 1997. Evaluation Of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* Bd413. *Theoretical and Applied Genetics* 95(5/6):815 - 821.
- Nielsen, K.M. , A.M. Bones, K. Smalla, and J.D. van Elsas. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - A rare event? *FEMS Microbiology Reviews* 22:79 - 103.
- Niles, G.A. and Feaster, C.V. 1984. Cotton, Agronomy No. 24, p 205, Soil Science Society of America, Inc., (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds.) Wisconsin, USA
- Odell, J. T., Nagy, F., and Chua, N. H. 1985. Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter," *Nature* 313:810-812.
- Percival, A. E., J.F. Wendel, and J.M. Stewart. 1999. Taxonomy and Germplasm Resources. In Cotton: Origin, History, Technology, and Production. Pp 33-63. Smith, W.C. (ed.). John Wiley and Sons, Inc. chapter 1.2.
- Perlak, F.J., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Herring, B. Carey, R.A. Ihrig and J.K. Roberts. 2001. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA – early promises versus today's reality. *The Plant Journal* 27:489-501.
- Pons, W.A., Pittman, R.A. and Hoffpauir, C.L. 1958. "3-amino-1-propanol as a Complexing Agent in the Determination of Total Gossypol," *J. Am Oil Chem. Soc.* 35:93-97.
- Prins, T.W. and J.C. Zadoks. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a Literature review. *Euphytica* 76:133-138.
- Rogers, S. G., Otonnell, K., Horsch, R. B. and Fraley, R. T. 1985. In Biotechnology in Plant Science, eds., Zaitlin, M., Day, P., Hollaender, A. and Wilson C. A., Academic Press, Inc., New York, NY, pp 219-226.
- Sanders, P., Winter, J. A., Barnason, A. R., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1987. Comparison of Cauliflower Mosaic Virus 35S and Nopaline Synthase Promoters in Transgenic Plants. *Nucleic Acids Res.* 15:1543-1558.
- Schlüter, K., J. Futerer, and I. Potrykus. 1995. Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all- at an extremely low frequency. *Bio/Technology* 13:1094-1098.
- Schuler, M. A., Schmitt, E. S. and Beachy, R. N. 1982. Closely Related Families of Genes Code for the alpha and alpha' Subunits of the Soybean 7S Storage Protein Complex," *Nucleic Acids Res.* 10 (24):8225-8261.

- Shaw, K. J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
- Sims, S.R., S.A. Berberich, D.L. Nida, L.L. Segalini, J.N. Leach, C.C. Ebert, and R.L. Fuchs. 1996. Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Sci.* 36:1212-1216.
- Sjoblad, R.D., J.T. McClintock and R. Engler. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxocology and Pharmacology* 15:3-9.
- Smalla, K., S. Borin, H. Heuer, F. Gebhard, J.D. van Elsas, and K. Nielsen. 2000. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. In Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of GMOs. Pp 146-154. Fairbairn, C, G. Scoles, and A. McHughen (eds.). University Extension Press, University of Saskatchewan; Saskatoon, Saskatchewan.
- Stachel, S. E. and Nester, E. W. 1986. The Genetic and Transcriptional Organization of the vir Region of the A6 Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*," *EMBO J.* 5(7): 1445-1454.
- Stalker, D. M., Thomas, C. M., and Helinski, D. R. 1981. Nucleotide Sequence of the Region of the Origin of Replication of the Broad Host Range Plasmid RK2," *Mol. Gen. Genetics* 181:8-12.
- Sutcliffe, J. G. 1978. Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Plasmid pBR322," *Symposia on Quantitative Biology* 43:77-103.
- Tattrie, N.H. and M. Yaguchi. 1973. Protein content of various processed edible oils. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 6:289-290.
- Taylor, S.L., W.W. Busse, M.I. Sachs, J.L. Parker, and J.W. Yunginger. 1981. Peanut oil is not allergenic to peanut-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol* 68(5):372-375.
- Taylor, S.L., R.F. Lemanske Jr., R.K. Bush, and W.W. Busse. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann. Allergy* 59(5):93-99.
- Taylor, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technology* 46: 146-152.
- Traxler G., and J. Falck-Zepeda. 1999. The distribution of benefits from the introduction of transgenic cotton varieties. *AgBioForum* 2(2):94-98.
- Trolinder, N.L. and Goodin, J.R. 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Plant Cell Reports*," 6:231-234.
- USDA. 1995. Monsanto Petition 95-045-01p to USDA/APHIS for Determination of Nonregulated Status of Glyphosate Tolerant Cotton (Roundup Ready) Lines 1445 and 1698: Environmental Assessment and Finding of No Significant Impact.
- United States Pharmacopeia. 1995. Volume 23. United State Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. and Swain, W. 1987. Genetically Transformed Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) Plants," *Bio/Technology* 5:263-266.

- Wier, A.T., J.W. Mullins, and J.M. Mills. 1998. Bollgard Cotton -Update and economic comparisons including new varieties. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 2: 1039-1040. National Cotton Council. Memphis, TN.
- Williamson, J.D., Hirsch-Wynott, M.E., Larkins, B.A., and Gelvin, S.B. 1989. Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 90:1570-1576.
- Xia, J.Y., J.J. Cui, L.H. Ma, S.L. Dong and X.F. Cui. 1999. The role of transgenic Bt Cotton in integrated insect pest management *Acra Gossypii Sin.* 11:57-64.
- Yu, L., R.E. Berry and B.A. Croft. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). *J. Econ. Entomol.* 90(1):113-118.
- Zambryski, P., 1992. "Chronicles from the Agrobacterium-Plant Cell DNA Transfer Story," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:465-490.

六、相关附件资料

相关附件资料目录

序号	附件资料	页码
1	目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列	62
2	目的基因与载体构建的图谱	63
3	目的基因与植物基因组整合及其表达的分子检测或鉴定结果（PCR 检测、Southern 杂交分析、Northern 或 Western 分析结果、目的基因产物表达结果）	65
4	转基因性状及产物的检测和鉴定技术	78
5	各试验阶段审批书的复印件(进口转基因生物直接申请安全证书的, 本项不填写)	78
6	各试验阶段的安全性评价试验总结报告(进口转基因生物直接申请安全证书的, 本项不填写)	78
7	转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告	78
8	食品安全性的综合评价报告, 包括: A) 必要的动物毒理试验报告; B) 食品过敏性评价试验报告; C) 与非转基因植物比较, 其营养成份及抗营养因子分析报告等	78
9	该类转基因植物国内外生产应用概况	87
10	田间监控方案, 包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等	87
11	审查所需的其它相关资料	90
12	转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件(境内单位申请安全证书的, 本项不填写)	90
13	输出国家或地区经过科学试验证明对人类、动植物和生态环境无害的资料(境内单位申请安全证书的, 本项不填写)	101

(注: 为了与正文中图表序号加以区分, 本部分图表以附图或附表命名)

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列;

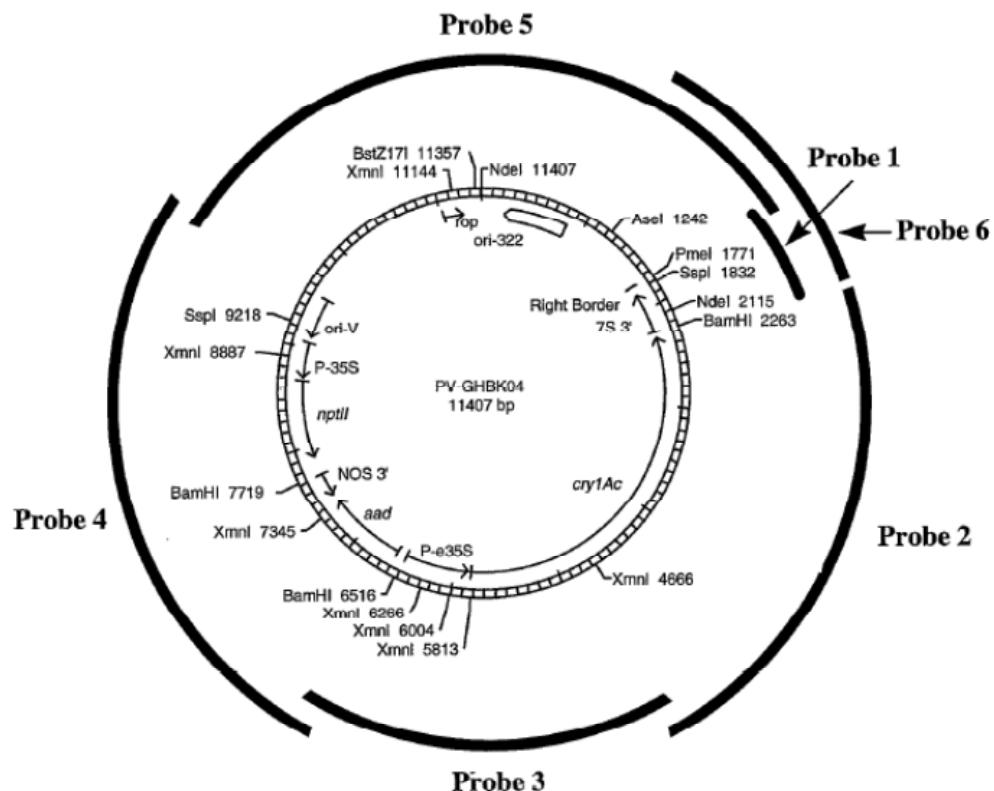
cryIAc 基因的核苷酸序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

cryIAc 基因的推导氨基酸序列

1	MDNNPNINEC	IPYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLSEF
51	VPGAGFVLGL	VDIIWGIFGP	SQWDAFLVQI	EQLINQRIEE	FARNQAISRL
101	EGLSNLYQIY	AESFREWEAD	PTNPALREEM	RIQFNDMNSA	LTTAIPLFAV
151	QNYQVPULLSV	YVQAANLHLS	VLRDVSVFGQ	RWGFDAATIN	SRYNDLTRLI
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	QFRRELTLTV	LDIVSLFPNY
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSF	RGSAQGIEGS	IRSPHLMDIL
301	NSITIYTDAH	RGEYYWSGHQ	IMASPVGFSG	PEFTFPLYGT	MGNAAAPQQRI
351	VAQLGQGVYR	TLSSTLYRRP	FNIGINNQL	SVLDGTEFAY	GTSSNLPSAV
401	YRKSGTVDSL	DEIPPQNNNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SNSSVSIIRA
451	PMFSWIHRSA	EFNNIIASDS	ITQIPAVKGN	FLFNNGSVISG	PGFTGGDLVR
501	LNSSGNNIQN	RGYIEVPIHF	PSTSTRYRVR	VRYASVTPIH	LNVNWGNSSI
551	FSNTVPATAT	SLDNLQSSDF	GYFESANAF	SSLGNIVGVR	NFSGTAGVII
601	DRFEFIPVTA	TLEAEYNLER	AQKAVNALFT	STNQLGLKTN	VTDYHIDQVS
651	NLVTYLSDEF	CLDEKRELSE	KVKHAKRLSD	ERNLLQDSNF	KDINRQPERG
701	WGGSTGITIQ	GGDDVFKENY	VTLSGTFDEC	YPTYLYQKID	ESKLKAFTRY
751	QLRGYIEDSQ	DLEIYSIRYN	AKHETVNVPG	TGSLWPLSAQ	SPIGKCGEPN
801	RCAPHLEWNP	DLDCCSRDGE	KCAHHSHHFS	LDIDVGCTDL	NEDLGVWVIF
851	KIKTQDGHAR	LGNLEFLEEK	PLVGEALARV	KRAEKKWRDK	REKLEWETNI
901	VYKEAKESVD	ALFVNSQYDQ	LQADTNIAM	HAADKRVHSI	REAYLPELSV
951	IPGVNAAIFE	ELEGRIFTA	SLYDARNVIK	NGDFNNGLSC	WNVKGHDV
1001	EQNNQRCSVLV	VPEWEAEVSQ	EVRCVCPGRGY	ILRVTAYKEG	YGEGCVTIHE
1051	IENNTDELKF	SNCVEEEIYP	NNTVTCNDYT	VNQEYGGAY	TSRNRGYNEA
1101	PSVPADYASV	YEKSYTDR	RENPCFNRG	YRDYTPLPVG	YVTKELEYFP
1151	ETDKVWIEIG	ETEGTFIVDS	VELLMEE		

2. 目的基因与载体构建的图谱;



Probe	Start Position	End Position	Total Length (bp)
Probe 1	1757	2278	522
Probe 2	2252	4677	2456
Probe 3	4651	6528	1878
Probe 4	6503	9788	3286
Probe 5	9761	1783	3430
Probe 6	996	2263	1268

附图1. PV-GHBK04质粒环状图谱

附表1. PV-GHBK04质粒主要遗传元件一览表

遗传元件	大小 (kb)	功 能 (参考文献)
右边界(RB)	0.09	来自 pTiT37 质粒的片段, 含有 24 bp 的胭脂碱 T-DNA 右边界, 用于启动 T-DNA 从土壤农杆菌中转移(RB)到植物染色体组中(Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
P-E35S	0.62	花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子(Odell <i>et al.</i> , 1985), 带有重复增强子区域(Kay <i>et al.</i> , 1987)。
<i>cry1Ac</i>	3.50	合成的苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白变异蛋白编码序列 (Donovan <i>et al.</i> , 1992)。
7S 3'	0.43	来自于大豆 7S 种子储存蛋白基因(Schuler <i>et al.</i> , 1982)的 3'非翻译区, 用于指导 <i>cry1Ac</i> 基因 mRNA 的多聚腺苷酸化。
<i>aad</i>	0.79	细菌启动子和来自于转座子 Tn7 的 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶基因编码序列(Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)。
P-35S	0.32	花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子区(Gardner <i>et al.</i> , 1981; Sanders <i>et al.</i> , 1987)。
<i>nptII</i>	0.79	从 Tn5 分离出来的新霉素磷酸转移酶 II 基因编码序列(Beck <i>et al.</i> , 1982)。表达该基因可以使植物具有卡那霉素抗性, 作为选择标记用于筛选转化体(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
NOS 3'	0.26	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区, 其功能是终止转录, 控制 <i>nptII</i> mRNA 的多腺苷化 (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
<i>oriV</i>	0.62	来自于广谱寄主质粒 RK2, 为质粒在农杆菌中的复制起点(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
<i>ori322/rop</i>	1.8	来自于质粒 pBR322, 为质粒在大肠杆菌中保持拷贝数所需的复制起始点, 并为质粒结合转移到土壤农杆菌细胞提供引物(<i>rop</i>)区和 <i>bom</i> 位点(Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978)。

3. 目的基因与植物基因组整合及其表达的分子检测或鉴定结果 (PCR 检测、Southern 杂交分析、Northern 或 Western 分析结果、目的基因产物表达结果);

对保铃棉531中整合的外源基因的分子生物学分析最初应用Southern杂交、Western印迹和ELISA方法于1994年完成。其后随着分子生物学研究的发展，各项试验鉴定技术的灵敏度和精确性都有了很大进步，所以孟山都公司于2001年对保铃棉531的分子生物学特性进行了重新鉴定，鉴定结果表明保铃棉531中含有如下插入：1) 功能性插入：该插入中依次含有一个不完整的*cryIAc*表达盒、一个完整的*cryIAc*表达盒、一个基因编码序列、一个完整的*npt II*基因表达盒和来自质粒PV-GHBK04的*oriV*序列。其中不完整的*cryIAc*表达盒片段包含部分*cryIAc*基因的3'序列和7S 3'终止子，该片段与完整*cryIAc*表达盒中的相应序列插入方向相反。完整的*cryIAc*基因表达盒由e35S启动子、全长*cryIAc*基因和7S 3'终止子组成，能够表达Cry1Ac杀虫蛋白，使保铃棉531具有鳞翅目害虫抗性。*nptII*基因表达盒由35S启动子、全长*nptII*基因和NOS 3'终止子组成，可以表达新霉素磷酸转移酶II(NPTII)，该蛋白在产品开发初期作为选择性标记，用来选择转化体植株。插入中的序列包括细菌启动子和一个3'(9)-O-氨基糖苷腺苷酰基转移酶基因(*aad*)序列，该基因作为选择性标记，在基因克隆过程中用于筛选大肠杆菌转化菌株。由于基因在细菌启动子的控制下，所以其只能在细菌中表达，而不能在植物体内表达，最初对保铃棉531进行的分子生物学鉴定也证实了这一点。*oriV*序列是质粒在农杆菌中维持拷贝数所需要的复制起始位点，在保铃棉531中不参与基因调控。2) 非功能性插入：含有部分7S 3'，该插入大小为242bp，不能产生任何表达产物。Southern杂交分析表明，保铃棉531功能性插入序列和非功能性插入序列都是在单一插入位点单拷贝插入的。插入的世代稳定性分析表明，功能性插入能够稳定存在于保铃棉531自交后代及通过常规育种得到的商业化品种中。

PCR 与 DNA 序列分析确定插入片段中各元件的组成及排列情况(CBI)

功能性插入片段及其基因组侧翼序列分析

用位于功能性插入片段及其相邻的基因组侧翼序列的 7 对引物对保铃棉531 插入片段的组成和排列进行 PCR 分析。每对引物扩增产物的位置、大小及 PCR 扩增结果见附图 2 和附图 3。同时以非转基因对照 Coker312 的基因组 DNA 和质粒 PV-GHBK04 作为阴性和阳性对照，以无 DNA 模板对照作为系统对照进行 PCR 反应。如预期，所有 7 对引物在非转基因对照和无 DNA 模板对照中都没有产生 PCR 产物。6 对引物在保铃棉 531 和质粒对照中产生了预期大小的扩增产物。由于质粒中不含有基因组侧翼序列，含有基因组侧翼序列特异性引物的一对引物在质粒对照中没有产生任何扩增产物。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 序列分析后进行拼接，得到整个功能性插入的序列信息，以确定功能性插入中各遗传元件的组成及排列。与完整 *cryIAc* 表达盒反向相连的部分 *cryIAc* 表达盒序列及其相邻的基因组侧翼序列见附图 6。含有

完整 *cry1Ac* 表达盒的插入片段序列见附图 7。插入片段各元件的组成及排列示意
图见附图 11。附表 2 列出了各遗传元件在附图 7 序列中的位置。

以保铃棉 531 种子基因组 DNA 为模板，以分别位于 5' 和 3' 插入-侧翼序列区域的两对引物（引物 C/D 和引物 A/B，附图 4）进行 PCR 扩增。将得到的扩增产物进行 DNA 序列分析，得到了保铃棉 531 的 5' 和 3' 端侧翼序列信息（附图 8 和附图 9）。

非功能性插入片段及其基因组侧翼序列分析

用位于非功能性插入序列及其相邻的基因组侧翼序列的两对引物（附图 5）对保铃棉 531 的非功能性插入片段进行分析。PCR 扩增得到大小分别为~700 和~600bp 的两个产物，将两个产物进行 DNA 序列分析后进行拼接，得到了包含基因组侧翼序列的非功能性插入片段，非功能性插入片段大小为 242bp，含有来自于质粒 PV-GHBK04 的 176bp 7S 3' 序列和 66bp 的多聚接头。非功能性插入及其相邻的基因侧翼序列见附图 10。

附图2. 对保铃棉531功能性插入的PCR分析（产物1-4）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图3. 对保铃棉531功能性插入的PCR分析（产物5-7）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图4. 保铃棉531功能性插入侧翼序列的PCR分析鉴定

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图5. 对保铃棉531非功能性插入的PCR分析

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图6. 保铃棉531功能性插入中与完整*cry1Ac*表达盒反向相接的部分*cry1Ac*表 达盒及其相邻的基因组侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图7. 保铃棉531功能性插入中含有完整*cry1Ac*表达盒的插入片段序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图8. 功能性插入的5'侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

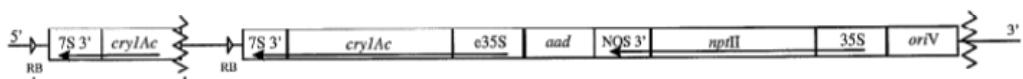
附图9. 功能性插入的3'侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图10. 保铃棉531非功能性插入及其相邻的基因组侧翼序列序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

A.



B.



附图11. 保铃棉531中插入片段的示意图

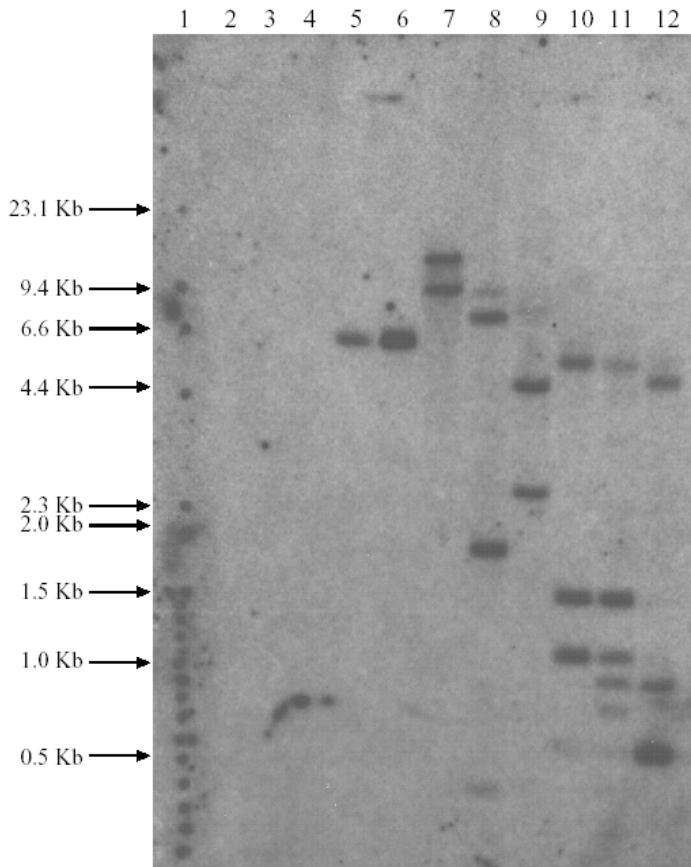
A图为1994年分子特性鉴定的结果，B图为2001年应用灵敏度更高、更精确的方法对保铃棉531进行重新分子特性鉴定的结果。在最初的鉴定中认为部分cry1Ac表达盒与含有完整表达盒的片段顺向相连。新的分子鉴定结果表明该片段与含有完整表达盒的片段反向相连，并又鉴定出一个242bp的非功能性插入。

附表2. 保铃棉531中含有完整cry1Ac表达盒的插入片段中的遗传元件汇总及在附图7序列中的位置

遗传元件	在附图 7 中的位置	功能 (参考文献)
间插序列	1-38	合成序列, 多聚接头。
7S 3'	39-479	来自于大豆 7S 种子储存蛋白基因(Schuler <i>et al.</i> , 1982)的 3'非翻译区, 用于指导 cry1Ac 基因 mRNA 的多聚腺苷酸化。
间插序列	480-521	合成序列, 多聚接头。
cry1Ac	522-4058	合成的苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白变异蛋白编码序列 (Donovan <i>et al.</i> , 1992)。
间插序列	4059-4089	合成序列, 多聚接头
P-e35S	4090-4708	花椰菜花叶病毒(CaMV) 启动子(Odell <i>et al.</i> , 1985), 带有重复增强子区域(Kay <i>et al.</i> , 1987)。
间插序列	4709-4816	合成序列, 多聚接头。
aad	4817-5605	细菌启动子和来自于转座子 Tn7 的 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷转移酶基因编码序列(Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)。
间插序列	5606-5684	合成序列, 多聚接头。
NOS 3'	5685-5925	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区, 其功能是终止转录, 控制 nptII mRNA 的多腺苷化(Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983)。
间插序列	5926-5940	合成序列, 多聚接头。
npt II	5941-6908	从 Tn5 分离出来的新霉素磷酸转移酶 II 基因编码序列(Beck <i>et al.</i> , 1982)。表达该基因可以使植物具有卡那霉素抗性, 作为选择标记用于筛选转化体(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
间插序列	6909-6941	合成序列, 多聚接头。
P-35S	6942-7265	花椰菜花叶病毒(CaMV) 的 35S 启动子区(Gardner <i>et al.</i> , 1981; Sanders <i>et al.</i> , 1987)。
间插序列	7266-7361	合成序列, 多聚接头
Ori-V	7362-7755	来自于广谱寄主质粒 RK2, 为质粒在农杆菌中的复制起点(Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
间插序列	7756-7916	合成序列, 来自于质粒骨架。

Southern 杂交分析

利用在插入序列内和插入序列外具有不同酶切位点的多个限制性内切酶消化 MON 531 及非转基因受体 Coker312 的基因组 DNA，所用的限制性内切酶如下：*AseI* 和 *BstZ17I*，这两个酶在质粒 PV-GHBK04 上没有酶切位点，只在基因组侧翼序列中存在酶切位点；*SspI*，这个酶酶切后的基因组 DNA 片段进行 Southern 杂交后可以看到 3 个拷贝的 7S 3' 序列存在；*XmnI*，该酶的酶切位点存在于部分 *cryIAc* 表达盒片段相邻的基因组侧翼序列中，可以用来指示该片段与全长 *cryIAc* 表达盒的相对方向和空间位置；*BamHI*，*BamHI+NdeI*，和 *BamHI+PmeI*，用这 3 个酶组合消化的 DNA 进行 Southern 杂交能够表明含有部分 *cryIAc* 表达盒的插入片段与完整表达盒的插入方向相反，且该片段的 T-DNA 右边界序列与含有完整表达盒的 T-DNA 的右边界序列紧密相连。分别利用相互重叠并覆盖整个插入片段和质粒骨架序列的探针 1、探针 2、探针 3、探针 4 和探针 5（附图 1，转化质粒载体 PV-GHBK04 图谱）进行杂交，其中探针 1 覆盖插入序列 7S3' 区域，因此预期也可以与非功能性插入序列产生杂交信号，探针 5 覆盖插入片段以外的质粒骨架序列。Southern 杂交结果证实了功能性插入中遗传元件的组成及排列如附图 11 所示，同时，由于探针 1 杂交结果显示存在 3 个拷贝 7S3' 区域，也证实了非功能性插入片段的存在。此外，Southern 杂交结果也表明保铃棉 531 功能性插入序列和非功能性插入序列都是在单一插入位点单拷贝插入，除了附图 11 中所示的遗传元件外，来自质粒载体 PV-GHBK04 的其他骨架序列没有插入到保铃棉 531 的基因组中（附图 12 到附图 16）。



附图12. MON 531 Southern 杂交分析-探针1

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 1 (附图 1) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: 空白

泳道 3: 空白

泳道 4: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 5: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 6: 与 34pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 7: *AseI+BstZ17I* 酶切的 MON 531 基因组 DNA

泳道 8: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

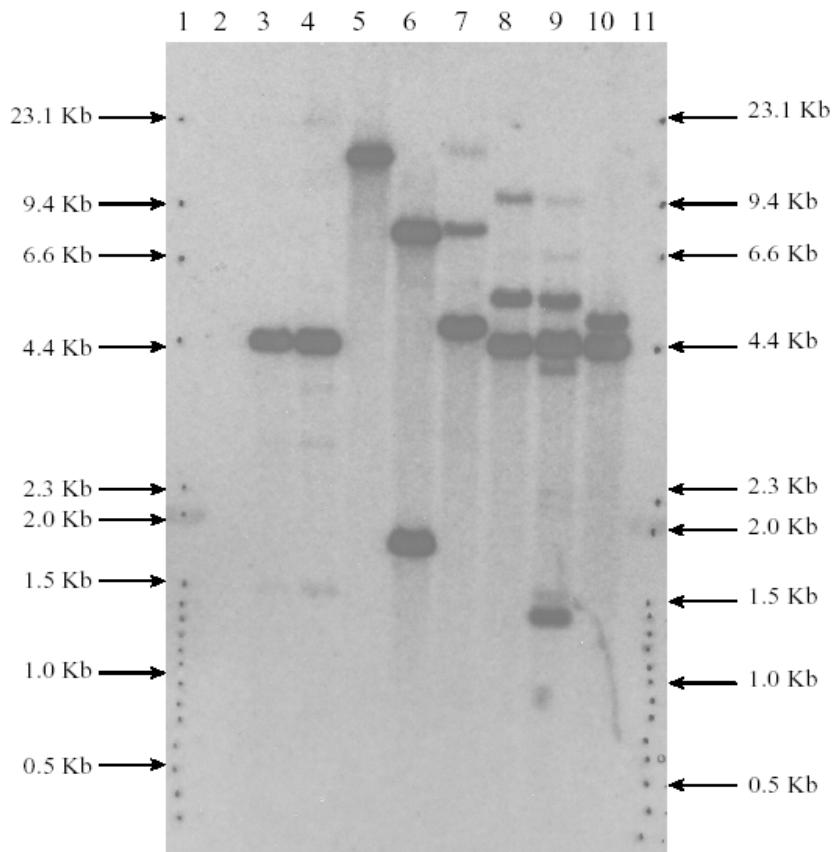
泳道 9: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA ()

泳道 12: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

→指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。



附图13. MON 531 Southern 杂交分析-探针2

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 2 (附图 1) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

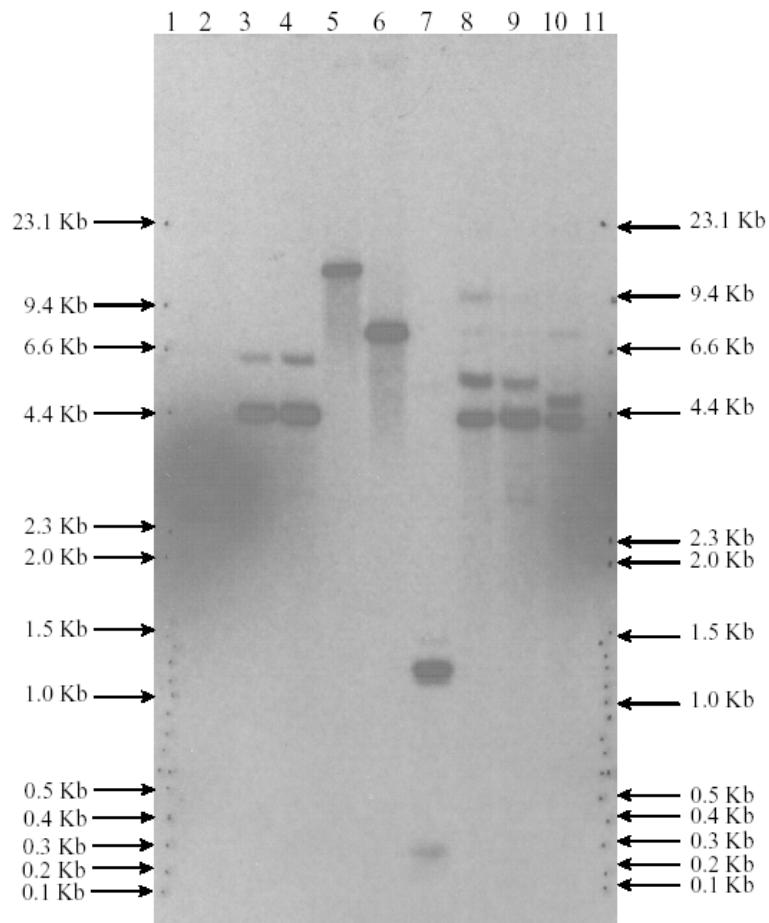
泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。



附图14. MON531 Southern 杂交分析-探针3

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 3 (附图 1) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

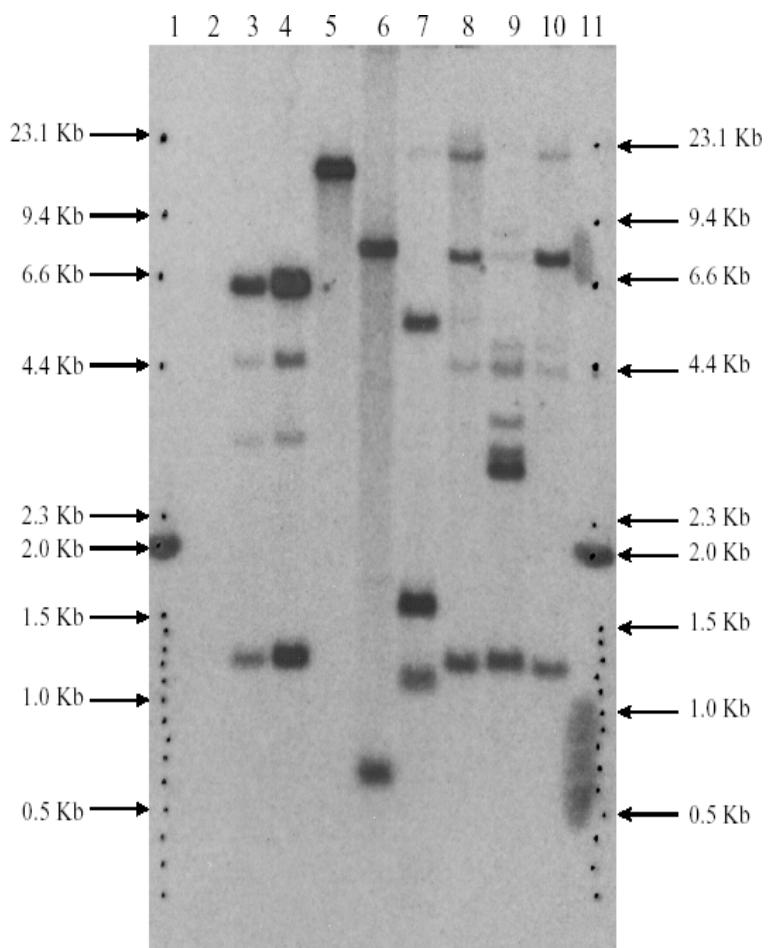
泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。



附图15. MON 531 Southern 杂交分析—探针4

10 μ g MON 531 基因组 DNA 用 *AseI+BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI+NdeI*, *BamHI+PmeI* 消化, 10 μ g 对照 Coker312 基因组 DNA、对照 Coker312 基因组 DNA 与 17pg, 34pg PV-GHBK04 DNA 混合, *BamHI* 消化, 印迹与 32 P 标记的探针 4 (附图 1) 杂交。

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA (*BamHI*)

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA (*BamHI*)

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA (*BamHI*)

泳道 5: *AseI+BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

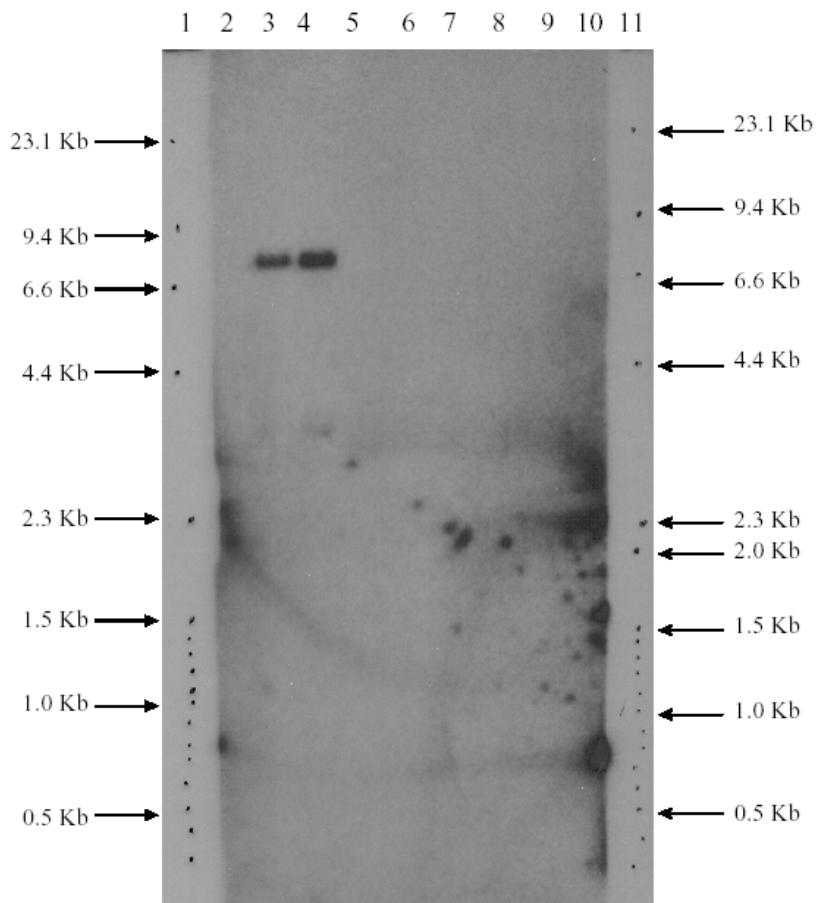
泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI+NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 10: *BamHI+PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: 分子量标记

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。



附图16. Bollgard 531的Southern 印迹杂交分析：骨架序列分析（探针5）

泳道 1: Maker

泳道 2: Coker 312 基因组 DNA

泳道 3: 与 17 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312 DNA

泳道 4: 与 34 pg PV-GHBK04 DNA 混合的 Coker312DNA

泳道 5: *AseI*+*BstZ17I* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 6: *SspI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 7: *XmnI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 8: *BamHI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 9: *BamHI*+*NdeI* 酶切的 531 基因组 DNA

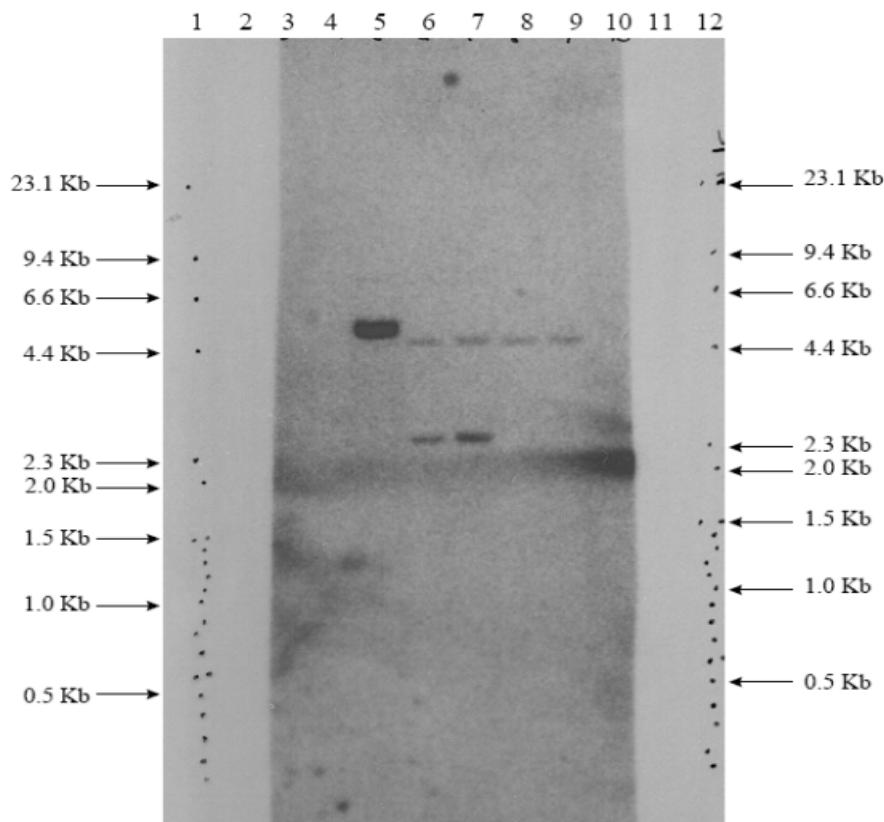
泳道 10: *BamHI*+*PmeI* 酶切的 531 基因组 DNA

泳道 11: Maker

→ 指根据溴化乙锭染色的凝胶上分子量标准而确定的 DNA 大小。

插入的世代稳定性分析

对保铃棉育种世代中的 R5 和 R6 代, 以及两个 531 商业化品种利用 Southern 杂交分析, 以确定插入序列的世代稳定性。结果表明: R5、56 和两个商业品种都产生了 4.6kb 大小的杂交信号 (附图 17, 泳道 6, 7 和 8, 9), 该片段为探针 6 与功能性插入序列的杂交结果。此外 R5 和 R6 还产生了 2.5kb 大小的杂交信号, 而两个商业品种则没有产生这个 2.5kb 的杂交信号, 该杂交信号为探针 6 (附图 1) 与含有部分 7S3' 终止子序列的 242bp 非功能性插入杂交产生的。两个商业品种是通过常规育种途径选育的保铃棉 531 衍生品种, 在育种过程中 242bp 插入序列与功能性插入序列分离, 因此没有检测到上述 2.5kb 的杂交信号。如预期, 非转基因对照 Coker 312 没有产生任何杂交信号 (附图 17, 泳道 4)。上述结果表明功能性插入序列在试验的 R5、R6 代和商业化品种中稳定存在。



附图17. MON 531四个世代遗传稳定性Southern 杂交分析

MON 531 的 R5、R6 代和两个抗虫棉商业品种、非转基因对照 Coker 312、PV-GHBK04 质粒约 34pg DNA 用 *XmnI* 酶切, ^{32}P -标记的探针 6 (附图 1) 杂交。每泳道 10 μg 。泳道描述如下:

- 泳道 1: 分子量标记
 - 2: 空白
 - 3: 空白
 - 4: Coker 312
 - 5: Coker 312 DNA 与 PV-GHBK04 质粒混合 (约 34pg)
 - 6: R5
 - 7: R6
 - 8: MON 531 商业品种 1
 - 9: MON 531 商业品种 2
 - 10: 空白
 - 11: 空白
 - 12: 分子量标记
- 表示 DNA 分子量大小, 单位 kb

蛋白表达量的 ELISA 检测

用经过验证的ELISA方法对收集于1992年美国田间试验的保铃棉531和非转基因对照的叶片和种子中的Cry1Ac和NPT II蛋白进行定量检测。分析结果如附表3。

附表 3. 1992年美国田间试验收集的材料中Cry1Ac和NPT II蛋白的ELISA检测结果

年份/组织		对照	保铃棉 531	对照	保铃棉 531
1992 年 (6 点)		Cry1Ac (μg/g 组织鲜重)		NPT II (μg/g 组织鲜重)	
种子	均值	ND	0.857	ND	2.451
	范围	NA	0.40-1.32	NA	1.97-2.93
	标准误	NA	0.180	NA	0.185
叶片	均值	ND	1.562	ND	3.145
	范围	NA	1.18-1.94	NA	2.46-3.84
	标准误	NA	0.148	NA	0.269

ND:未检出； NA:不适用

4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术;

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

5. 各试验阶段审批书的复印件(进口转基因生物直接申请安全证书的，
本项不填写);

本申请为转基因生物直接申请进口用作加工原料的安全证书。

6. 各试验阶段的安全性评价试验总结报告（进口转基因生物直接申
请安全证书的，本项不填写);

本申请为转基因生物直接申请进口用作加工原料的安全证书。

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告；

转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告请见下页。

8. 食品安全性的综合评价报告，包括: A)必要的动物毒理试验报告；
B) 食品过敏性评价试验报告； C) 与非转基因植物比较，其营养成
份及抗营养因子分析报告等；

食用安全性综合评价报告请见下页。

转 *cry1Ac* 基因抗虫保铃棉 531 环境和食用安全性

综合评价报告

一、摘要

抗虫保铃棉 531（孟山都公司编号 MON 531）是孟山都公司应用二元质粒载体 PV-GHBK04 通过土壤农杆菌介导方法，将来自于苏云金杆菌的 *Cry1Ac* 基因编码序列整合到常规棉花品种 Coker 312 的基因组中所得到的。保铃棉 531 表达的 *Cry1Ac* 蛋白能够与靶标鳞翅目害虫中肠中的特异性受体结合发挥杀虫效应，对靶标害虫有高度的专一性，而对包括人类在内的非靶标生物无害。保铃棉 531 中还含有 *npt II* 基因编码序列，表达 NPT II 蛋白，从而使转化体植株具有卡那霉素抗性，该基因作为选择性标记，在最初开发阶段用于筛选转化体。

对保铃棉 531 中表达的 *Cry1Ac* 蛋白和 NPT II 蛋白的安全性进行了详细评价，评价内容包括：蛋白的安全使用历史、与已知毒蛋白和致敏原的序列相似性、在模拟胃肠液中的消化性、小鼠急性毒性试验。*Cry1Ac* 蛋白来源于苏云金芽孢杆菌，含有 *Cry* 蛋白的苏云金芽孢杆菌作为微生物杀虫剂，已经安全使用了 40 多年。*Cry1Ac* 与已知的毒蛋白、致敏原和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性，在模拟胃肠液中能被迅速消化，用极高剂量的 *Cry1Ac* 蛋白（数千毫克每千克体重）灌胃小鼠也不会出现毒性效应。NPT II 是最常用的抗生素标记，它可以使受体具有新霉素和卡那霉素抗性。NPT II 蛋白广泛存在于大肠杆菌细胞内，因此人类的肠道中经常可以发现这种酶 (Jefferson et al., 1986; Fuchs et al., 1993b)。NPT II 在很多商业化转基因作物产品中都有应用，其安全性也被详细研究及评价过，NPT II 蛋白与已知的毒蛋白、致敏原和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性，在模拟胃肠液中能被迅速消化，用高达 5000mg/kg 体重的剂量灌胃小鼠后，不会产生任何毒性效应。因此，*Cry1Ac* 和 NPT II 对人类及动物健康不会产生不良影响。此外，人类可能摄入的棉花产品主要是棉籽油，棉籽油中蛋白的含量非常低，甚至可以忽略不计，所以人类摄入保铃棉 531 中表达的外源蛋白的可能性非常低。对保铃棉 531 产生棉籽的成分分析也表明，保铃棉 531 与常规对照棉花的组成成分实质等同。所有证据均表明，保铃棉 531 与常规对照的安全性相当，对人类及动物健康不会产生不良影响。

在环境安全性方面，保铃棉 531 转化体与常规对照相比，除了能够抵抗鳞翅目害虫危害，减少杀虫剂的使用外，在农艺性状和农业实践上没有任何区别。通过对多点种植的保铃棉 531 品系进行田间观察和监测，发现保铃棉 531 与非转基因对照在演变为杂草的可能性、表型及农艺性状、对病虫害敏感程度等方面均无显著差异。保铃棉 531 中表达的 *Cry1Ac* 蛋白通过结合靶标害虫中肠上的特异性受体发挥杀虫作用，其对鳞翅目害虫具有高度的专一性，而对非靶标生物无害。保铃棉 531 饲喂蜜蜂、草蛉、寄生蜂、瓢虫、弹尾目昆虫、跳虫、鹤鹑等非靶标生物，均为发现任何不良影响，也验证了 *Cry1Ac* 蛋白对鳞翅目靶标害虫的专一性。

受农业部的委托，中国疾病预防与控制中心营养与食品安全所于 2003 年对

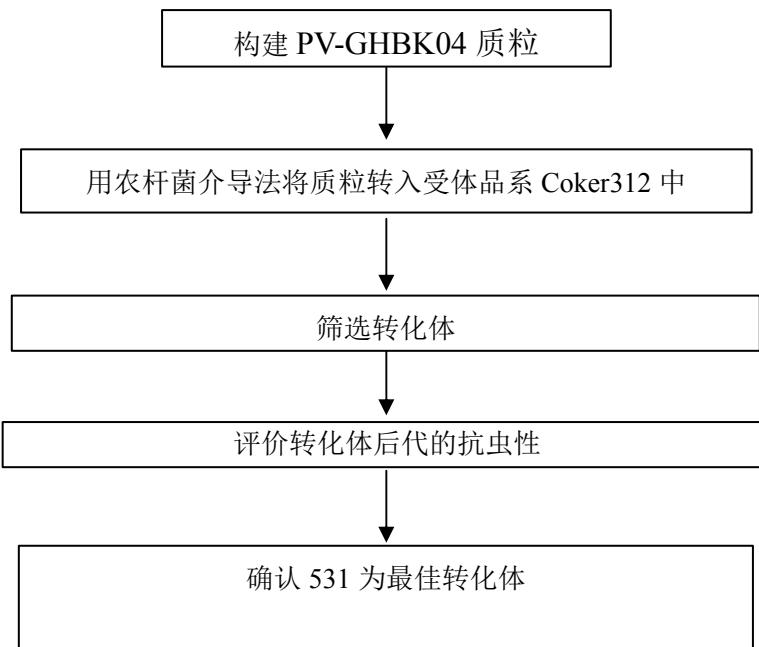
保铃棉 531 的食用安全性进行了评价。中国疾病预防与控制中心营养与食品安全所采用保铃棉 531 和非转基因对照棉籽对 Sprague-Dawley 大鼠进行了 30 天喂养试验。结果发现，在整个试验阶段，动物未出现拒食现象，生长活动正常，被毛浓密有光泽。保铃棉 531 棉籽饲喂组和非转基因对照棉籽饲喂组的体重和食物利用率也无显著性差异。血液学检测结果表明：保铃棉 531 组雄性大鼠的淋巴细胞和中性细胞较亲本组差异有显著性，但均在实验室的历史检测范围内。其他包括白细胞计数、红细胞计数、血小板计数等的指标均无显著性差异。血生化检测的结果中，保铃棉 531 组和亲本组的谷丙转氨酶、尿素氮、甘油三酯等指标都观察到显著性差异，但是都在实验室的历史检测范围之内，不认为有生物学意义。病理学检查也未见保铃棉 531 棉籽对被检脏器有任何不良影响。所以认为，保铃棉 531 棉籽对动物体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理学组织观察不会产生不利影响。此外，中国疾病预防与控制中心营养与食品安全所对保铃棉 531 棉籽的抗营养成分进行分析，发现保铃棉 531 棉籽中游离脂肪酸含量为 6.3g/kg，而亲本中为 5.83g/kg。保铃棉较亲本对照的抗营养因子含量略高，但是这些值均在自然变化范围内，无生物学意义。

二、背景介绍

孟山都公司最先于 2002 年向农业部转基因生物安全管理办公室提交了《转 *cry1Ac* 基因抗虫保铃棉 531 进口用作加工原料的安全证书》的申请，并在中国境内由农业部指定检测机构进行了食用安全检测，没发现任何安全问题。

保铃棉 531 通过表达来自苏云金杆菌的 Cry1Ac 蛋白而对鳞翅目害虫具有抗性。保铃棉 531 于 1995 年在美国获得栽培及食用/饲用批准以后，又先后在南非、阿根廷、澳大利亚/新西兰和哥伦比亚获得栽培审批。此外，保铃棉 531 还在加拿大、墨西哥、日本、韩国和欧盟获得了进口批准。

保铃棉531的选育过程：



三、受体生物学特性

棉花属于植物界(Plantae)、被子植物门(Anthophyta)、双子叶植物纲(Dicotyledonopsida)、锦葵目(Malvales)、锦葵科(Malvaceae)、棉族(Gossypieae)、棉属(*Gossypium*)，拉丁学名 *Gossypium hirsutum*。棉属中共有四个栽培种，分别是陆地棉 (*G. hirsutum*)、海岛棉 (*G. barbadense*)、亚洲棉 (*G. arboreum*) 和草棉 (*G. herbaceum*)。目前在中国种植的大多为陆地棉，在新疆维吾尔自治区有少量海岛棉种植。

棉花原产于高温、干旱、短日照的热带和亚热带的荒漠草原，其起源是多中心的。中国于 1865 年开始从美国引种陆地棉，首先在上海试种。1914 年以后，从美国大量引入陆地棉品种，至 1958 年，陆地棉品种基本取代了以前广泛栽培多年的中棉 (*G. arboreum*) 品种（见《中国农业百科全书-农作物卷》）。

棉花是唯一一种由种子生产纤维的农作物，它是世界上产量最高的植物纤维作物。棉纤维是纺织工业的主要原料；棉籽含油分、蛋白质，是食品工业的原料，也用作饲料添加剂，据文献记载，有很长的安全使用历史。棉短绒也是化学工业和国防工业的重要物资。

中国是世界主要产棉大国，植棉历史悠久，植棉地域辽阔。植棉区东起辽河流域及长江三角洲，西至塔里木盆地边缘，南至海南岛崖县，北抵马纳斯河流域，在北纬 18 度至 46 度、东经 76 度至 124 度之间。自 1982 年以来，中国已跃居世界棉花生产和消费的首位，年产皮棉 400 万吨以上。以棉花纤维为原料的棉纺织工业已成为中国重要的支柱和创汇产业。棉籽油在棉产区为主要的食用油，

脱毒棉籽饼是优质的高蛋白饲料，棉籽壳被用作生产食用菌的原料，棉短绒被用于化工和国防工业（见《中国农业百科全书-农作物卷》）。

产生保铃棉 531 的转化受体品种为 Coker312 栽培品系 (*Gossypium hirsutum* L.)，是美国 Coker Pedigree 种子有限公司所拥有的种质资源。它是一种较老的棉花品种，现在几乎已经不再种植。现在 Coker312 栽培品种主要用于转化，是因为它在转基因过程中的组织培养系统较成熟。几位研究者 (Trolinder 和 Goodin, 1987; Umbeck 等, 1987) 认为，Coker312 及相关的栽培系在遗传上具有组织培养容易的特点。

四、基因操作

对保铃棉 531 中整合的外源基因的分子生物学分析最初应用 Southern 杂交、Western 印迹和 ELISA 方法于 1994 年完成。其后随着分子生物学研究的发展，各项试验鉴定技术的灵敏度和精确性都有了很大进步，所以孟山都公司于 2001 年对保铃棉 531 的分子生物学特性进行了重新鉴定，鉴定结果表明保铃棉 531 中含有如下插入：1) 功能性插入：该插入中依次含有一个不完整的 *cryIAc* 表达盒、一个完整的 *cryIAc* 表达盒、一个 *aad* 基因编码序列、一个完整的 *npt II* 基因表达盒和来自质粒 PV-GHBK04 的 *oriV* 序列。其中不完整的 *cryIAc* 表达盒片段包含部分 *cryIAc* 基因的 3' 序列和 7S 3' 终止子，该片段与完整 *cryIAc* 表达盒中的相应序列插入方向相反。完整的 *cryIAc* 基因表达盒由 e35S 启动子、全长 *cryIAc* 基因和 7S 3' 终止子组成，能够表达 Cry1Ac 杀虫蛋白，使保铃棉 531 具有鳞翅目害虫抗性。*nptII* 基因表达盒由 35S 启动子、全长 *nptII* 基因和 NOS 3' 终止子组成，可以表达新霉素磷酸转移酶 II (NPTII)，该蛋白在产品开发初期作为选择性标记，用来选择转化体植株。插入中的 *aad* 序列包括细菌启动子和一个 3'(9)-O-氨基糖苷腺苷酰基转移酶基因 (*aad*) 序列，该基因作为选择性标记，在基因克隆过程中用于筛选大肠杆菌转化菌株。由于 *aad* 基因在细菌启动子的控制下，所以其只能在细菌中表达，而不能在植物体内表达，最初对保铃棉 531 进行的分子生物学鉴定也证实了这一点。*oriV* 序列是质粒在农杆菌中维持拷贝数所需要的复制起始位点，在保铃棉 531 中不参与基因调控。2) 非功能性插入：含有部分 7S 3'，该插入大小为 242bp，不能产生任何表达产物。

PCR 和 DNA 序列分析对保铃棉 531 功能性和非功能性插入的组成进行了分析，表明其与转化质粒的相应序列相同，此外，与插入序列相连的基因组侧翼序列为野生型棉花基因组序列。Southern 杂交分析表明，保铃棉 531 功能性插入序列和非功能性插入序列都是在单一插入位点单拷贝插入的。插入的世代稳定性分析表明，功能性插入能够稳定存在于保铃棉 531 自交后代及通过常规育种得到的商业化品种中。

五、遗传稳定性

对保铃棉 531 育种世代中的 R5 和 R6 代，以及两个 531 商业化品种利用 Southern 杂交分析，以确定插入序列的世代稳定性。结果表明：R5、56 和两个商业品种都产生了预期的功能性插入片段的杂交信号，而两个商业品种没有产生与非功能性插入杂交的信号。两个商业品种是通过常规育种途径选育的保铃棉 531 衍生品种，在育种过程中 242bp 插入序列与功能性插入序列分离，因此没有

检测到杂交信号。这些结果表明功能性插入序列在试验的 R5、R6 代和商业化品种中稳定存在。

此外，上世纪 90 年代初开始，孟山都公司和很多独立研究机构对含有保铃棉 531 转化事件的棉花品系的抗虫性和抗虫蛋白表达都进行了很多研究调查，结果表明，这些棉花品系保持了持续的良好抗虫性，且都能够稳定的表达 Cry1Ac 蛋白，进一步说明了功能性插入及其表达产物的遗传稳定性。

六、环境安全评价

生存竞争能力：棉花作为一种野生植物对环境并无多少影响力。野生种群很少，并且局限于海滨地区或小岛（Lee, 1984）。它有可能影响刚开发的土地，但很难侵扰已建立的生态系统。在中国的棉花栽培历史上，棉花演变成杂草或其他有害植物的现象还没有发现。

保铃棉 531 在美国获得商业化栽培批准前，孟山都公司于 1991-1993 年在美国多个试验点进行了田间试验，收集表型特征、杂草化倾向、对非靶标昆虫的易感性和对病害的易感性等数据。结果表明，所有观察的参数中，保铃棉 531 与常规对照都不存在有生物学意义的显著性差异。田间试验收获后对试验地自生苗的监控结果也表明，保铃棉 531 和其他商业化品种残留棉籽的存活性相当。这些数据充分说明与常规对照相比，保铃棉 531 的生存竞争能力并没有增加。

生物多样性：保铃棉 531 能够表达苏云金杆菌 Cry1Ac 蛋白，该蛋白对鳞翅目害虫具有杀伤性，而对非靶标生物无害。Cry1Ac 蛋白通过结合靶标害虫中肠的特异性受体发挥杀虫效应。含 Cry 蛋白的苏云金杆菌作物生物杀虫剂已经应用了 40 多年，大量的文献研究已经确认了苏云金杆菌及其表达蛋白对非靶标生物的安全性。保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白与广泛应用的生物杀虫剂中表达的蛋白有很高的相似性。此外，孟山都公司还用全长 Cry1Ac 蛋白和该蛋白的活性胰蛋白酶抗性核饲喂包括鳞翅目在内的 10 种不同害虫，以验证其专一性，结果表明，只有四种鳞翅目害虫对这两种形式的活性蛋白敏感。孟山都公司还研究了 Cry1Ac 蛋白对寄生蜂、蜜蜂幼虫和成虫、瓢虫、草蛉、鸟类和鱼类的潜在毒性，结果表明，Cry1Ac 对这些非靶标生物无害。此外，田间试验研究也表明，保铃棉 531 对非靶标病虫害的易感性与常规对照相当。

基因漂移：因为相似的棉花基因型是完全亲合的，所以任何传授的花粉都有可能产生杂交种子。某块生产地里的异型杂交度主要取决于这块地的地理位置（Simpson, 1954），也就是取决于作物生态环境。最重要的因素是昆虫媒体的种类和数量。熊峰(*Bombus spp.*) 和蜜蜂(*Apis mellifera*) 是最重要的 (Theis, 1953; McGregor, 1959; Moffett 和 Stith, 1972; Simpson 和 Duncan, 1956)，而前者则是最有效的传粉者。这在 Meredith 和 Bridge 的报告 (1973) 中特别提到，他们的结果表明异型杂交在美国密西西比三角洲已大为下降 (在 11 个测试地点，从 1965 年 Simpson 和 Duncan 报道的 28% 下降到平均 2%，变化范围 0.0%—5.9%)。这在许多棉花种植区是很典型的，因为在这些种植区内昆虫栖居地的丧失和杀虫剂的大量使用司空见惯。

在栽培棉花的相邻植株、行及地块间的异型杂交度方面做了大量的工作

(Afzal&Rahn, 1950a, b; Green&Jones, 1953; Thies, 1953; 其它汇总于 Brown, 1938)。Agracetus 公司 (Umbeck 等, 1992) 利用分子技术来测定由棉花缓冲的转基因棉花地块的异型杂交。此报告表明, 边界行中异型杂交发生率不超过 6%, 而随着离地块距离的加大, 各行的百分率迅速下降。

保铃棉 531 表达的 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白的安全性已经被许多法规审查机构和研究机构所确认, 即使在几率很低的情况下发生基因漂移, 也不会对环境产生任何不良影响。

七、食用安全评价

营养学评价: 孟山都公司在美国多个田间试验点收集籽粒样品, 分析棉籽中主要成分 (蛋白、脂类、水分、灰分、碳水化合物、卡路里)、脂肪酸组成和主要毒素 (棉酚、环丙烯型脂肪酸、黄曲霉毒素)。结果表明保铃棉 531 与常规对照的主要成分相当。在 11 种检测脂肪酸中, 3 种脂肪酸存在统计学差异, 但是所有存在差异的分析成分值均在发表的商业化棉花品种的范围内, 因此, 不认为具有生物学意义。保铃棉 531 与对照的棉酚和环丙烯类脂肪酸含量也不存在统计学差异。4 种主要黄曲霉毒素在保铃棉 531 及对照中均低于检测限。所以成分分析结果表明保铃棉 531 与对照的组成成分实质等同。

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所对抗营养因子检测结果为: 保铃棉 531 和亲本对照棉籽中游离脂肪酸的含量分别为 6.3g/kg 和 5.83g/kg, 虽然保铃棉较亲本对照的抗营养因子含量略高, 但是这些值均在自然变化范围内, 无生物学意义。

毒理学评价: Cry1Ac 蛋白来源于苏云金芽孢杆菌, 含有 Cry 蛋白的苏云金芽孢杆菌作为微生物杀虫剂, 已经安全使用了 40 多年。Cry1Ac 与已知的毒蛋白和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性, 在模拟胃肠液中能被迅速消化, 用极高剂量的 Cry1Ac 蛋白 (数千毫克每千克体重) 灌胃小鼠也不会出现毒性效应。NPT II 是最常用的抗生素标记, 它可以使受体具有新霉素和卡那霉素抗性。NPT II 蛋白广泛存在于大肠杆菌细胞内, 因此人类的肠道中经常可以发现这种酶 (Jefferson et al., 1986; Fuchs et al., 1993b)。NPT II 在很多商业化转基因作物产品中都有应用, 其安全性也被详细研究及评价过, NPT II 蛋白与已知的毒蛋白和其他对人类及动物有不良影响的生物活性蛋白没有相似性, 在模拟胃肠液中能被迅速消化, 用高达 5000mg/kg 体重的剂量灌胃小鼠后, 不会产生任何毒性效应。因此, Cry1Ac 和 NPT II 对人类及动物健康不会产生不良影响。此外, 人类可能摄入的棉花产品主要是棉籽油, 棉籽油中蛋白的含量非常低, 甚至可以忽略不计, 所以人类摄入保铃棉 531 中表达的外源蛋白的可能性非常低。

中国疾病预防与控制中心营养与食品安全所采用保铃棉 531 和非转基因对照棉籽对 Sprague-Dawley 大鼠进行了 30 天喂养试验。结果发现, 在整个试验阶段, 动物未出现拒食现象, 生长活动正常, 被毛浓密有光泽。保铃棉 531 棉籽饲喂组和非转基因对照棉籽饲喂组的体重和食物利用率也无显著性差异。血液学检测结果表明: 保铃棉 531 组雄性大鼠的淋巴细胞和中性细胞较亲本组差异有显著性, 但均在实验室的历史检测范围内。其他包括白细胞计数、红细胞计数、血小

板计数等的指标均无显著性差异。血生化检测的结果中，保铃棉 531 组和亲本组的谷丙转氨酶、尿素氮、甘油三酯等指标都观察到显著性差异，但是都在实验室的历史检测范围之内，不认为有生物学意义。病理学检查也未见保铃棉 531 棉籽对被检脏器有任何不良影响。所以认为，保铃棉 531 棉籽对动物体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理学组织观察不会产生不利影响。

致敏性评价：保铃棉 531 中表达的 Cry1Ac 蛋白来源于苏云金杆菌，该细菌已经作为生物杀虫剂被应用了 40 多年。Cry1Ac 的供体生物不具有致敏性。NPT II 蛋白来源于大肠杆菌 K12 菌株，大肠杆菌广泛存在于自然界中，不具有致敏性。此外，Cry1Ac 与 NPT II 蛋白与已知致敏原不存在序列相似性，在模拟胃肠道中能够被迅速消化，对热处理也不稳定。这些结果表明 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白不具有致敏性。

抗生素抗性：保铃棉 531 的插入序列中含有 *aad* 和 *npt II* 基因，由于 *aad* 基因在细菌启动子的调控下，所以在保铃棉 531 中不能被转录翻译，不能产生任何蛋白。保铃棉 531 中含有完整的 *npt II* 基因表达盒，能够产生 NPT II 蛋白，从而使转化体植株具有卡那霉素抗性。

NPT II 常被用作转化体初步筛选过程中的抗生素抗性标记，*npt II* 基因不存在安全问题。在保铃棉 531 中表达的 NPT II 蛋白，与在已被许多政府机关和科研机构证明是安全的转基因作物所表达的 NPT II 蛋白是一样的。*npt II* 基因及其表达的蛋白的安全性已经被美国 FDA 确认，并准许其在转基因作物的开发期间作为食品加工助剂添加剂使用 (FDA, 1994)。对 NPT II 蛋白的安全性也在许多研究文献上有过叙述 (Fuchs *et al.*, 1993a, 1993b; Flavell *et al.*, 1992; Nap *et al.*, 1992)。美国环保署 (EPA) 也决定免除对农产品或原材料中 NPT II 蛋白及其表达所必须的遗传物质的抗性评价要求 (40 CFR 第 180.1134)。此外，对 NPT II 蛋白的详细安全性评价也表明：NPT II 蛋白来源于广泛存在于自然界中的大肠杆菌 K12 菌株，该蛋白具有长期的安全应用历史，与已知的致敏原和毒蛋白间不存在序列相似性。用高达 5000mg/kg 体重的 NPT II 蛋白饲喂小鼠也不会出现任何毒性效应。所以 NPT II 蛋白是安全的，不会对人类健康造成不良影响。

八、非预期效应

保铃棉 531 在美国获得商业化种植审批前已经进行了大量的环境安全和食用安全性的评价研究，并未发现任何对环境和人类健康的不利影响。保铃棉 531 产生的 Cry1Ac 和 NPT II 蛋白的安全性和作用模式也被孟山都公司和许多研究机构进行过广泛研究。保铃棉 531 棉籽的组成成分与常规对照也是实质等同的，所有这些数据均支持保铃棉 531 不可能产生非预期效应的结论。自在美国首次商业化以来，保铃棉 531 也经过了全球多个独立的法规审批机构的严格审查，先后在阿根廷、澳大利亚/新西兰和哥伦比亚获得栽培审批。此外，保铃棉 531 还在加拿大、墨西哥、日本、韩国和欧盟获得了进口批准。此外，2003 年在中国境内进行的食用安全检测结果也证实了保铃棉 531 的安全性。

九、生产应用前景及拟采取的安全监控措施

棉花是全球重要的种子纤维作物。鳞翅目害虫是棉花生长期的主要害虫，

影响棉花最严重的是棉铃虫、红铃虫、烟青虫，在中国还用甜菜夜蛾、斜纹夜蛾等也造成一定程度的危害。孟山都公司开发的保龄棉 531 能表达来自苏云金杆菌 (Bt) 的 Cry1Ac 蛋白，于 1996 年开始在美国商业化，由于该产品能有效地控制鳞翅目如棉铃虫、红铃虫、烟青虫的危害，大大减少杀虫剂的使用量，与常规棉花相比不仅产量得到提高，由于减少了投入，种植棉花的收益也得到提高，因此迅速为种植者接受。据估计，仅 1998 年一年时间，比 1995 年（保龄棉商业化前一年）减少了价值 200 万英镑的杀虫剂使用 (Gianessi and Carpenter, 1999)。

孟山都公司在中国申请保铃棉 531 转基因安全证书的目的是进口用作加工原料。作为加工原料的保铃棉 531 产品为棉纤维、籽粒及其相应的加工产品。除籽粒外，其他均为没有生命活力的产品。作为保铃棉 531 的研发商，取得安全证书后，孟山都公司会要求贸易商采取措施，严格遵守相关法律法规，包装运输要可靠，标识要清楚，运输各环节严格操作，必要时向贸易商提供技术指导和支持，以保证保铃棉 531 的贸易符合农业部颁发的安全证书的要求。

十、结论

大量的研究结果表明，保铃棉 531 对人类健康和环境安全没有负面影响，与受体和常规棉花品种同样安全。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况;

棉花是重要的经济作物和纤维作物，近年来由于气候条件和生态环境的变化、害虫抗药性的增强，以棉铃虫为主的棉花害虫为害一度十分猖獗。据统计，目前棉铃虫对菊脂类农药的抗性比 1980 年已增加几百倍，因而造成了棉铃虫防治的更加困难。而且目前我国棉铃虫的为害面积还在不断扩大，为害程度还在不断加重，造成不少地区棉花大面积减产或绝产，严重挫伤了农民的植棉积极性，使我国的棉花生产长期处于低谷状态，因而可以说棉铃虫已成为制约我国棉花生产及其相关产业(如纺织业、出口创汇业、农业可持续发展等)的一个重要因子。

除中国外，世界上其它植棉大国，如美国、澳大利亚等也都面临着棉花害虫日益为害严重的局面，因而世界各国都十分重视探讨新的害虫管理措施，其中利用基因工程手段培育抗虫棉品种是当今棉花害虫管理最经济最有效的方法。它不仅能使棉花自身产生抗(或杀死)害虫的物质，提高自身防御机制，而且能减少化学农药的使用，减少环境污染和农药残留，简化劳动操作和降低植棉成本，从而可提高棉农的植棉积极性，有利于棉花生产及有关行业如纺织业等的发展。因而世界各国都十分重视将外源抗虫基因导入棉花的研究、开发与利用，并取得了显著的进展，培育出了一大批高抗棉铃虫、红铃虫等棉花害虫的转基因抗虫棉，并已在生产上大面积推广使用，对棉花害虫尤其是棉铃虫的有效防治立下了汗马功劳。

孟山都公司开发的抗虫保铃棉目前已经在包括美国、澳大利亚/新西兰、阿根廷和哥伦比亚在内的多个国家被批准商业化种植，此外，日本、韩国、加拿大、墨西哥和欧盟也批准了抗虫保铃棉的进口。

1991 年，“转基因抗虫棉研制”项目获国家高技术研究发展计划(“863”计划)立项资助。在“863”计划资助下，我国开始了 Bt *cry1A* 杀虫基因的全合成。1992 年底，中国农科院生物技术研究所在国内首先合成了 Cry1A 杀虫晶体蛋白的结构基因 GFM *cry1A(cry1A (b)、cry1A (c))*，1993 年将 GFM *cry1A* 基因导入棉花，1994 年得到高抗虫能力的转基因棉花植株。1998 年，其核心技术“编码杀虫蛋白酶融合基因和表达载体及其应用”获国家技术发明专利。迄今，中国农科院生物技术研究所已成功地研制出 Bt 基因和 CpTI(豇豆胰蛋白酶抑制剂)的双价抗虫基因、含 GNA 的抗蚜基因以及抗真菌病的抗病基因第一系列棉花抗虫、抗病基因。现已成功地将改造后的 Bt 基因导入我国自育品种晋棉 7 号、中棉所 12 号、泗棉 2 号等中。与此同时，山西棉花所还将中国农科学院生物技术研究中心提供的 CpTI 基因导入了我过自育品种并且还获得了转双基因的多抗虫基因工程棉花。

10. 田间监控方案，包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等；

本申请书为获得保铃棉 531 进口用作加工原料的安全证书，不会在中国境内种植。

如果能够获得保铃棉 531 的进口安全证书，孟山都公司会按照相关的法律法规和农业部批准的安全证书上的要求严格使用和管理安全证书，并明确要求贸易商清楚了解批准的安全证书应用范围和有效期，要求贸易商在有效期内向孟山都公司申请保铃棉 531 进口安全证书的复印件。孟山都公司对贸易商在安全证书使用上的要求将包括：

- 1、要求贸易商必须持有相应转化事件的进口安全证书才能进口含有相应转化事件的商品。
- 2、孟山都公司提供的安全证书复印件只供申请的贸易商自用或其拥有或控制的子公司使用。
- 3、贸易商必须同意只按照安全证书的批准范围使用安全证书，不得将其复印件提供给任何第三方。
- 4、贸易商在使用安全证书进行交易时必须严格遵守相关的法律和法规。
- 5、所提供的安全证书只允许作为加工原料用于食用及饲用的原料的进口，不支持作为遗传研究或种植的材料进口。贸易商必须同意采取必要合理的安全控制手段，以保证进口原料不会被释放到环境中或者被用于可能对生物多样性、可持续利用或人类健康存在潜在风险的用途。
- 6、如果贸易商没有按照规定使用安全证书，孟山都公司保留收回安全证书使用权的权力。

除了在安全证书使用上对贸易商提出明确要求外，孟山都公司还会详细记录并保存所有申请过安全证书复印件的贸易商信息，包括公司名称、地址、联系人、联系电话和电子邮箱地址，以便更好的对使用孟山都公司安全证书的贸易商进行监督。此外，孟山都公司还会就包装/标识和运输环节，对从事转基因产品贸易的贸易商提出要求，并不定期的回访贸易商，对进口产品进行监督，如发现任何违规操作或意外事件发生，立即向当地的农业行政主管部门和农业部报告。在必要时，孟山都公司也会向贸易商提供技术指导和支持。

孟山都公司就包装/标识和运输环节对从事转基因产品贸易的贸易商提出的具体要求如下：

- 1. 遵守相关法律法规：**在保铃棉 531 向中国进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中的要求和条件。
- 2. 包装和标识：**包装要牢固，标识要清楚。要与其它相似的非转基因产品明显区分开。
- 3. 运输环节：**
 - 1) 产地国内陆运输：要求使用专门的运输工具用以装载转基因产品。对运输工具在使用前将进行充分地清洗，以避免其它转基因生物的污染。

2) 出口终端：对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其它转基因生物的污染。在确认其出口装船之前，将接受出口国相关部门的检验。

3) 装船：船只到达装货港之前进行清仓，对船仓和船上各作业区进行彻底地清洗，请专门机构进行监督和检查，并出具船只清洁、安全、并适用于装载的证书。装货过程中会有独立的检测机构负责监装，以确保装货过程在独立和公正的检测下完成。

4) 海运：在海运的全程中我们将确保舱盖密闭，我们将要求船方定期对仓内货物进行检查，并规定船方不得随意靠港，特别是可能存在疫情的港口。

卸货：当船只到达中国口岸时，要求中国进口商严格执行中国农业部所制定的转基因安全管理条例，避免在港口卸货和中转中，有转基因产品流入农业生产领域，确保中国的农业生物安全。将督促国内收货人，对其用于进口转基因产品的包装物和运输工具进行必要的清洗和标识。将要求国内收货人和中国有关港务部门，将进口转基因产品与在港的其它农产品分开存放，以确保不发生可能的污染。

11. 审查所需的其它相关资料

对保铃棉 531 在国外和中国境内进行了大量的安全性评价研究，包括全面的分子生物学特性、新引进蛋白的生化特性、环境安全性评价以及食用安全性评价研究，所有研究表明：保铃棉 531 对人类、动植物和生态环境不会产生不利影响。为保持申请书的完整性和便于审阅，所有技术报告附在申请书正文之后。

12. 转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件（境内单位申请安全证书的，本项不填写）

保铃棉 531 在 1995 年获得美国食品药物管理局(FDA)、美国农业部(USDA)、美国环保署 (EPA) 批准后在美国商业化。

1. 美国食品与药品管理局批件

人类健康服务部

大众健康服务

食品与药品管理局
华盛顿特区20204

W.Martin Strauss 博士
农业法规主管
孟山都公司
Suite 1100
700 14th Street, NW
Washington,DC 20005

尊敬的Strauss 博士:

就贵公司向食品与药品管理局(FDA)提请咨询的基因改造抗鳞翅目害虫(包括棉铃虫、烟叶夜蛾和红铃虫)的保铃棉品系531, 757 和1076,现予以回复。这些新的棉花品系通过表达来自苏云金杆菌亚种*kurstaki*的杀虫蛋白而获得对鳞翅目昆虫的抗性。

为了使你们就这些产品向食品与药物管理局所作的咨询有一定论，你们于1994年11月提交了一份新棉花品系531的安全及营养评估摘要。1995年2月27日，你们又就这一申请的支持数据做了详细的口头陈述，并提交了新棉花品系757和1076的安全及营养评估摘要。我们认为孟山都所做的这些努力是为了告知食品与药物管理局，你们已采取了适当的步骤，确保这些产品符合食品与药物管理局相关法律法规的要求。而且基于你们已经进行的安全及营养评估，我们同意你们的结论，即这些新的棉花品种与目前市场上存在的品种在成分、安全性及其他方面是实质等同的，因此这些棉花品系并不需要FDA做出上市前的审查或批准。所有与此咨询相关的资料均汇集入编号为BNF0013的文件，并由上市前审批办公室保管。

基于咨询期间提交的数据和信息描述,新的棉花品系在21 CER170.30 (f) (2)的含义范围内不存在显著性改变。关于这些产品我们目前没有其他问题。但是，你公司有责任确保销售的食品是安全的、完整的，并且合乎相关法律法规的要求。

您诚挚的

Alan Rillis博士

代理主任

上市前审批办公室
食品安全及应用营养中心



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

Public Health Service

JUN 1 1995

Food and Drug Administration
Washington DC 2020494-222
95-070

• Dr. W. Martin Strauss
Agricultural Regulation Director
Monsanto Company
Suite 1100
700 14th Street, NW
Washington, DC 20005

Dear Dr. Strauss:

This is in regard to your consultation with FDA on your Bollgard™ Cotton lines 531, 757, and 1076 which are genetically modified to be resistant to certain lepidopteran pests including: cotton bollworm, tobacco budworm, and pink bollworm. The new cotton varieties have been rendered resistant to these lepidopteran pests by expression of a pesticidal protein (*B.t.k.* protein, product of the *cry1A(c)* gene) from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*.

As part of bringing your consultation with FDA regarding these products to closure, you submitted a summary of your safety and nutritional assessment of new cotton line 531 on November 21, 1994. On February 27, 1995, you also made a detailed oral presentation of the data that supported this submission and submitted a summary of your safety and nutritional assessment of new cotton lines 757 and 1076. It is our understanding that these communications were intended by Monsanto to inform FDA of the steps taken to ensure that these products comply with those legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Further, based on the safety and nutritional assessment you have conducted, it is our understanding that you have concluded that these new cotton varieties are not materially different in composition, safety, or any other relevant parameter from cotton varieties currently on the market and that they do not raise issues that would require premarket review or approval by FDA. All materials relevant to this consultation have been placed in a file that has been designated BNF 0013 and that will be maintained in the Office of Premarket Approval.

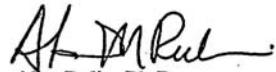


AA026248

Page 2 - Dr. W. Martin Strauss

Based on the description of the data and information presented during the consultation, the new cotton varieties do not appear to be significantly altered within the meaning of 21 CFR 170.30(f)(2). We have no additional questions concerning these products at this time. However, as you are aware, it is Monsanto's continued responsibility to ensure that foods the firm markets are safe, wholesome and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely yours,



Alan Rulis, Ph.D.
Acting Director
Office of Premarket Approval
Center for Food Safety
and Applied Nutrition

2. 美国农业部动植物健康监督局批件

美国农业部动植物健康监督局就孟山都公司寻求抗鳞翅目害虫棉花品系 531、757 和 1076 的非监管状态的申请 94-308-01p 的决定。

环境评估与
未发现显著性影响报告

1995 年 6 月

美国农业部（USDA）动植物健康监督局（APHIS）在确定由孟山都公司开发的抗虫棉品系531、757和1076 不再受7CFR340的监管前准备了一份环境评估，此环境评估决定“抗虫棉品系531、757 和1076或其后代将不再属于受监管产品”，并从该决定中得出“未发现显著性影响报告”。

John H.Payne, 博士
代理处长
生物技术、生物制品及环境保护处
美国农业部动植物健康监督局
日期：1995 年6 月22 日

关键词：棉花；抗虫；苏云金杆菌；cryIA (C)；δ -内毒素蛋白；标记基因；npt II；新霉素磷酸转移酶；卡那霉素抗性



USDA/APHIS Determination on a Petition 94-308-01p of Monsanto
Agricultural Company Seeking Nonregulated Status of Lepidopteran-
Resistant Cotton Lines 531, 757, 1076

Environmental Assessment And
Finding of No Significant Impact

June 1995

The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), United States Department of Agriculture (USDA) has prepared an environmental assessment prior to the determination that lepidopteran-resistant cotton lines 531, 757, and 1076 developed by Monsanto Corporation are no longer deemed regulated articles under 7 CFR 340. This environmental assessment has reached a finding of no significant impact to the environment from its determination that lepidopteran-resistant cotton lines 531, 757, and 1076 or their progeny shall no longer be regulated articles.



AA055338

John H. Payne

John H. Payne, Ph.D.

Acting Director

Biotechnology, Biologics, and Environmental Protection

Animal and Plant Health Inspection Service

United States Department of Agriculture

Date: JUN 22 1995

Key Words: cotton; insect resistance; *Bacillus thuringiensis*; *cryIA(c)*; delta-endotoxin protein; marker gene; *nptII*; neomycin phosphotransferase; kanamycin resistance.

3. 美国环保署批件

美国环保署 (EPA) 杀虫剂项目办公室 注册处 (H7505C) 401 "M" St., S.W. Washington, DC. 20460	EPA 登记号: 524-478	签发日期: 1995 年 3 月 21 日
	签发类别: 无限制 农药产品名称: 棉花中表达的素云金杆菌 <i>kurstaki</i> 亚种 (B.t.k) 杀虫蛋白	
农药登记公告 <input checked="" type="checkbox"/> <u>登记</u> <u>续登记</u>		
登记者名称 (包括邮政编码) 孟山都公司 700 Chesterfield Parkway North St. Louis, Missouri 63198		
注意: 与本登记有关的任何标签内容的改变必须提出申请, 经生物农药和污染防治处批准后方可商业化应用, 任何与本登记有关内容请查阅上述环保局登记号。		
在申请者提供信息的基础上, 依据《联邦杀虫剂、杀菌剂、灭鼠剂法案》, 上述农药产品获得登记/续登记。		
产品获得登记在任何情况下都不能解释为是环保局对该产品的认可或推荐。为了保护健康和环境, 管理机构可以在任何时候按照法案延缓或取消农药产品的登记。环保局依据法案接受与一个登记产品有关的任何名称不能解释为登记者获得专用该名称或在该名称已被其他登记者涵盖的情况下使用该名称的权利。		
本登记并不意味取消对该杀虫剂进行不断重新评估的需要。如果环保署在任何时候决定有需要提供额外数据来维持现有登记, 会依据 FIFRA 3(c)(2)(B)要求申请者提交这些数据。		
上述产品的登记申请已按照《联邦杀虫剂、杀菌剂、灭鼠剂修改法案》第 3(C)7(C)款提交, 在下述条款和条件下被接受:		
1. EPA 注册号为 EPA Reg. No. 524-478		
批准者签名	日期 1995 年 3 月 21 日	

PM 90 524-478

Page 195

	U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Office of Pesticide Programs Registration Division (H7505C) 401 "M" St., S.W. Washington, D.C. 20460	
NOTICE OF PESTICIDE: <input checked="" type="checkbox"/> Registration <input type="checkbox"/> Reregistration		EPA Reg. Number: 524-478 Date of Issuance: 3/21/95
(under FIFRA, as amended)		
Name and Address of Registrant (include ZIP Code): Monsanto Company 700 Chesterfield Parkway North Saint Louis, Missouri 63198		
Note: Changes in labeling differing in substance from that accepted in connection with this registration must be submitted to and accepted by the Registration Division prior to use of the label in commerce. In any correspondence on this product always refer to the above EPA registration number.		
On the basis of information furnished by the registrant, the above named pesticide is hereby registered/reregistered under the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act.		
Registration is in no way to be construed as an endorsement or recommendation of this product by the Agency. In order to protect health and the environment, the Administrator, on his motion, may at any time suspend or cancel the registration of a pesticide in accordance with the Act. The acceptance of any name in connection with the registration of a product under this Act is not to be construed as giving the registrant a right to exclusive use of the name or to its use if it has been covered by others.		
This registration does not eliminate the need for continual reassessment of the pesticide. If EPA determines at any time, that additional data are required to maintain in effect an existing registration, the Agency will require submission of such data under sec. 3(c)(2)(B) of FIFRA.		
This product is registered in accordance with FIFRA sec. 3(c)(5), subject to the following terms and conditions:		
1. The EPA Registration Number shall read, "EPA Reg. No. 524-478".		
Signature of Approving Official: See page 2		Date: 3/21/95
EPA Form 8570-6		

BEST AVAILABLE COPY

13. 输出国家或地区经过科学试验证明对人类、动植物和生态环境无害的资料（境内单位申请安全证书的，本项不填写）

针对保铃棉 531 的安全性，孟山都公司根据法规要求做了详细的分子特征、蛋白特性、食用/饲用安全及环境安全评估，除中国境内 30 天大鼠喂养实验报告外，孟山都公司在中国提交法规申请前得到的安全性评价技术资料如下：

编号	题目
报告 1	Bollgard 棉花转化事件 531 的进一步分子学特性分析(孟山都公司研究报告：MSL16882)
报告 2	1992 年抗虫棉花田间试验采集的幼叶和种子组织中特异蛋白表达水平评估(孟山都公司研究报告：MSL13275)
报告 3	抗虫棉田间试验中收获的棉花品系 757、1076、531 和 C312 棉籽质量和组成成分分析(孟山都公司研究报告：MSL14055)
报告 4	1998 和 1999 年田间试验中 MON531 抗虫棉农艺性状和表型特性数据的统计学分析(孟山都公司研究报告：RAR-09-439)
报告 5	大肠杆菌和抗虫棉来源 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白等同性评价及抗虫棉表达的 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白特性鉴定(孟山都公司研究报告：MSL13170)
报告 6	利用毒蛋白和公共序列数据库对 Cry1Ac 蛋白进行生物信息学分析(孟山都公司研究报告：MSL-18204)
报告 7	苏云金芽孢杆菌库斯亚克变种 HD-73 蛋白离体消化特征的评价(孟山都公司研究报告：MSL13299)
报告 8	新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 蛋白的安全性评价(孟山都公司发表文献，1993)
报告 9	苏云金芽孢杆菌库斯塔克变种[Cry IA(c)] HD-73 蛋白对小鼠的急性口服毒性研究(孟山都公司研究报告：MSL12708)
报告 10	新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 对小鼠的急性经口毒性研究(孟山都公司研究报告：MSL11940)
报告 11	抗虫保铃棉 531 在 1991、1992 和 1993 年抗虫效果试验总结(孟山都公司研究报告：RAR-2012-0612)
报告 12	抗虫保铃棉 531 对非靶标生物影响的研究 12-1、纯化 <i>B.t.k.</i> 蛋白对蜜蜂成虫的摄食影响评价(孟山都公司研究报告：CAR 181-92) 12-2、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白对寄生膜翅目丽蝇蛹集金小蜂 (<i>Nasonia vitripennis</i>) 食物毒性研究(孟山都公司研究报告：WL-93-234) 12-3、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白对瓢虫 (<i>Hippodamia convergens</i>) 的食物毒性研究(孟山都公司研究报告：WL-93-232) 12-4、 <i>B.t.k.</i> HD-73 蛋白：对草蛉 (<i>Chrysopa carnea</i>) 的毒性研究(孟山都公司研究报告：WL-93-233) 12-5、棉籽粕对北方山齿鹑的膳食毒性研究(孟山都公司研究报告：WL-93-13)

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

抗虫保铃棉 531 已经在许多国家进行过安全性评价，获得了大量安全评价资料，所有这些资料均表明抗虫保铃棉 531 不会对人类健康和生态环境造成危害。抗虫保铃棉 531 在美国商业化应用已将近 10 年的时间，未发现对人类健康和环境安全存在任何不利影响。

综上所述，我们同意在中国申请抗虫保铃棉 531 的进口安全证书。

小组组长（签章）：

2004 年 1 月 20 日

八、本单位审查意见

孟山都公司利用现代生物技术开发了保铃棉 531。它可以产生 Cry1Ac 蛋白，该蛋白来于自然界存在的苏云金土壤杆菌。保铃棉 531 可以有效的控制包括棉铃虫在内的靶标鳞翅目害虫。作为害虫治理体系的一部分，保铃棉 531 可提供多方面的效益和好处。

种植保铃棉 531 有很多好处，包括提供可靠的防治棉花主要害虫的工具，在控制目标害虫的同时对有益昆虫无影响，并因此可以大量减少化学杀虫剂的使用，从而避免农药对喷施者的危害。

根据中国相关法律法规的要求，同意上报本申请书，申请保铃棉 531 进口用作加工原料的安全证书。

单位公章

负责人（签章）

2004 年 1 月 20 日

九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见

（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）