

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 *cry1Ab* 基因的抗虫玉米 Bt11 进口用作加工原料

申请单位：先正达农作物保护股份公司

申 请 人：

地 址：

邮政编码：

电 话：

传 真：

e-mail：

填报日期：2012 年 6 月 26 日

中华人民共和国农业部制

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办法》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。

8. 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。

9. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。

10. 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。

11. 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

一、申请表	1
二、项目内容摘要	3
三、工作目的和意义	5
四、国内外研究的相关背景资料	6
五、转基因植物的安全性评价	10
六、相关附件资料	49
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见	108
八、本单位审查意见	109
九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见	110

相关技术报告目录

（详细技术报告为商业保密资料）

1. Bt11 玉米特异性定性 PCR 检测
2. Bt11 玉米特异性定量 PCR 检测
3. Bt11 玉米的 Southern 杂交检测
4. Bt11 玉米 T-DNA 插入位点旁侧序列的 BLASTX 分析
5. Bt11 玉米外源插入片段的全长 DNA 序列（含旁侧序列）
6. Bt11 玉米中的 Cry1Ab 和 PAT 蛋白在转基因玉米组织和整株植物中的定量研究
7. Cry1Ab 蛋白的小鼠急性口服毒性试验
8. PAT 蛋白的小鼠急性口服毒性试验
9. Cry1Ab 蛋白在模拟哺乳动物胃液环境下的体外消化情况分析
10. PAT 蛋白在模拟哺乳动物胃液环境下的体外消化情况分析
11. Cry1Ab 蛋白与已知或假定毒素蛋白的氨基酸序列同源性评估
12. PAT 蛋白与已知或假定毒素蛋白的氨基酸序列同源性评估
13. Cry1Ab 蛋白与已知或假定过敏原蛋白的氨基酸序列同源性评估
14. PAT 蛋白与已知或假定过敏原蛋白的氨基酸序列同源性评估
15. Bt11 玉米的田间农艺性状调查
16. Bt11 玉米成分分析
17. 国内检测机构出具的环境安全检测报告
18. 国内检测机构出具的食用安全检测报告

资料保密说明及其确定保密性（CBI）的依据

本申请书中标有“CBI”的资料为保密商业资料（Confidential Business Information），应该受到保护以避免泄漏出去。如下所述，保密商业资料包含了有价值的贸易机密和需要保密的商业资料。一旦泄漏出去，会对先正达在同行业的竞争中造成实质性的危害。因此，这类保密商业资料根据相关法律，应予以保护以避免泄密。

保密商业资料的特点

保密商业资料包括先正达公司在商业化开发 Bt11 转基因玉米的过程中所获得的研究成果和数据。这些数据是由先正达公司历经多年，投入数百万美元，经过大量深入的研究、测试和分析获得的。这些数据除了提供产品的毒理学特征、化学特征和环境安全方面的信息外，还包含了最基本的产品特征信息和关键的遗传序列信息。此外，这些数据还包括了为获得转基因玉米产品商业化批准而开展的相关安全评价研究必不可少的数据与研究思路。

主要 CBI 在本申请中的分布：

本申请书中的商业保密资料主要在第五章和第六章安全评价资料，但不仅限于此，同时也散见其他相关章节。

关于参考文献版权的声明

The following statement applies to all publications apart from [*refer to publications not covered by the CCC license by nb or author*]:

This Electronic Copy of Copyrighted Material Was Made and Delivered to the Government Under License from CopyRight Clearance Center (CCC), Inc. - No further Reproduction is Permitted.

The other publications must not be reproduced either, with the exception of publications [*refer to publications by nb or author*] which are Open Access Articles distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>)

以下申明针对所有的出版文献，但不包括不在 CCC 许可范围内的文献：

该电子版本的受版权保护的材料是按照（美国）版权税计算中心（非盈利组织）的条款制作并递呈给政府。不得复制。

其他的文献也不能复制，除了按照《创作共享署名授权协议》的条款进行发布的公开获得文章。

一、申请表

农业转基因生物安全证书申请表

项目概况	项目名称		转 <i>cry1Ab</i> 基因抗虫玉米 Bt11 进口用作加工原料									
	项目来源		先正达农作物保护股份公司									
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 <input checked="" type="checkbox"/>)									
	转基因生物名称			Bt11 玉米								
	受体生物	中文名	玉米			学名	<i>Zea mays</i> L.					
		分类学地位	禾本科、玉蜀黍属、玉米种	品种(品系)名称	H8540		安全等级	I				
	目的基因 1	名称	<i>cry1Ab</i> 基因			供体生物	苏云金杆菌 <i>kurstaki</i> 亚种的 HD-1 菌株					
		生物学功能	编码对鳞翅目害虫(玉米螟等)具有抗性的蛋白									
		启动子	35S 启动子-1			终止子	Nos 终止子					
	载体 1	pZO1502				供体生物	大肠杆菌					
	* 标记基因 1	名称	<i>pat</i>			供体生物	链霉菌					
		启动子	35S 启动子-2			终止子	Nos 终止子					
	* 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	IVS2-ADH1			来源	玉米					
		功能	加强蛋白表达									
	调控序列 2	名称	IVS6-ADH1			来源	玉米					
		功能	加强蛋白表达									
	转基因方法	PEG 介导转化方法				基因操作类型			2			
	转基因生物品系(株系)名称		无				转基因生物品系(株系)个数			无		
	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		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			3 年			
申请单位概况	单位名称				地 址	
	邮 编				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	
研制单位概况	单位名称		Syngenta Biotechnology Inc.		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

Bt11 玉米是利用 PEG 介导转化方法把 *cry1Ab* 基因导入栽培玉米得到的一类抗虫转基因玉米。*cry1Ab* 基因编码的蛋白对欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)、西非大螟 (*Sesamia nonagrioides*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 等鳞翅目昆虫有毒杀作用,使 Bt11 转基因玉米对玉米靶标害虫具有抗虫性能。除了抗虫性之外, Bt11 玉米还表达由 *pat* 基因编码的草铵膦乙酰转移酶 (PAT 蛋白),能抗草铵膦类除草剂。这类除草剂被用来控制出苗后玉米田间杂草。

在分子生物特性方面, Southern 杂交分析证明, Bt11 玉米中的 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因分别以单拷贝形式插入玉米基因组并能够在玉米中多代稳定遗传。对 Bt11 玉米插入基因相邻的玉米基因组序列进行 BLASTX 分析表明,插入基因没有干扰任何已知的内源玉米基因。ELISA 检测了 Bt11 玉米表达的 Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白含量在植株的不同组织器官中的表达情况,结果表明 Cry1Ab 蛋白表达量在叶片中含量最高,叶片、苞叶和茎秆中 Cry1Ab 蛋白的比浓度 (ng Cry1Ab 蛋白/mg 总蛋白) 相近,但籽粒中显著降低。PAT 蛋白测定结果表明,叶片和雄穗样品中的 PAT 蛋白水平较高,花丝中也能检测出 PAT 蛋白,但在根、花粉和籽粒中的 PAT 蛋白低于 LOD 值。

在美国和加拿大多个试验点的农艺性状检测数据显示,在籽粒产量、籽粒含水量、根倒伏率、穗位高、株高等参数上 Bt11 玉米均与对照无显著差异。证明了导入 *cry1Ab* 基因并未对受体固有的农艺性状造成重大影响。同时国内检测机构对 Bt11 玉米进行的环境评价也表明, Bt11 玉米在生存竞争力上与对照玉米没有显著差异。在荒地条件下进行撒播或者深播, Bt11 玉米的出苗率、杂草覆盖度、自生苗等均与普通玉米一样。在对生物多样性影响评价中, Bt11 玉米对田间主要靶标害虫玉米螟较对照和当地品种有很好的控制作用。对非靶标生物影响的研究中,整个玉米生育期,在捕食性天敌 (包括瓢虫类、小花蝽类、蜘蛛类),寄生性天敌 (以小蜂、茧蜂为主) 和主要优势种害虫 (蚜虫、叶甲和叶螨) 等昆虫种群优势度上, Bt11 玉米田与普通玉米田均无显著差异。在物种生态优势度、天敌总量、捕食性天敌的种群动态上, Bt11 玉米田与对照玉米田没有显著差异。因此 Bt11 玉米仅对靶标生物表现出抗性,而对非靶标生物没有不利影响。

对 Bt11 玉米的蛋白、脂肪、纤维、能量、碳水化合物、氨基酸、脂肪酸等营养成分分析表明,在总蛋白水平和氨基酸水平上, Bt11 玉米与亲本非转基因玉米没有生物学的显著差别;在碳水化合物、灰分、粗纤维、水分、矿质营养等方面,差异也不显著。在抗营养因子方面, Bt11 玉米与对照在植酸和胰蛋白酶抑制剂上无显著差异,这与国内检测机构对 Bt11 玉米的检测结论相同。

在毒理学评价上, Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白在哺乳动物模拟胃液消化 (SGF) 下均很敏感,容易被降解。小鼠的急性口服毒性试验结果表明, Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白对小鼠未产生任何不良反应。国内检测机构进行的 90 天大鼠喂养试验结果表明, Bt11 玉米对大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响,主要脏器亦未出现特异性病理改变, 90 天喂养试验结果为阴性。通过生物信息学比对, Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白没有发现任何与已知或假定毒素或过敏原的氨基酸序列有同源性。

事实证明 Bt11 玉米已商业化多年,到目前还没有任何证据表明 Bt11 玉米对生

态环境和人类健康产生了不利影响，更进一步佐证了在基因安全评价过程中取得的相关安全性评价结果。

转 *cry1Ab* 基因抗虫 Bt11 玉米在 1996 年获得美国批准后，之后陆续获得包括加拿大在内的 20 个国家或地区的批准。在中国，先正达公司于 2004 年 4 月首次获得农业部颁发的 Bt11 玉米用作进口加工原料的安全证书，后续又进行了多次续申请沿用至今。

三、工作目的和意义

玉米 (*Zea mays* L.) 是世界上种植最广泛的农作物之一。大约 30% 的玉米被直接食用, 70% 作为饲料。玉米也是我国的一种重要粮食作物。近年来随着经济实力与生活水平的提高, 我国对食品 (主要是各种农产品) 的数量、种类与质量上的需求, 在迅速提高, 人们的膳食结构有了明显的改变: 对蛋白质类食品, 主要是猪肉、禽肉, 以及牛羊肉与水产品, 还有禽蛋、牛奶、植物油、水果和蔬菜的消费量每年均在增加因而玉米等谷物作为饲料或工业加工原料的需求在不断增长。但是在需求大幅增加的同时, 近年来玉米等粮食作物的生产面临着耕地与水资源匮乏等带来的困扰, 客观存在着如何满足食品需求、保障供给的巨大压力。

玉米螟是世界范围内对玉米生产构成严重危害的害虫。欧洲玉米螟可导致玉米减产 5-20%。在我国, 由于亚洲玉米螟的侵害, 可使春玉米和夏玉米减产 10-20%, 甚至更高。导入 *cry1Ab* 基因的转基因玉米, 如 Bt11 玉米对亚洲玉米螟和欧洲玉米螟都有很好的抗性, 可以保护玉米植株免受玉米螟的危害。这类抗虫玉米在国外的种植与迅速推广, 表明其抗虫效果与应用上的便利性优于施用杀虫剂。Bt11 玉米还导入了一个 *pat* 基因, 可以耐受草铵膦除草剂。

本申请所涉及的 Bt11 玉米已在多个国家商业化, 其抗鳞翅目害虫的特性能有效减少杀虫剂的使用, 降低农药残留, 为玉米产业带来更多的经济效益。在产品研发进程中以及为满足相关国家法规要求所进行的种种研究与检测表明, 转基因玉米 Bt11 玉米是安全的, 可以用作加工原料, 制作食品、饲料, 或应用于其它用途。

四、国内外研究的相关背景资料

4.1 简介全球转基因植物商业化的情况

自 1996 年转基因植物商业化以来，转基因作物的种植率快速增长。2011 年是转基因作物商业化的第一个十六年。十六年来，转基因作物的全球种植面积不断攀升，2011 年达到 1.6 亿公顷，较 2010 年新增 1200 万公顷，较 2010 年增长率为 8%，是 1996 年的 94 倍（引自 ISAAA 网站，下同）。据统计，截至 2011 年，全球共有 29 个国家(19 个发展中国家，10 个发达国家)批准转基因作物商业化（包括食用、饲用及生产应用）。

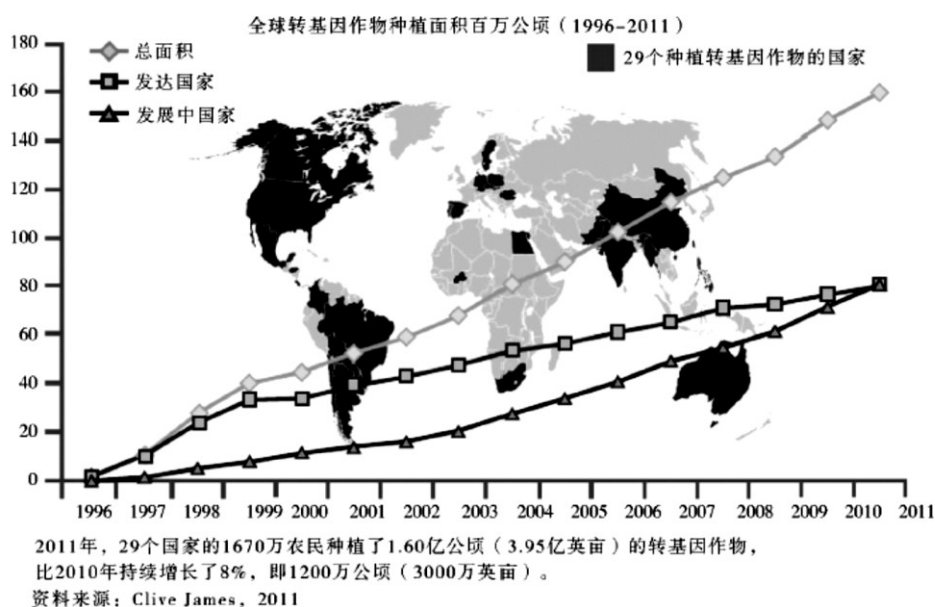


图 1 1996-2011 年全球转基因作物种植面积（单位：百万公顷）

2011年，发展中国家对转基因植物的需求很强。拉丁美洲的巴西和阿根廷，亚洲的中国和印度，非洲的南非国家，需求最为旺盛。他们的人口总数占到了全球人口的40%。2011年发展中国家的转基因种植率增长了11%，面积增加820万公顷，是发达国家增长率的两倍（5%，380万公顷）。2011年，发展中国家的转基因种植面积占全球种植面积的50%，预计在2012年超过发达国家。全球大约90%的农民属于发展中国家的小型农户，转基因作物带来的更高收入，有助于减缓他们的贫困（ISAAA）。

2011年，在全球范围内，转基因产品的商业化进程中都取得了卓越的成就。美国仍然是全球生产转基因作物的第一大国，种植面积达6900万公顷，主要转基因作物平均种植率达到90%。巴西的转基因种植面积位于第二位，达3030万公顷。连续三年，以全球最高的种植面积年增长率20%（490万公顷），持续增长。巴西现在已成为全球种植转基因作物的增长引擎。印度种植转基因棉花已有十年的历史，棉花已成为产量最好且盈利能力最强的作物。2011年，印度的棉花种植面积达到1060万公顷。中国的转基因棉花种植面积占总转基因作物面积的71.5%，达390万公顷。主要是由中国约700万的中小农户平均每户种植0.5公顷组成。菲律宾转基因玉米种植

面积增长了20%，超过60万公顷。非洲转基因种植面积达250万公顷，在田间试验的规范化流程中不断取得进步，这些规范化流程将应用于新增的转基因作物（ISAAA）。

发展种植复合性状的转基因作物是一个非常重要的未来发展趋势。2011年12个国家（其中9个为发展中国家）种植了复合性状的转基因作物，达4220万公顷，超过总种植面积的1/4。比2010年增长了22%（ISAAA）。

转基因作物对食品安全，可持续发展和应对气候变化等作出了巨大的贡献。自1996年至2010年，粮食增产增加了784亿美元，减少杀虫剂使用量4.43亿公斤。单单2010一年，就减少了190亿公斤CO₂排放量，相当于900万辆汽车的排放量。通过转基因作物的使用保护了9.1亿公顷土地的生物多样性。2011年，全球的转基因种子价值130亿美元，生产的粮食价值1600亿美元，帮助了1.5亿小型农户农民解决了贫困问题（ISAAA）。

转基因大豆仍然是最主要的转基因作物，占据全球转基因作物种植面积的 47%（7540 万公顷），其次是转基因玉米（32%，5100 万公顷）、转基因棉花（15%，2470 万公顷）和转基因油菜（5%，820 万公顷）（ISAAA）。

玉米是世界上重要的粮饲兼用作物，玉米的遗传转化研究已经取得了重要的研究进展。从 1996 年至今，（除 29 个商业化种植转基因作物的国家外，另外有 31 个国家）共计 60 个国家和地区得到监管机构批准进口转基因作物用于食物和饲料以及释放到环境中。玉米是获批事件最多的作物（65 个），其次是棉花（39 个），油菜（15 个）、马铃薯和大豆（各 14 个）。

目前已实现商业化的转基因玉米主要有两类：

- 抗除草剂玉米：已在下列国家获得批准进行商业化应用，包括阿根廷、澳大利亚、加拿大、中国、欧盟、日本、韩国、菲律宾、南非、瑞士和美国等。
- 抗虫玉米：已在下列国家和地区获得批准进行商业化应用，包括阿根廷、澳大利亚、加拿大、中国、欧盟、日本、韩国、墨西哥、菲律宾、俄罗斯、南非、瑞士、中国台湾、英国、美国和乌拉圭等。

在大田试验中，巴西种植 Bt 玉米的收成上升 24%，在菲律宾更高达 41%，而在中国的升幅亦介于 9-23%。美国 Bt 玉米比传统玉米的产量高出 5%，阿根廷和南非约为 10%。近年来，转基因玉米的商业化面积呈现大幅增长，同时在部分欧洲国家也得到批准。2009 年，有 6 个欧盟成员国根据其商业需求种植了 Bt 玉米，按种植面积由高到低依次为：西班牙、捷克、葡萄牙、罗马尼亚和斯洛伐克。2011 年，这六个欧洲国家种植的 Bt 玉米面积达到 11.4 万公顷，比 2010 年增长了 20%。西班牙，因生产力提高和杀虫剂费用下降，每公顷农地收入超过 170 欧元。ISAAA 预计到 2020 年，发展中国家将吸纳八成额外的玉米需求。另一方面，这庞大的产量中，大部份均由占全球两亿农民人口中九成八的发展中国家农民所种植。Bt 玉米为发展中国家提供更安全和较廉价的粮食和饲料，并为每日在亚洲、非洲和拉丁美洲夺走 24,000 人命的饥饿和营养不良问题作出极大贡献（ISAAA）。

4.2 有关 Bt11 玉米在国内外的审批情况

转基因玉米Bt11是由先正达公司通过PEG法将*cry1Ab*基因导入玉米自交系H8540中培育的抗虫玉米。美国、加拿大、阿根廷、日本、南非、乌拉圭、菲律宾、巴西、哥伦比亚相继批准Bt11玉米进行商业化种植；美国、加拿大、阿根廷、南非、中国、韩国、菲律宾、欧盟、俄国、中国台湾、乌拉圭、瑞士、哥伦比亚、墨西哥、巴西等国家和地区已批准Bt11玉米用作食品、饲料和加工原料。中国于2004年4月批准转基因玉米的进口用作加工原料。在生产应用方面，于2007年12月批准Bt11玉米在内蒙古自治区和黑龙江省进行中间试验，试验已于2009年顺利结束。中国又于2006年12月，2009年9月和2012年12月再次批准转基因玉米Bt11进口用作加工原料的续申请。

4.3 有关 Bt11 玉米的安全性问题

转基因Bt11玉米的商业化始于1997年，得到很多国家的审批进口以及生产应用，其安全性已被各国的监管部门经严格评估程序进行了验证。历经十多年的商业化未见有关被证实的Bt11玉米对人类健康和生态环境等产生不利影响的安全性报道，这一事实也证明了基因安全评价进程所取得的研究结果的可靠性以及Bt11玉米的安全性。

最近一些国家及组织对Bt玉米的安全性又进一步做了大量实验，实验结果表明Bt11仍然是有效和安全的。以下列举了几个代表性的检验结果。

转基因国际联盟研究表明GM作物对动物无害

2012年3月8日，GMSAFOOD国际协会在其新闻发布会（奥地利维也纳）上宣布：在欧盟第七框架计划资助下，他们联合奥地利、澳大利亚、挪威、爱尔兰、土耳其和匈牙利等国的科学家，历经3年研究，证实转基因作物不会对动物产生任何伤害。原文请见：<http://www.gmo-safety.eu/news/1410.long-term-studies-safety-gm-food.html>

全球研究联盟公布关于转基因食品安全性的调查结果

转基因食品安全（转基因产品投放市场后的跟踪检测）联盟是一个由欧盟委员会资助的团队，其成员来自奥地利、爱尔兰、挪威、匈牙利、土耳其以及澳大利亚，他们开展了一项调查以了解转基因玉米对猪的健康状况的影响。该团队进行了短期（31天）喂养测试、中期（110天）喂养测试，以及育仔测试，其中育仔测试是对用Bt玉米饲养的母猪所产小猪的健康状况进行测试。结果显示，用Bt玉米饲养不同年龄段的猪都是安全的。“这些调查结果可以加强消费者对Bt玉米安全的信心”，爱尔兰农业部 Moorepark 动物与草场研究创新中心的高级研究员 Peadar Lawlor 说道。他还说：“由于在肠胃解剖学和生理学方面与人类的相似性，猪是人类的一个典型的模型。因此可以预期，人类食用Bt玉米是安全的”。原文请见：<http://www.teagasc.ie/news/2012/201201-24a.asp>

欧盟科学家称转基因Bt玉米是安全的

德国联邦教育研究部（BMBF）资助的一项持续了25年的转基因玉米安全性研究结果近期发布。来自德国亚琛工业大学（RWTH）的 Stefan Rauschen 和 Julius Kuehn 研究院植物转基因工程安全性研究所主任 Joachim Schiemann 在小组讨论对

话中透露没有任何有关转基因农作物的研究发现转基因农作物对环境有破坏性。根据德国联邦教育研究部 Petra Steiner-Hoffma 的观点，“德国联邦教育研究部正致力于推广已经证明了环境安全性的基因改良植物，继续进行农业生物技术研究，提倡技术自由和开放。我们不能从一开始就排斥某项技术。我们需要对包含绿色基因工程在内的新技术进行智能组合”。

原文请见：<http://www.biosicherheit.de/aktuell/1388.igw-biologische-sicherheitsforschung.html>

菲律宾：玉米螟仍对Bt玉米敏感

菲律宾 Los Baños 大学分子生物学和生物技术研究所以 Edwin Alcantara 博士研究表明，菲律宾境内亚洲玉米螟(ACB)对 Bt 抗虫玉米仍然敏感。在 BIOTECH 月度研讨会上，Alcantara 博士在其《菲律宾 Bt 玉米 Cry1Ab 对亚洲玉米螟的影响监测》报告中指出，在种植 Bt 玉米 10 年后，没有发现任何田间 ACB 抗性。

Alcantara 博士及其团队首先对某些 ACB 群落的敏感基线进行了估计，接着通过基线生物测定数据，分析并确定各 ACB 的诊断浓度。这些诊断浓度目前用于菲律宾 8 个转基因玉米种植省份的 ACB 抗性监测。Alcantara 说，Bt 玉米 ACB 抗性监测是转基因技术后期理应跟进工作的一部分。

原文请见：<http://www.bic.searca.org>

五、转基因植物的安全性评价

5.1 受体植物的安全性评价

5.1.1 受体植物的背景资料

5.1.1.1 学名，俗名和其他名称

受体植物的学名为栽培玉米，拉丁名称为 *Zea mays* L., 俗称玉米、苞谷、苞米等。

5.1.1.2 分类学地位

栽培玉米在分类上属于单子叶植物纲禾本科 (*Gramineae*)，玉蜀黍族 (*Maydeae*)，玉蜀黍属 (*Zea* L.)。在早期的分类系统中，玉蜀黍属仅有栽培玉米 (*Zea mays* L.) 一个种。Wilkes (1967) 将类蜀黍属 (大刍草 “Teosinte”) 归入玉蜀黍属，成为其中的一个亚属，包括两个种：一年生的墨西哥玉米 (*Zea mexicana*) 和多年生玉米 (*Zea perennis*)。根据新的研究结果，Doebley 领导的研究小组对玉蜀黍属内各分类单位的地位进行重新划分，制定了新的分类系统 (Iltis and Doebley, 1980; Doebley and Iltis, 1980)：

Genus (属) *Zea* (玉蜀黍属)

Section (亚属) *Luxuriantise* (繁茂亚属)

Zea luxurians (繁茂玉米种)

Zea perennis (多年生玉米种)

Zea diploperennis (二倍体多年生玉米种)

Section (亚属) *Zea* (玉蜀黍亚属)

Zea mays (玉米种)

ssp. mays (栽培玉米亚种)

ssp. mexicana (墨西哥玉米亚种)

ssp. parviglumis (小颖玉米亚种)

5.1.1.3 试验用受体植物品种 (或品系) 名称

受体品系：H8540。

5.1.1.4 是野生种还是栽培种

受体自交系为栽培种。

5.1.1.5 原产地及引进中国时间

大刍草 (Teosinte) 是一种古老的野生杂草，起源于墨西哥和危地马拉，一般被认为是玉米的一个祖先种 (Galinat, 1988)。Doebley and Iltis (1980) 和 Iltis and Doebley (1980) 认为一年生大刍草包括两个种，即墨西哥玉米亚种 (*Z. mays* *ssp. mexicana*, 包括 Chalco, Central Plateau 和 Nobogame 种) 和小颖玉米亚种 (*Z. mays* *ssp. parviglumis*-var. *parviglumis*, 包括 Balsas 种)。根据倍性，来自墨西哥 Jalisco

的多年生大刍草分为另外两个种，即多年生玉米种（*Z. perennis*）和二倍体多年生玉米种（*Z. diploperennis*）。位于墨西哥中南部和中美洲的 Meso-American 地区是农业起源和发展的一个主要中心，也是许多作物的起源和多样性中心（Vavilov, 1951; Smith, 1995; Harlan, 1992）。玉米驯化的确切地点还不能确定。根据在美国和墨西哥对玉米植株（花粉、穗轴、苞叶和其它遗迹）的考古发现，Randolph (1959)认为玉米是在美国中西部、墨西哥和中美洲独立驯化的。玉米也可能具有多起源中心，位于墨西哥和南美洲，这一结论是根据中美洲和南美洲（安第斯地区）玉米群体的形态特征得出的（Mangelsdorf, 1974）。

玉米何时被引入中国尚无定论。公元 1511 年安徽省《颍州志》物产中所列珍珠秫被认为是我国玉米的最早记载（万国鼎 1962，中国作物遗传资源 1994）。山东农科院主编的《中国玉米栽培学》（1986 年）中认为《颍州志》中的珍珠秫应属高粱的一个品种。我国最早记载玉米的古籍有 1555 年河南《巩县志》、1551 年（明嘉靖 30 年）河南《襄城县志》、1555 年河南《巩县志》、1560 年甘肃《平凉府志》、1563 年《大理府志》和 1574 年的《云南通志》等。一般认为玉米是由阿拉伯人从西班牙带到麦加，由麦加经中亚西亚传入我国的西北部，再传到内陆各省；或从麦加传入印度和我国西南部，尔后向其它地区传播。但是由于当时沿海地区商业发展迅速和航海事业十分发达，玉米经由海路传入东南沿海地区也是可能的。早期引进的玉米是硬粒型的，马齿型玉米是在 20 世纪 20 年代以后引入的。在 1760 年以前由云南广西一带的硬粒型地方品种经突变和选择形成了糯质玉米品种（详见《中国农业发展史》，1992，《中国农业科学技术史稿》，1989，《中国作物栽培史稿》，1980）。

5.1.1.6 玉米的用途

黄粒马齿型是中国主要的栽培玉米类型，籽粒可作为粮食和饲料，茎秆可作青贮饲料。很多人以玉米作为日常食物。一部分玉米出口或作为工业原料加工淀粉、玉米油、玉米糝和玉米粉。玉米淀粉可用作食品加工原料或作其它工业原料。从 2000 年开始，在河南省和中国西北地区的 3 个省玉米被用来提炼燃用酒精。

5.1.1.7 在国内的应用情况

历史上，玉米由西半球的土著居民栽培。全世界很多环境都有玉米栽培，北至北纬 50 度左右。目前，全世界玉米栽培面积约为 13.8 亿公顷，中国约为 2-2.5 亿公顷，玉米产量约为 10-13 亿吨（FAO 数据，1992-2001）。玉米籽粒被用作食物或饲料，新鲜的甜玉米可直接食用或加工后食用。

中国是世界上最重要的玉米生产国之一，2003 年播种面积约为 2400 万公顷，总产 1.2 亿吨（2003 年中国农业年鉴）。玉米的播种面积和总产量位列水稻和小麦之后，是第三大作物。玉米分布在北纬 50°-20° 间由东北至西南一个狭长的地带，包括 14 个省、市、自治区。玉米主要生产省份有河北、山东、黑龙江、吉林、四川和河南。历史上，玉米单独或其它谷类粮食一起制作各种中国人喜食的食品（如面包、蛋糕等）。鲜玉米（包括普通玉米和甜玉米）可直接食用。在过去的 20 年间，玉米成为最重要的饲料作物之一。玉米作为原材料可生产 300 多种工业产品，或作为制药的原料。

中国玉米带可分为 6 个产区：Ⅰ．北方春播玉米区；Ⅱ．黄淮海平原夏播玉米区；Ⅲ．西南山地玉米区；Ⅳ．南方丘陵玉米区；Ⅴ．西北灌溉玉米区；Ⅵ．青藏高原玉米区（详见 5.1.3.1 节）。其中，前 3 个产区占玉米播种总面积的 90%。

5.1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响

迄今为止，种植玉米、食用玉米（包括食用含有玉米成分的食品）、作为饲料或用于工业用途，都未见对人类或动物的健康及生态环境产生过不利影响的报道。

5.1.1.9 从历史上看，受体植物变成有害植物的可能性

玉米是经过数千年逐步驯化而成的作物，已不适于在野外生存。虽然玉米可以产生大量的种子，但是需要借助人力来散布。前茬玉米的种子虽然可以越冬并在来年发芽，但不具杂草性质，这些种子可以在大豆和小麦田发芽，但形成的植株一般可用除草剂杀死或人工拔除，剩余的少数植株所产生的种子来年不能存活。玉米无法在栽培环境之外繁殖。而且，在自然界中玉米植株不具侵害性（Gould, 1968）。虽然在中美洲存在某些玉蜀黍属的野生种，但是它们均不具有成为杂草的倾向（Galinat, 1988）。与杂草植物不同，玉米具有一个只有雌蕊的雌穗包藏在苞叶内。因此，种子不能自然落粒，只有个别籽粒可能散落田间或运输途中（Hallauer, 2000）。

5.1.1.10 是否有长期安全应用的记录

栽培玉米作为人类食物和饲料应用已有相当长的历史。从目前的记载和研究资料看，玉米的应用是安全的。只有极少数人群在食用玉米后有不良反应。玉米在世界上长期的栽培历史也证明玉米是安全的。

5.1.2 受体植物的生物学特性

5.1.2.1 一年生还是多年生

栽培玉米为一年生植物。在我国大部分地区春季或夏季播种，秋季收获。在气候条件适合的地区，一年可种植两季。在我国的海南岛等极少数地区，栽培玉米可越冬繁殖。

5.1.2.2 对人类和其他生物是否有毒，如有毒，应说明毒性存在的部位及其毒性性质

根据我们现有的知识，栽培玉米的籽粒及其相关产品对人或动物无毒害作用。

5.1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏源存在的部位及其致敏的特性

1996 年 Hefle 等人已将玉米列为“较少致敏的食物”。但作者已声明：此列表只证明此类食物有较少的致敏记录，并不能说明它是否具有成为过敏食物的特性或潜力（Hefle *et al.* 1996）。最新的科学研究报道没有证明玉米是一种致敏原。只有极少数个例表明食用玉米后产生过敏反应。没有证据表明过敏性与玉米有必然的联系。

5.1.2.4 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

栽培玉米是有性繁殖作物，雌雄同株异花。除以下几点之外，玉米的授粉、受精和颖果发育与其它风媒传粉的杂草相似：

- 花粉只在雄花序中产生，卵子只在雌花序中产生；
- 自花、异花授粉和受精均可能发生，其频率取决于花粉传递的物理距离和其它环境条件。有些复杂的因素（如遗传因素导致的不育和花粉管发育速度等）对自花和异花受精也有决定作用；
- 玉米花丝和花粉管的研究在植物界历史最长；
- 散粉后花粉一般存活 10-30 分钟，但在低温下可存活更长时间（Coe *et al.* 1988）；
- 由于玉米花粉是圆形的且直径较大（0.1 mm），花粉的散布受到限制。大量研究表明，98%的花粉落在 60 米范围内（Raynor *et al.* 1972; Luna *et al.* 2001; Burris, 2002）。
- 雌雄花序不是同时发育。雌花序一般早熟，但由于雌花序上的花丝从苞叶中伸出可能被延迟大约 7 天的时间，因此表面上雄蕊略微早熟，而迟发育的雄花序是完全暴露在外的。花丝伸出后 10 天内都可接受花粉，只是接受花粉的能力很快下降（Walden and Everett, 1961）。
- 玉米主要是风媒传粉，昆虫传粉较少（Russell and Hallauer, 1980）。研究表明，在雌雄相距 50 米时，玉米的结实率为 34%；100 米时为 25.2%；150 米时为 16.0%（Raynor *et al.*, 1972）。

5.1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率

根据胚乳和种皮类型，玉米可分为 9 个亚种：

硬粒型（*Zea mays indurata*）

粉质型（*Zea mays amylacea*）

马齿型（*Zea mays indentata*）

爆裂型（*Zea mays everta*）

甜质型（*Zea mays saccharata*）

有稃型（*Zea mays tunicata*）

半马齿型（*Zea mays semindentata*）

糯质型（*Zea mays sinensis*）

甜粉型（*Zea mays amylacea-saccharata*）

玉米各亚种间可以自由杂交。玉米和大刍草具有可交配性，能够产生可育杂种（Wilkes, 1977）。玉蜀黍属（*Zea*）中的亲缘种只分布于墨西哥和危地马拉。摩擦禾属（*Tripsacum*）与玉蜀黍属亲缘关系较近，摩擦禾属已鉴别出 11 个种，分布于

北纬 42°至南纬 24°之间（de Wet et al. 1981）。在自然条件下，栽培玉米与大刍草和摩擦禾很难杂交。大刍草与摩擦禾起源于北美，在我国没有自然分布。

5.1.2.6 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）

本研究所用自交系都是正常可育的。但在自然条件下有许多因素可以引起玉米的雄花不育，如高温、干旱、辐射、化学药物处理，以及营养元素缺乏等。在玉米材料中也存在受遗传控制的不育类型，如受细胞质基因控制的 T 型不育系、C 型不育系、S 型不育系等，还有受细胞核基因控制的不育系。

5.1.2.7 全生育期

在我国春玉米的生长期一般是 4 月至 9 月，夏玉米的生长期一般是 6 月中旬至 9 月中旬。本研究所用的受体自交系生育期也在此范围内。

5.1.2.8 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

玉米是一年生植物，在我国大部分地区可正常开花结实。但在玉米开花期遇持续高温（38℃以上）会影响花粉的生活力，进而降低玉米的结实率。在长期的进化过程中，玉米已经不能在野外存活。玉米种子的散布必须要借助人力。在自然条件下，玉米种子越冬后发芽率明显下降。

在夏季，玉米可以在全国各地种植，但在冬季，除了海南省部分地区之外，玉米都不能生长。玉米是比较耐旱的作物，比其它粮食作物（如小麦和水稻）消耗水分要少。玉米每生产 1 千克干物质约消耗 184 千克水，稍高于谷子和高粱，但比小麦、大麦和水稻少得多。玉米的抗旱性主要表现在苗期，拔节以后抗旱性明显降低。玉米的耐盐性不高，玉米幼苗在土壤耕作层含盐量低于 0.18%可正常生长；含盐量 0.18—0.30%生长明显受阻；含盐量高于 0.30%时，就停止生长。

5.1.3 受体植物的生态环境

5.1.3.1 受体植物的地理分布和自然生境

玉米虽然在全国都有种植，但主要分布在由东北至西南一个狭长的地带（北纬 50°—20°），包括 14 个省、市和自治区。玉米主产区有河北、黑龙江、山东、四川和河南省。根据地理位置和生态环境，可分为 6 个玉米产区（图 2）。



图 2 中国的玉米生产区

北方春播玉米区：玉米主产区，占播种总面积的 39.2%，占总产的 43.8%。该区包括黑龙江、吉林、辽宁、宁夏，内蒙古、山西大部，河北、陕西和甘肃北部，生态条件和生产条件都适合玉米生长，地势平坦，土壤肥沃，光照充足，无霜期 130—170 天，年降雨量 400-800mm（60%降雨在 6-9 月间）。一年一熟。

黄淮海平原夏播玉米区：玉米主产区，占播种总面积的 32.7%，占总产的 35.5%。该区包括山东和河南、河北大部、山西中南部、陕西关中地区和江苏徐淮地区，是玉米的集中产区。水资源丰富，黄河、淮河和海河横穿该区，年降雨量为 170-220mm（70%降雨在夏季），水浇地面积达 50%。一年两熟。

西南山地玉米区：玉米主产区，占播种总面积的 18.4%，占总产的 13.4%。该区包括四川、云南和贵州省、陕西南部、广西西部高原地区、湖南、湖北和甘肃部分地区。山地占该区的 90%，地形复杂。无霜期为 240-330 天，降雨量为 800-1200mm。该区种植的玉米易受生物和非生物因素（如干旱和病虫害）的危害。一年一熟或一年多熟。

南方丘陵玉米区：该区面积广大，包括广东、海南、浙江、江苏和安徽南部、广西东部、湖南和湖北省。该区主要种植水稻，玉米面积较小，只占 3.2%，产量只占总产的 2.2%。该区位于热带和亚热带地区，无霜期 220—360 天，降雨量 1000—1800mm，适合玉米生长。一年三熟或一年四熟。

西北灌溉玉米区：该区为干旱地区，降雨量低于 200mm，包括新疆、河西甘肃走廊、宁夏河套地区。这一地区的作物主要靠灌溉。无霜期 130—180 天。玉米播种面积占 3%。一年一熟。

青藏高原玉米区：该区位于高纬度地区，包括青海省和西藏自治区、四川西部和云南北部地区。玉米栽培历史较短，播种面积很小。

5.1.3.2 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

玉米是喜温喜光植物。种子发芽的最低温度为 6-7℃，在 10-12℃时种子才可整齐发芽，生产上常把这个温度作为开始播种的最低温度指标。最适宜玉米种子发芽的温度为 25℃-28℃。玉米苗期生长速度与温度的高低有密切关系，在一定范围内温度越高生长越快。一般 10℃以上的温度有利于玉米的生长发育，出苗后玉米能够抵抗短时间的低温（-2℃—-3℃）。玉米从抽雄到开花时温度以 25-28℃为宜。如果温度过高（35℃以上），空气湿度又低（30%左右），花粉生活力会很快丧失。因此，玉米开花期若遇长时间的高温干燥会造成结实不良。玉米的灌浆和乳熟前期的适宜温度为 22—24℃，成熟后期要求的温度为 6-25℃。

不同的玉米品种对温度的要求不同。春播早熟品种全生育期积温要求 1800-2000℃；中熟品种为 2200-2400℃；晚熟品种为 2500-2800℃；夏玉米早熟品种需要的全生育期积温为 1200-1350℃；中熟品种为 1400-1500℃。玉米高度适应农田，不能在野外繁育。栽培条件的改变可能影响其地理分布区域和范围。

5.1.3.3 是否为生态环境中的组成部分

玉米不是自然生态系统的一部分，但在我国许多地区，玉米是农业生态环境的一部分。

5.1.3.4 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

玉米田构成相对独立的生态环境，属于农田生态环境。在生产上，玉米常和小麦或水稻轮作。在北方春播玉米区和黄淮海平原夏播玉米区，玉米也常常和大豆、甘薯等低秆作物间作。玉米对其它植物无明显依赖性。农田生态环境是相对稳定的、严格人为控制的生态环境，通常不会发生显著改变，因此玉米对人类健康和生态环境不会产生或增加不利影响。

5.1.3.5 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

由于玉米是风媒花，昆虫的种群对玉米传粉影响不大，有些昆虫危害玉米根、茎、叶和果穗。玉米本身（转基因玉米除外）不能直接杀死昆虫。在玉米根际微生物中固氮菌可与玉米根系互作，进行固氮。但是，不大可能出现玉米与其它植物和动物之间的相互作用并对人体健康产生负面影响。

5.1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度

玉米是栽培作物，人类耕种玉米对自然生态环境没有显著影响。玉米不同品种具有不同的种植方式，可能会对农田生态环境产生一些影响，但不存在潜在的危害。

5.1.3.7 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、竞争物和共生生物的资料

玉米在我国是常见农作物。

5.1.4 受体植物的遗传变异

5.1.4.1 遗传稳定性

由于玉米是异花授粉作物，不同材料种在一起会通过异花授粉产生各种遗传变异，从而导致玉米的遗传不稳定性。但是，如果不同的玉米材料隔离种植将会保持遗传稳定性。

5.1.4.2 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

目前未见玉米自然变异对人类或环境产生不利影响的资料。培育玉米杂交种是一种常规的育种方法，玉米育种家创造新的遗传变异，用来选育新品种。玉米在自然条件下偶尔会产生一些遗传变异，育种家也经常利用这些自然变异进行品种改良。一些优良的变异会被保留下来，而一些不良变异（包括那些对人类健康或对生态环境产生不利影响的变异）则会被淘汰。目前未见玉米自然变异对人类或环境产生不利影响的资料。

5.1.4.3 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

根据 1980 年以前的研究结果，认为玉米很容易与大刍草发生基因交流，大刍草的墨西哥玉米亚种（*Z. mays ssp. mexicana*）是两个亚种间杂交形成的，可作为基因转移的桥梁（de Wet and Harlan, 1972; Galinat, 1973）。然而，利用现代技术重新研究，没有发现玉米与大刍草发生遗传物质交换的证据（Smith et al. 1985）。墨西哥玉米亚种（*Z. mays ssp. mexicana*）可能不是野生种与栽培玉米的杂交种，因而不能作为基因转移的桥梁，它们之间的相似性可能是由于都平行适应于相同的生态环境（Doebley, 1984）。有证据表明，由大刍草向玉米转移基因受到严格的限制（Doebley et al. 1987）。摩擦禾（*Tripsacum*, n=9）和玉蜀黍（*Zea*, n=10）植物具有不同的染色体数目。借助现代幼胚拯救技术，栽培玉米可以与摩擦禾（*T. dactyloides*）杂交，但得到的后代通常是不育的，遗传也不稳定，从摩擦禾向栽培玉米转移基因是十分困难的（Manglesdorf, 1974）。附加到栽培玉米基因组的单个摩擦禾染色体传递率极低，玉米与摩擦禾染色体交叉频率也极低，因而无法在玉米改良中利用摩擦禾的基因（Galinat, 1988）。从其它植物种很难向玉米转移基因。玉米花粉与小麦授粉可产生小麦单倍体，但玉米染色体在杂种胚发育的早期就消失了，玉米与小麦的遗传交换也不可能发生（Laurie and Bennett, 1989）。

5.1.4.4 在自然条件下与其他生物（动物和微生物）进行遗传物质交换的可能性

自然条件下从未发现玉米与动物和微生物交换遗传特征（Bertolla and Simonet, 1999; Nielsen et al. 2000）。

5.1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性

玉米很容易肉眼鉴定。另外也可以用遗传标记进行监测。

5.1.6 受体植物的其他资料

无。

5.1.7 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，玉米种子和秸秆对人畜无毒，玉米不可能变为杂草，在自然界生存竞争能力差，不能形成群落，无生态危险性；玉米虽可与其近缘野生植物大刍草或

摩擦禾属的一些种杂交，但由于我国野外没有这些野生种，所以玉米的基因不可能通过渐渗杂交的方式传递给杂草。参照《农业转基因生物安全管理办法》第十一条有关标准，Bt11 玉米的受体属于安全等级 I 级的植物。

5.2 基因操作的安全性评价

5.2.1 转基因植物中引入或修饰的性状和特性的叙述

Bt11 玉米是将 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因经 PEG 介导转化法转入玉米受体细胞基因组，所用转化载体为 pZO1502。其中 *cry1Ab* 基因来自苏云金芽孢杆菌株系 HD-1 (*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, Bt) (Perlak *et al.* 1991)，对玉米螟等鳞翅目害虫有抗性作用。*pat* 基因是从绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 株系 Tu494 克隆获得 (Wohlleben *et al.* 1988a)，编码草铵膦乙酰转移酶 (PAT 蛋白)，具有抗草铵膦类除草剂特性，在遗传转化过程中作为选择标记。

5.2.2 实际插入或删除序列的材料

5.2.2.1 插入序列的大小和结构，确定其特性的分析方法

用于转化 Bt11 玉米的载体 pZO1502，是把 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因构建到 pUC18 质粒上获得的。其中，*cry1Ab* 基因盒和 *pat* 基因盒有相同的转录表达方向。图 3 所示为 Bt11 玉米中来自 pZO1502 载体的 *NotI* 限制性酶切插入片段。该插入片段长 6.2 kb，包括 *cry1Ab* 基因盒和 *pat* 基因盒，以及紧邻 *cry1Ab* 基因盒上游 1.1 kb 的 ColE1 复制起点序列。其他功能元件描述参见 5.2.3 部分。

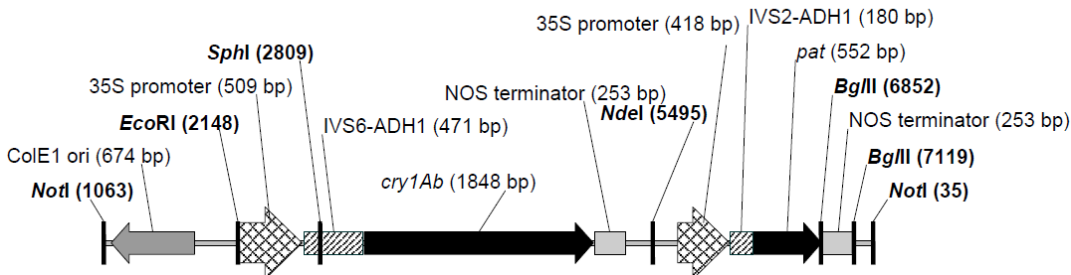


图 3 用于转化 Bt11 玉米的 pZO1502 载体 *NotI* 限制性插入片段

使用高保真 (Expand™ High Fidelity) PCR 系统对 Bt11 玉米的两个片段 (图 4) 进行扩增。将片段克隆并测序，比较 Bt11 玉米中的插入序列是否与质粒 pZO1502 上 *NotI* 插入片段的序列保持一致。测序结果 (如图 5) 表明两者完全一致。

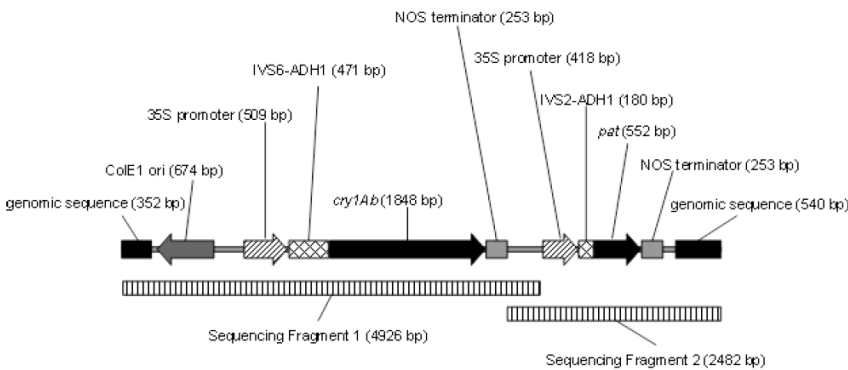


图 4 Bt11 插入子和 PCR 扩增片段的位置

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 5 Bt11 玉米中的插入序列与质粒 pZO1502 上 *NotI* 插入片段序列比对

5.2.2.2 删除区的大小与功能

通常在确定玉米基因组在外源 DNA 插入过程中是否发生了缺失，需要在插入序列 5'和 3'端的基因组侧翼序列中分别设计引物进行 PCR 分析，并且扩增非转基因近等基因玉米株系（或转化株系）中的同一区域，最后对转基因插入位点的旁侧序列与非转基因的相应序列进行比对分析。虽然我们已尝试过使用 PCR 分析，但由于 Bt11 玉米外源 DNA 插入在玉米 8 号染色体的区域含有重复 DNA 序列，因此无法得到有意义的信息。鉴于 PCR 方法不成功，我们便采用了生物信息学方法来评估 Bt11 中外源插入序列对受体植物（玉米）基因组可能产生的影响。

通过和公共数据库玉米基因组数据比对，证实了在 Bt11 玉米插入片段旁侧包含大量的高度重复序列。相似的序列也可以在玉米基因组的多个其他区域找到。可以推断玉米基因组上大量高度重复的序列可以在功能上弥补 8 号染色体上 Bt11 玉米插入位点或附近可能有的缺失。通过对旁侧序列的 BLASTN 分析没有与任何基因片段序列具有同源性，证明了玉米内源基因没有受到影响。另外，Bt11 玉米的农艺性状与非转基因没有生物学意义的差异的结论也充分证明了玉米内源基因功能的正常表达。

5.2.2.3 目标基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

cry1Ab 基因的核苷酸序列（1848bp）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

cry1Ab 基因推导的氨基酸序列（615aa）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

pat 基因核苷酸序列（552bp）：

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

pat 基因推导的氨基酸序列（184aa）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

5.2.2.4 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；

选择在基因组上分布良好的一套 50-60 个 RFLP 探针对 Bt11 玉米与其非转基因对照的基因型进行分析，确定 Bt11 玉米的抗虫基因位点位于 8 号染色体长臂上。

5. 2. 2. 5 插入序列的拷贝数

利用 Southern 杂交可以确定 Bt11 玉米中插入序列的拷贝数。基因组 DNA 取自 Bt11 玉米植株，探针是 ³²P 标记的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因序列。玉米基因组 DNA 分别用 *Nde*I、*Sph*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 酶切 (*cry1Ab* 探针) 和 *Nde*I、*Bcl*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 消化 (*pat* 探针)。此外玉米基因组 DNA 用 *Nde*I、*Msc*I 和 *Hind*III+*Nde*I 酶切 (骨架探针) 以验证 Bt11 玉米是否包含任何来源于载体骨架的序列。阴性对照为近等基因系非转基因对照提取的基因组 DNA，阳性对照为 10.2 pg *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA 质粒和近等基因系非转基因对照提取的基因组 DNA 混合物。

Southern 杂交结果如下图，结果表明，Bt11 玉米中插入的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因均显示为单一杂交条带，证明两个基因均以单拷贝插入；并且 Bt11 玉米不含任何来源于载体骨架的序列。

cry1Ab 探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点如下：

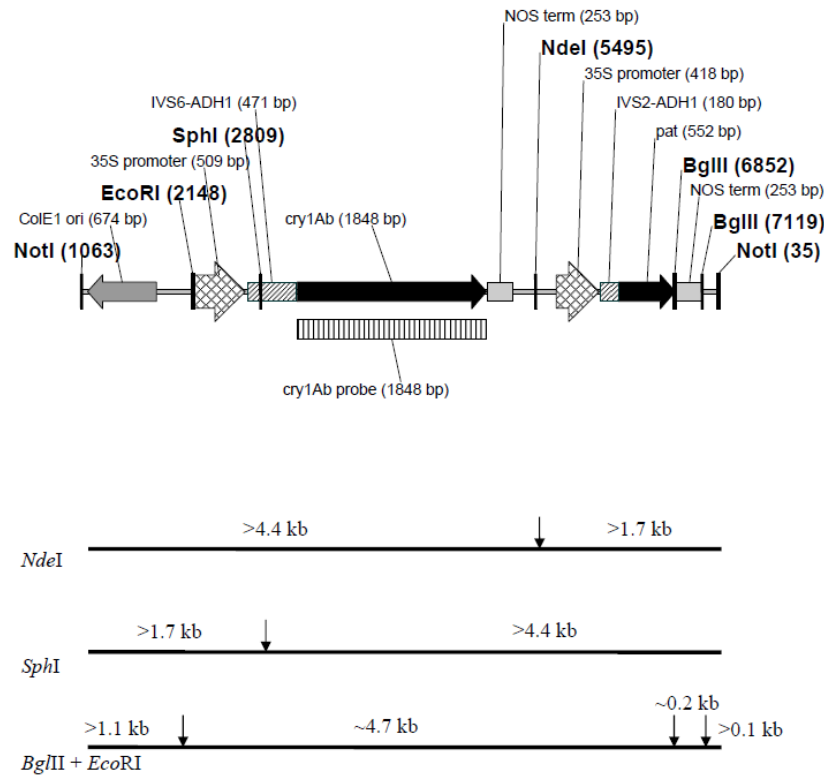


图 6 Southern 杂交选用的酶切位点以及 1848 bp *cry1Ab* 探针在载体 pZO1502 上的位置显示了 Bt11 转化使用的载体 pZO1502 的 6.2 kb *Not*I 限制性酶切片段。黑体字标明用 *cry1Ab* 探针进行 Southern 杂交分析时所使用的限制性酶切位点。箭头显示限制性酶酶切的位置，标明了根据 pZO1502 线性图谱推算的酶切片段的大小。

cry1Ab 特异探针的杂交结果:

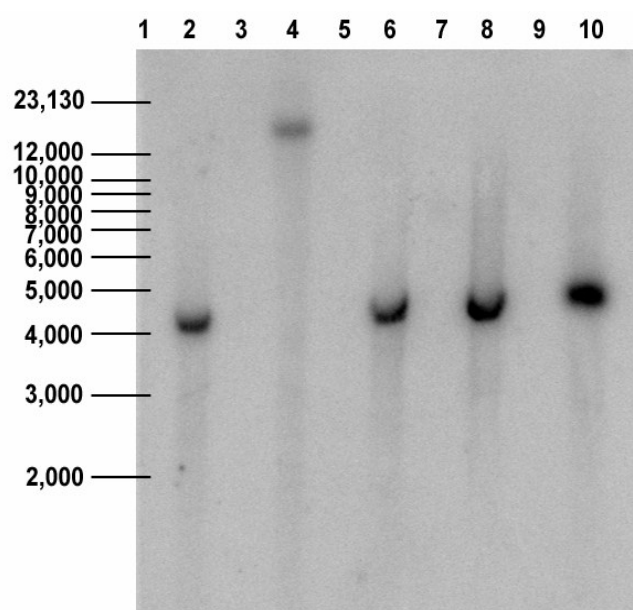


图 7 Bt11 玉米用 1848 bp *cry1Ab* 特异探针 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 µg) 用 *Nde*I、*Sph*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 限制性内切酶消化，电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上，与 *cry1Ab*-特异性探针杂交 (1848 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Kb DNA ladder, Stratagene Cat. No. 201115-81; Lambda DNA-*Hind*III Digest ladder, New England Biolabs Cat.No. N3012S)；

泳道 2: 用 *Nde*I 消化的 Bt11；

泳道 3: 用 *Nde*I 消化的阴性对照；

泳道 4: 用 *Sph*I 消化的 Bt11；

泳道 5: 用 *Sph*I 消化的阴性对照；

泳道 6: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 Bt11 DNA；

泳道 7: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的近等基因系阴性对照；

泳道 8: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照和 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA 混合；

泳道 9: 空白；

泳道 10: 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA。

pat 探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点：

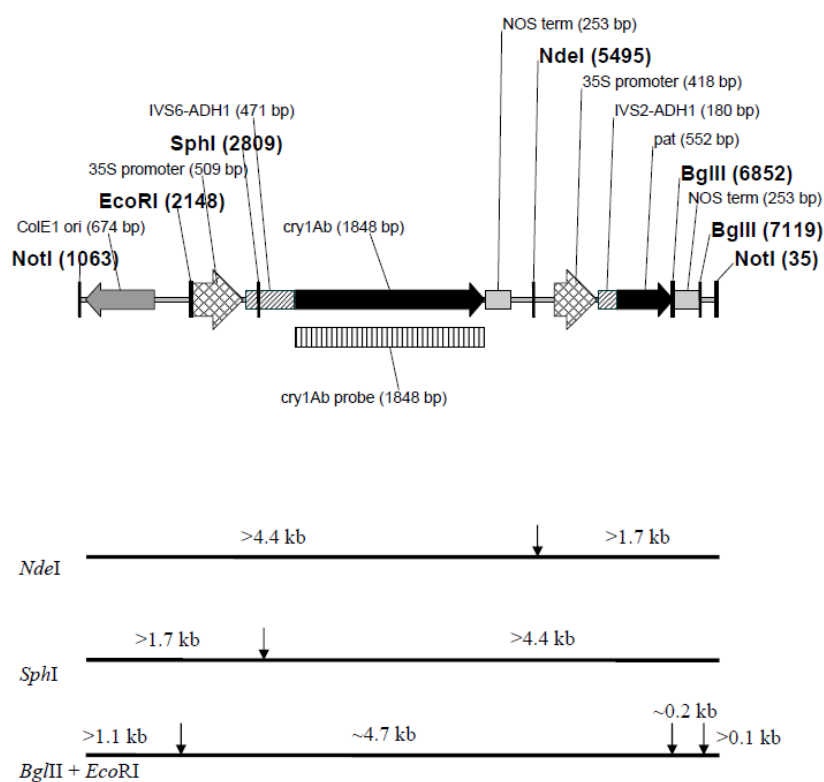


图 8 Southern 杂交选用的酶切位点以及 552 bp *pat* 探针在载体 pZO1502 上的位置显示了 Bt11 转化使用的载体 pZO1502 的 6.2 kb *NotI* 限制性酶切片。黑体字标明用 *pat* 探针行 Southern 杂交分析时所使用的限制性酶切位点。箭头显示限制性酶酶切的位置，标明了根据 pZO1502 线性图谱推算的酶切片段的大小。

pat 特异探针的杂交结果:

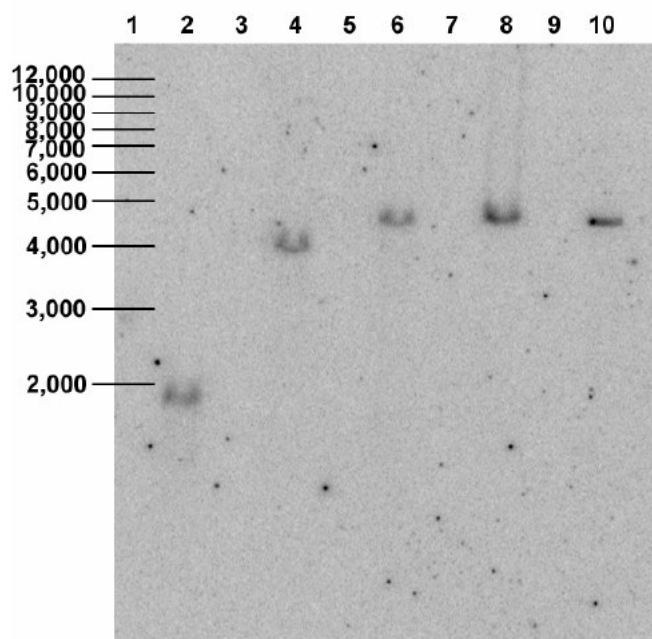


图9 Bt11 玉米用 552bp *pat* 特异探针进行 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *Nde*I、*Bcl*II 和 *Bgl*II+*Eco*RI 限制性内切酶消化, 电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上, 与 *pat* 特异性探针杂交 (552 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Kb DNA ladder, Stratagene Cat. No. 201115-81) ;

泳道 2: 用 *Nde*I 消化的 Bt11;

泳道 3: 用 *Nde*I 消化的阴性对照;

泳道 4: 用 *Bcl*II 消化的 Bt11;

泳道 5: 用 *Bcl*II 消化的阴性对照;

泳道 6: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 Bt11 DNA;

泳道 7: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照;

泳道 8: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照和 10.2 pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA 混合;

泳道 9: 空白;

泳道 10: 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA。

骨架特异性探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点：

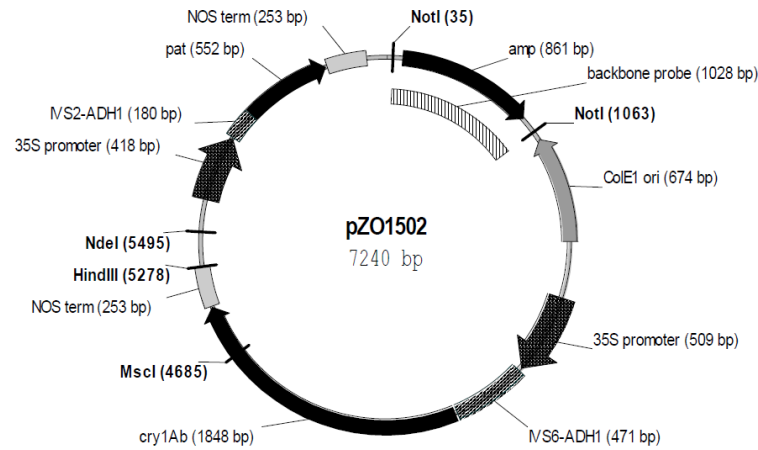


图 10 Southern 杂交选用的酶切位点和骨架特异性探针在载体 pZO1502 上的位置

骨架特异性探针杂交结果：

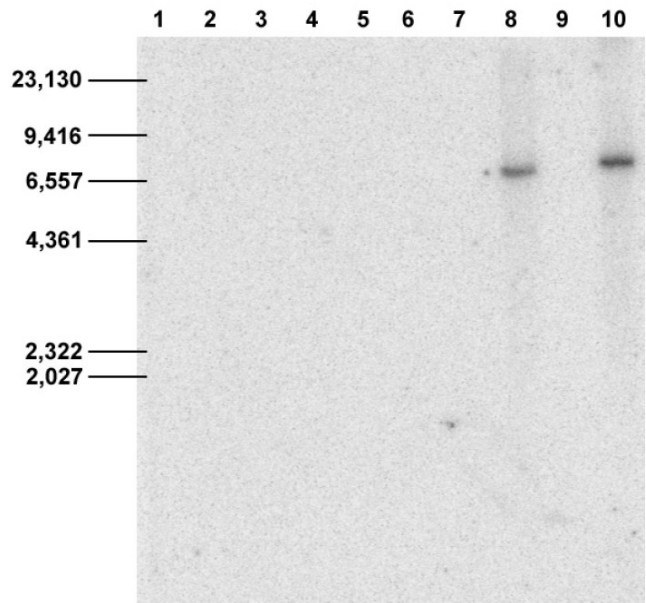


图 11 Bt11 玉米用骨架特异探针进行 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *Nde*I, *Msc*I 和 *Hind*III+*Nde*I 限制性内切酶消化，电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上，与骨架特异性探针杂交 (1028 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Lambda DNA-HindIII Digest ladder, New England Biolabs Cat. No. N3012S)；

泳道 2: 用 *Nde*I 消化的 Bt11；

泳道 3: 用 *Nde*I 消化的阴性对照；

泳道 4: 用 *Msc*I 消化的 Bt11；

泳道 5: 用 *Msc*I 消化的阴性对照；

泳道 6: 用 *Hind*III+*Nde*I 消化的 Bt11 DNA；

泳道 7: 用 *Hind*III+*Nde*I 消化的阴性对照；

泳道 8: 用 *Hind*III+*Nde*I 消化的阴性对照和 10.2 pg 用 *Hind*III+*Nde*I 消化的 pZO1502 DNA 混合；

泳道 9: 空白；

泳道 10: 10.2pg 用 *Hind*III+*Nde*I 消化的 pZO1502 DNA。

5.2.3 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。

Bt11 转化体所用的载体是 pZO1502，大小为 7240 bp，来源于大肠杆菌，目的基因与载体构建的物理图谱如下。载体是安全的，无致病性。大肠杆菌是一种普遍的细菌，属于肠杆菌科，与杆状菌属同类，是革兰氏阴性菌。大肠杆菌广泛存在于环境中，而且在脊椎动物包括人类的消化系统里也能找到。大多数的大肠杆菌对人类没有害处。大肠杆菌有很长的安全使用史，也经常用于商业化的蛋白表达系统中。

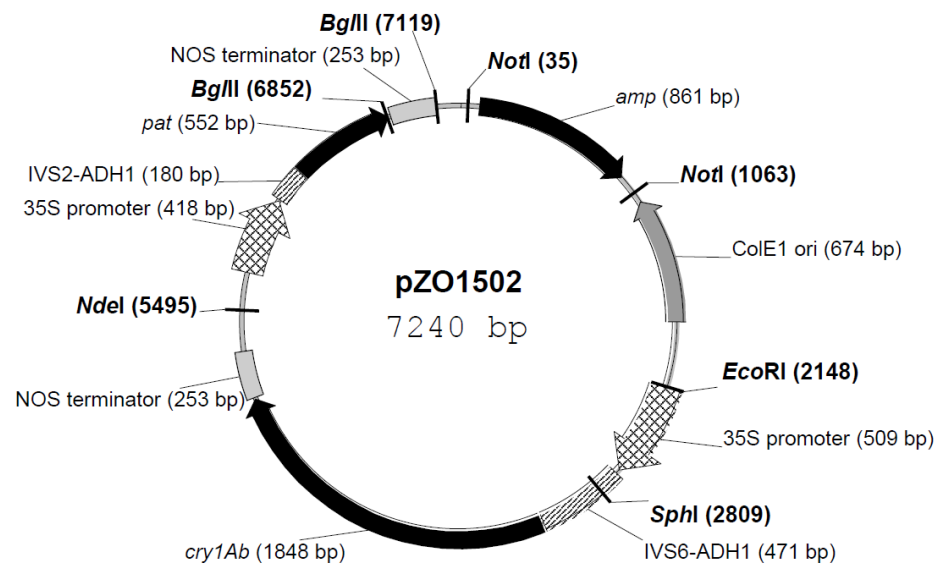


图 12 pZO1502 质粒图谱以及用于 Southern 分析的限制酶酶切位点

表 1. pZO1502 各种功能元件描述

基因元件	大小 (bp)	功能
基因表达盒		
35S 启动子-1	509	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 和玉米中乙醇脱氢酶 (<i>adh</i>) 基因的内含子序列 VI (471bp) 形成互补, 提高玉米中的基因表达水平 (Mascarenhas <i>et al.</i> , 1990)。
IVS6-ADH1	471	玉米中的间插内含子序列 6, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049) (NCBI, 2012)
<i>cry1Ab</i>	1848	经过修饰的 <i>cry1Ab</i> 基因, 可编码一种具有抗某些鳞翅目昆虫活性的 Cry1Ab 蛋白。 <i>cry1Ab</i> 基因最初是从苏云金芽孢杆菌 var.kurstaki HD-1 中克隆获得的。原始编码序列在 3'末端被截短, 经过修饰提高其在玉米中的表达水平。但截短后剩余的 Cry1Ab 蛋白的氨基酸序列保持不变 (Perlak <i>et al.</i> , 1991)。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
选择标记表达盒		
35S 启动子-2	418	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 补充了玉米中 <i>adh1</i> 基因 (Freeling and Bennet 1985) 内含子序列 2 (180bp), 以增强基因在玉米中的表达 (Mascarenhas <i>et al.</i> 1990)。
IVS2-ADH1	180	玉米中的间插内含子序列 2, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049.1) (NCBI, 2012)。
<i>pat</i>	552	绿产色链霉菌 <i>Tu494</i> 菌株的基因, 编码选择性标记 PAT。原始编码序列经过密码子优化, 提高了在玉米中的表达水平。PAT 对含草铵膦类除草剂具有抗性。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1) (NCBI,202)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
载体组成		
ColEL1	674	复制起始位点能促使质粒在大肠杆菌中自我复制。与 Accession Number V00268.1 (NCBI, 202)类似 (Itoh and Tomizawa,1978)。

5.2.4 载体中插入各片段的资料

5.2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称

35S 启动子-1: 大小 509bp, 该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner *et al.*, 1981), 和玉米中乙醇脱氢酶 (*adh*) 基因的内含子序列 VI (471bp) 形成互补, 提高玉米中的基因表达水平 (Mascarenhas *et al.*, 1990)。

35S 启动子-2: 大小 418bp, 该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner *et al.*, 1981), 补充了玉米中 *adh1* 基因 (Freeling and Bennet 1985) 内含子序列 2 (180bp), 以增强基因在玉米中的表达 (Mascarenhas *et al.* 1990)。

NOS 终止子: 大小 253bp, 终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1) (NCBI,202)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker *et al.*, 1982)。

5.2.4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称

标记基因 *pat*: 大小 552bp, 来源于绿色产色链霉菌 Tu494 菌株, 该基因编码选择性标记 PAT。原始编码序列经过密码子优化, 提高了在玉米中的表达水平。PAT 对含草铵膦类除草剂具有抗性。

5.2.4.3 其他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)

IVS6-ADH1: 大小 471bp, 玉米中的间插内含子序列 6, 来自玉米 *adh1* 基因 (Accession Number X04049) (NCBI, 2012)

IVS2-ADH1: 大小 180bp, 玉米中的间插内含子序列 2, 来自玉米 *adh1* 基因 (Accession Number X04049.1) (NCBI, 2012)。

5.2.5 转基因方法

Bt11 玉米转基因品系采用的是 PEG 介导的转化方法。按照 Negrutiu 等人 (1987) 所述的原生质体转化方法, 将来源于 pZO1502 质粒上的 *Not* I 酶切片段转入原生质体中, 该 *Not* I 酶切片段不包含质粒骨架的 DNA 序列。最终经过选育得到 Bt11 玉米植株。

5.2.6 插入序列表达的资料

5.2.6.1 插入序列表达的器官和组织, 例如根、茎、叶、花、果实、种子等

采用酶联免疫法 (ELISA) 检测了温室种植 Bt11 玉米植株中不同组织器官的 Cry1Ab 蛋白表达量, 包括叶、茎、雄穗、花丝、苞叶、根以及籽粒等。分析结果表明叶片中 Cry1Ab 蛋白含量最高。此外, 检测了大田种植 Bt11 玉米中不同组织器官的 Cry1Ab 蛋白表达量, 结果表明叶片中 Cry1Ab 蛋白含量最高, 叶片、苞叶和茎秆中 Cry1Ab 蛋白的比浓度 (ng Cry1Ab 蛋白/mg 总蛋白) 相近, 但籽粒中显著降低。具体分析方法和表达量结果见 5.2.6.2 节。

采用 ELISA 方法对 PAT 蛋白在 Bt11 玉米中叶片、根、茎、花粉、花丝、雄穗和籽粒等组织中表达量分析结果表明, 叶片和雄穗样品中的 PAT 蛋白水平较高, 花丝中也能检测出 PAT 蛋白, 但在根、花粉和籽粒中的 PAT 蛋白低于 LOD 值。具体分析方法和表达量数据见 5.2.6.2 节。

5.2.6.2 插入序列表达量及其分析方法

Cry1Ab 蛋白在 Bt11 玉米中的表达

测定了种植于温室的 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白的水平。在植物生长的不同阶段分析多种植物组织, 每个数据测定至少 5 个单株。分别对包括叶、茎、雄穗、花丝、苞叶、根以及籽粒等在内的组织进行分析。组织样品经液氮研磨后, 加 6 倍体积提取液 (50mM bis-Tris 丙烷、pH7.5, 5mM DTT, 0.1 mM PMSF), 在 4°C 温育 30-60 分钟, 11000g 离心 20 分钟, 用 ELISA 法和 Bio-Rad 蛋白分析方法测定 Cry1Ab 蛋白和总蛋白的含量。所有的数据都用一个比浓度表示: ng Cry1Ab 蛋白/mg 植物提取的蛋白。

结果表明温室种植 Bt11 玉米的所测植物组织中均能检测到 Cry1Ab 蛋白, 并且叶片中 Cry1Ab 蛋白含量最高。生育早期 Cry1Ab 蛋白含量较高, Cry1Ab 水平随着植株完全成熟和组织衰老而降低 (表 2)。

表.2 温室种植 Bt11 玉米组织中不同生育时期 Cry1Ab 蛋白含量
(括号中的数据为平均数的标准差)

组织	ng Cry1Ab 蛋白/mg 植物蛋白 (播种后天数)									
	5	10	15	20	25	30	37	59	84	119
子叶	20.5 (0.4)	36 (1.7)								
根	22.1 (1.3)	11.7 (0.8)					37 (7)	12 (3.4)	18.2 (4)	2.2 (1.2)
第 2 叶		106 (4.7)	27.9 (3)	22.4 (0.9)	125 (5)	38 (1.3)	55.6 (4)			
第 5 叶				45.7 (2)	168 (5)	34 (1.3)	54 (3.3)	16.7 (1.2)		
第 10 叶							102 (6)	30 (1.5)	9.4 (1)	
第 15 叶								37.9 (2.2)	10.2 (1.1)	
茎秆表皮							36 (3.3)	10.4 (2.6)	12.6 (3.4)	9.0 (2.2)
茎髓							27 (4)	19.2 (3.1)	18.0 (4.8)	8.8 (2.0)
雄穗								8.0 (1.4)	8.8 (2.0)	6.8 (4.2)
花粉								1.25 (0.8)		
花丝								2.4 (0.6)	6.8 (1.8)	5.2 (3.8)
穗轴								13.6 (2.3)	27.2 (8.8)	5.2 (1.4)
苞叶								24.8 (2.9)	15.4 (5.3)	2.6 (2.6)
玉米棒								3.2(3.0)	26.6 (6.4)	16.2 (3.3)
气生根								3.2 (1.2)	7.0 (2.1)	4.8 (2.1)
籽粒									8.2 (2.5)	0.4 (0.4)

此外，测定了田间种植的 Bt11 玉米不同组织中 Cry1Ab 蛋白含量。供试材料玉米杂交种 X4334CBR 和 X4734CBR 种植在明尼苏达州 Stanton，玉米杂交种 X6534CBR 和 X7634CBR 种植在伊利诺州 St Joseph。对照是具有相同遗传背景的非转基因杂交种 NK4242 和 NK7514。所测定的玉米组织包括：叶片，由穗位叶及其相邻的上部叶片的前半部分组成；茎，穗上 20 厘米长的茎秆；苞叶，外苞叶的上部 1/3；籽粒，取自乳熟早期（水分 50-60%，Stanton 试点）和乳熟晚期（水分 40-50%，St Joseph 试点）。

结果显示，在大田种植的玉米植株中，叶片组织中 Cry1Ab 蛋白含量最高。叶片、苞叶和茎秆中 Cry1Ab 蛋白的比浓度（ng Bt 蛋白/mg 总蛋白）相近，但籽粒中显著降低。四个杂交种中 Cry1Ab 蛋白表达量相近。这与预测结果相同，因为它们

都来源于相同的原始转基因植株，都是在相同的生理时期和条件下进行测定的（表3）。

表 3 大田种植的 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白含量

杂交种/组织	提取的总蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)	测定的 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)	测定的 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 鲜重)	估计的总 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)
X4334CBR 叶片	26.5 (1.5)	161 (16)	4.3 (0.66)	27.0 (4.2)
苞叶	5.23 (1.7)	220 (18)	1.1 (0.26)	5.6 (1.3)
茎	4.71 (1.2)	146 (2.6)	0.71 (0.11)	3.0 (0.5)
籽粒	30.8 (1.1)	38 (5.3)	1.5 (0.21)	4.9 (0.7)
X4734CBR 叶片	31.2 (2.7)	163 (9.6)	5.05 (0.35)	31.8 (2.2)
苞叶	5.25 (0.6)	170 (12)	0.84 (0.18)	4.2 (0.9)
茎	3.9 (0.4)	145 (18)	0.55 (0.06)	2.3 (0.25)
籽粒	35.2 (4.3)	43 (5.7)	1.3 (0.28)	4.2 (0.89)
X6534CBR 叶片	21.6 (2.1)	333 (71)	5.3 (0.90)	33.2 (5.7)
苞叶	2.9 (0.3)	280 (29)	0.79 (0.03)	3.9 (0.2)
茎	1.3 (0.1)	495 (43)	0.64 (0.04)	2.6 (0.2)
籽粒	26.6 (1.0)	56 (3.3)	1.50 (0.04)	4.7 (0.13)
X7634CBR 叶片	24.0 (1.3)	216 (24)	5.24 (0.78)	33.0 (4.9)
苞叶	3.88 (0.3)	271 (64)	1.04 (0.23)	5.2 (1.2)
茎	2.09 (0.3)	254 (23)	0.53 (0.06)	2.2 (0.25)
籽粒	27.1 (0.5)	58 (5.5)	1.60 (0.13)	5.0 (0.42)

*括号中是平均标准差。

**用提取估量值调整实际测量值：叶=15.9%，苞叶=20.0%，茎=24.1，谷粒=31.3%。

PAT蛋白在Bt11玉米中的表达

通过 ELISA 分析了 Bt11 玉米中 PAT 蛋白的水平。供试材料为两个转基因杂交种 X4334CBR 和 X4734CBR，种植在明尼苏达州 Stanton 的试验田中，每个杂交种取 3 个单株。分析的组织包括叶片、根、茎、花粉、花丝、雄穗和籽粒等组织。籽粒样品为成熟种子。

组织抽提物稀释至 0.40 mg/ml 总蛋白浓度，以使检测背景最低。在这个水平上，有些样品的 PAT 水平较低。最低检测极限（LOD）设定为 1 ng/ml，此水平以下的测定值被认为是负值。结果显示，叶片和雄穗样品中的 PAT 蛋白水平较高，花丝中也能检测出 PAT 蛋白，但在根、花粉和籽粒中的 PAT 蛋白低于 LOD 值（表 4）。

表 4 Bt11 转基因玉米各组织中 PAT 蛋白水平

组织/杂交种	PAT 蛋白测定值* (ng PAT/ml 抽提物)	提取的总蛋白* (mg 蛋白/gfw)	PAT 含量** (ng PAT/gfw)
雄穗: 对照	[-0.014]	12.1	[0]
X4734CBR	0.86 (0.44)#	12.2 (0.67)	24.7 (7.0)
X4334CBR	0.91 (0.21)#	12.3 (1.6)	27.2 (7.0)
叶片: 对照	[-0.179]	8.4	[0]
X4734CBR	1.95 (0.07)	10.2 (1.14)	49.4 (5.2)
X4334CBR	1.67 (0.11)	9.48 (1.24)	38.6 (2.94)
籽粒: 对照	1.06	30.37	80.8
X4734CBR	[0.96]	26.8	[50.7]
X4334CBR	[0.77]	17.9	[43.7]
花粉: 对照	[0.88]	58.9	[141]
X4734CBR	[0.60]	78.7	[110]
X4334CBR	[0.13]	77.1	[26.3]
花丝: 对照	[0.307]	3.31	[0]
X4734CBR	0.34 (0.34)#	1.93 (0.20)	1.91 (1.9)
X4334CBR	0.84 (0.63)#	2.19 (0.21)	4.97 (2.4)
茎秆: 对照	[-0.306]	1.90	[0]
X4734CBR	[0]	2.34 (0.14)	[0]
X4334CBR	[0.04 (0.04)]	2.18 (0.31)	[0.22 (0.22)]
根: 对照	[0.093]	1.40	[0.46]
X4734CBR	[0.77 (0.66)]	1.80 (0.27)	[4.04 (0.46)]
X4334CBR	[0.21 (0.06)]	1.36 (0.07)	[1.02 (0.28)]

* 程序中测定下限 (LOD) 设定为 1 ng/ml。所有负数和黑体数据不高于对照，列于方括号中。园括号中数据为标准差。

平均值低于 LOD，但其中一个或多个重复样本高于 LOD，因此也被认为是显著的。

5.2.6.3 插入序列表达的稳定性

Southern 杂交分析表明 *cry1Ab* 和 *pat* 基因在不同世代 (BC1, BC3, BC5) 的 Bt11 玉米中稳定存在 (参见 5.3.1 部分)。

本申请书 5.2.6.2 节所述的研究采用了不同杂交种的蛋白表达量，实验结果也证明了 Cry1Ab 和 PAT 蛋白在这些实验中能够稳定表达。

5.2.7 根据上述评价，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，通过一系列的对插入序列及其表达的分析，导入 Bt11 玉米的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因并没有增加受体植物的危险性，因此这种基因操作属于类型 2。

5.3 转基因植物安全性评价

5.3.1 转基因植物的遗传稳定性

Southern 杂交实验

通过 Southern 杂交分析了 Bt11 玉米多个世代（BC1，BC3，BC5）中插入片段的遗传稳定性。分别以 *cry1Ab* 和 *pat* 特异性探针进行 Southern 杂交，结果表明不同世代的 Bt11 玉米 DNA 显示为一致的杂交条带，表明 Bt11 玉米的插入片段在多世代遗传中是稳定的。图 13 和图 14 分别为以 *cry1Ab* 探针和 *pat* 探针，经 *NdeI* 酶切消化的玉米基因组 DNA 进行 Southern 杂交的结果。

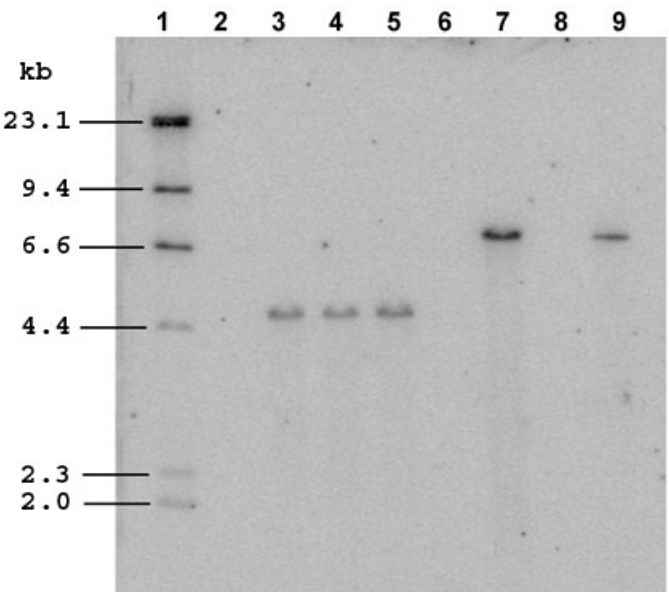


图 13 Bt11 玉米世代遗传稳定性 Southern 分析结果（*cry1Ab* 探针）

玉米基因组 DNA（7.5 μ g）用 *NdeI* 限制性内切酶消化，电泳后转移至 Zeta-Probe® GT 膜，并用 *cry1Ab* 特异性探针（1848 bp）进行杂交。

泳道 1：分子量标准(Lambda DNA-*HindIII* ladder, New England Biolabs Cat. No. N3012S)；

泳道 2：空白；

泳道 3：Bt11 BC1 DNA 酶切产物；

泳道 4：Bt11 BC3 DNA 酶切产物；

泳道 5：Bt11 BC5 DNA 酶切产物

泳道 6：BC5 阴性对照酶切产物；

泳道 7：BC5 阴性对照酶切产物+ 10.2 pg *NdeI/HindIII* 酶切的 pZO1502 质粒 DNA；

泳道 8：空白；

泳道 9：10.2 pg *NdeI/HindIII* 酶切的 pZO1502 质粒 DNA。

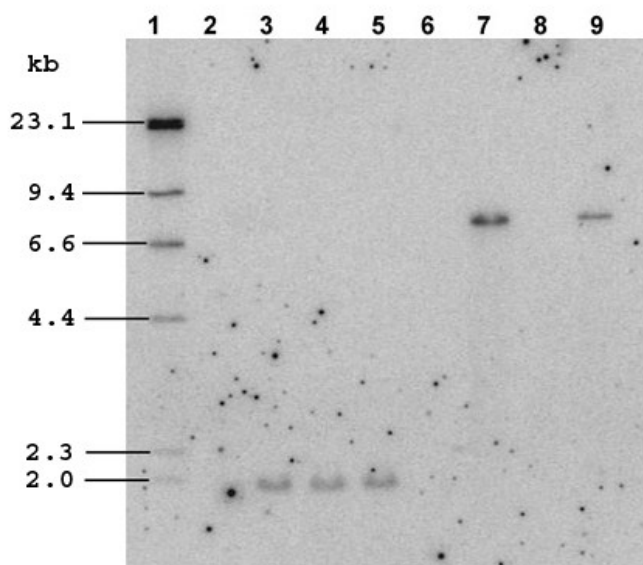


图 14 Bt11 玉米世代遗传稳定性 Southern 分析结果 (*pat* 探针)

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *Nde*I 限制性内切酶消化，电泳后转移至 Zeta-Probe[®] GT 膜，并用 *cry1Ab* 特异性探针 (1848 bp) 进行杂交。

泳道 1: 分子量标准 (Lambda DNA-*Hind*III ladder, New England Biolabs No. N3012S) ;

泳道 2: 空白;

泳道 3: Bt11 BC1 DNA 酶切产物;

泳道 4: Bt11 BC3 DNA 酶切产物;

泳道 5: Bt11 BC5 DNA 酶切产物

泳道 6: BC5 阴性对照酶切产物;

泳道 7: BC5 阴性对照酶切产物+ 10.2 pg *Nde*I/*Hind*III 酶切的 pZO1502 质粒 DNA;

泳道 8: 空白;

泳道 9: 10.2 pg *Nde*I/*Hind*III 酶切的 pZO1502 质粒 DNA。

孟德尔分离试验

为了确定 Bt11 玉米的遗传稳定性，通过性状分离实验，观察多个世代目的基因 (*cry1Ab*) 和抗除草剂选择标记基因 (*pat*) 的表达。经过检验确认带有 *cry1Ab* 和 *pat* 基因的 F1 植株自交产生 S1 代株系，具 Bt11 性状的植株再分别与非转基因对照 H8540 和 977 玉米回交，然后再自交或不自交。用欧洲玉米螟接种并限量喷施除草剂 (把 1% 草铵膦溶液涂抹到叶尖，以避免对敏感玉米植株产生严重伤害)。受检植株应表现为或抗欧洲玉米螟，或抗草铵膦，或对两者都敏感。

通过分离比例分析，证明 *cry1Ab* 和 *pat* 基因以单显性位点遗传，并且 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因是紧密连锁的，总是一起分离 (表 5)。

表 5 Bt11 转基因玉米对玉米螟和除草剂草铵膦反应的分离比例

世代（遗传背景）	植株数	期望分离比	观察分离比	χ^2
BC3 (H8540)	1010	505 : 505	498 : 512	0.195*
BC6 (H8540)	1011	505 : 506	524 : 487	1.355*
BC2 (H8540)	64	32 : 32	29 : 35	0.578*
BC3 (H8540)	232	116 : 116	110 : 122	0.625*
BC3S1 (H8540)	72	54 : 18	51 : 21	0.796*
BC3S2 (H8540)	72	54 : 18	53 : 19	0.129*
BC3S2 (H8540)	142	142 : 0	142 : 0	-
BC4 (H8549)	597	298 : 299	288 : 309	0.740*
BC5 (H8549)	410	205 : 205	214 : 196	0.792*
BC6S2 (977)	48	48 : 0	48 : 0	-
BC6S2BC1 (977)	216	216 : 0	216 : 0	-
BC6S2BC2 (977)	432	216 : 216	215 : 217	0.011*

*: 在 $p = 0.05$ 时不显著 ($\chi^2 = 3.84$)

5.3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异

通过四代回交选育，将含有 *cry1Ab* 基因的染色体片段导入不同遗传背景的玉米自交系中。分别以自交系 2043、2044 玉米作为轮回亲本，将 Bt11 玉米与上述两种自交系回交，分别得到了 2043 代换系（2043 conversion）和 2044 代换系（2044 conversion）。并通过在美国和加拿大多个试验点，验证这些 BC4 世代代换系具有与其轮回亲本相似的农艺性状。具体测量的性状包括：谷物产量、谷物含水量、茎秆倒伏率、基根倒伏率、穗位高、株高、至吐丝期所需积温、至散粉期所需积温、植株受损度。所得数据经过 SAS GLM 进行方差分析。

统计结果如下表。每个性状列出两个显著性分析结果，以表 6 中数据为例，其中第二列为轮回亲本 2043 玉米与全部 2043 代换系所配组合平均值的显著水平比较。第三列为轮回亲本 2043 玉米与回交代换系中农艺性状与轮回亲本最相似的系所配组合的显著水平比较。

结果表明，在轮回亲本 2043（2044）和代换系所配组合中，均未检测到差异的性状包括：籽粒产量，籽粒含水量，根倒伏率，穗位高，株高。结果说明，转基因植株已经很好地继承了作为轮回亲本的除编码 Cry1Ab 蛋白遗传片段的其他玉米基因组的性状。其次，也证明名了 *cry1Ab* 基因插入，并未对除 *cry1Ab* 基因功能以外的其他农艺性状造成重大影响。具体结果详见附件 10.9。

表 6 2043 对代换系农艺性状比较

性状	原始系 2043 对代换系	原始系 2043 对最优代换系
产量（蒲式耳/英亩）	NS ¹	NS
籽粒含水量（%）	*	NS
茎倒伏 ²	***	***
根倒伏 ²	NS	NS
穗位高（cm）	NS	NS
株高（cm）	NS	NS
吐丝积温	NS	NS
散粉积温	NS	NS
植株未受损度 ²	***	**

1.NS=不显著；*，** 和***分别表示 未达到显著水平，及 0.05，0.01 和 0.001 的显著水平

2 较低的数值表示该性状较好的结果

表 7 2044 对代换系农艺性状

性状	原始系 2043 对代换系	原始系 2043 对最优代换系
产量（蒲式耳/英亩）	NS ¹	NS
籽粒含水量（%）	NS	NS
茎倒伏 ²	***	***
根倒伏 ²	NS	NS
穗位高（cm）	NS	NS
株高（cm）	NS	NS
吐丝积温	*	NS
散粉积温	*	NS
植株未受损度 ²	***	*

1.NS=不显著；*，** 和***分别表示 未达到显著水平，及 0.05，0.01 和 0.001 的显著水平

2 较低的数值表示该性状较好的结果

5.3.2.1 生殖方式和生殖率

Bt11 玉米已经在许多国家商业化种植多年，通过在美国和加拿大多个试点的田间表现已经证明，Bt11 玉米在产量和农艺性状等方面与亲本对照玉米没有差别。因此可以推测 Bt11 玉米与普通对照玉米在繁殖方式和繁殖率上无差异。

5.3.2.2 传播方式和传播能力

通过在美国和加拿大多个试点的田间表现已经证明，在产量和农艺性状上 Bt11 玉米与亲本对照玉米无显著差异，可以推测两者在传播方式和传播能力方面没有差异。

5.3.2.3 休眠期

Bt11 玉米基因转化的目的是加强玉米的抗虫性，而不是改变其休眠特性。通过在美国和加拿大多个试点的田间表现已经证明，在产量和农艺性状上 Bt11 玉米与亲本对照玉米无显著差异，可以推测两者在玉米休眠性上没有差别。

5.3.2.4 适应性

Bt11 玉米基因转化的目的是加强玉米的抗虫性，没证据表明转基因后改变其适应性。农艺性状观察试验表明 Bt11 玉米与亲本对照玉米在适应性上没有差别。

5.3.2.5 生存竞争能力

Bt11 玉米基因转化的目的是加强玉米的抗虫性，而不是改变其生存竞争能力。农艺性状观察试验表明 Bt11 玉米与亲本对照玉米在生存竞争能力上没有差别。

另外，2002-2003 年在农业部指定的检测机构，即吉林省农科院生物技术研究中心及山东省农业科学院植物保护研究所，对 Bt11 玉米进行了生存竞争能力检测，结果如下，

荒地条件下生存竞争能力的检测：

2002-2003 年吉林省农科院生物技术研究中心和山东省农业科学院植物保护研究所的研究表明，在表面撒播的条件下，转 *cry1Ab* 基因抗虫玉米 Bt11 及对照的出苗率均较低。说明 Bt11 玉米与普通玉米一样，其籽粒由于各种原因洒落在地表面，出苗率低甚至不出苗。

5cm 深播情况下，Bt11 玉米及其非转基因对照种子出苗率相对较高。Bt11 玉米及非转基因对照在长势、株型、生育期等方面无差异。深播、撒播及对照区杂草种类基本相同。玉米和杂草覆盖度随调查时间依次增加，Bt11 玉米及其非转基因对照玉米区玉米和杂草覆盖度大小和增幅基本一致，且差异不显著。撒播区杂草覆盖度均低于深播区，试验区杂草覆盖度显著低于空白对照区。

栽培地条件下生存竞争能力检测：

2003 年吉林省农科院生物技术研究中心和山东省农业科学院植物保护研究所的研究表明，栽培地 Bt11 玉米及其非转基因对照玉米在长势、株型、各生育期株高等方面无显著差异。Bt11 及其非转基因对照玉米在产量方面没有显著差异。Bt11 玉米在生长、繁殖和发芽率等方面，没有显示出比普通玉米有更强的生存竞争能力。

转基因玉米自生苗：

玉米在山东省济南市能够越冬，但次年春天出苗率较低，越冬性较差。根据山东省农科院植保所在 2003 年 5，6 月对上一年试验后的自生苗的调查结果，Bt11 玉米与非转基因对照小区都未能发现自生苗的存在。试验过程中没有发现 Bt11 玉米对试验区内及周围植物种类有影响作用。

上述试验结果均证实了 Bt11 玉米与非转基因对照玉米在生存竞争能力上无显著差异，Bt11 玉米并没有因为引入抗虫特性而改变玉米固有的遗传性状。

5.3.2.6 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

玉米花粉直径较大（0.1 mm），传播距离很近，绝大多数花粉散落在周围 60 米范围内（Raynor et al. 1972; Luna et al. 2001; Burris, 2002）。在自然条件下，玉米花粉存活时间较短（一般小于 60 分钟）。这两个原因排除了花粉长途传播导致杂交授粉的可能性。目前还没有证据表明玉米的遗传物质能够与动物和微生物交换。因此，转基因玉米的遗传物质向其他植物、动物和微生物发生转移的可能性极小。另一方面，由于我国不存在与玉米亲缘关系很近的植物，因此转基因玉米目的基因向也不大可能向其它植物转移。因此，在自然条件下，Bt11 玉米的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因被转移到动物或细菌并在其中得到表达的可能性非常小（Bertolla and Simonet, 1999; Nielsen et al. 2000）。

5.3.2.7 转变成杂草的可能性

通过美国农业部（USDA）对 Bt11 玉米的环境评估分析认为：1）Bt11 玉米与传统技术繁殖的抗虫玉米一样不会像杂草一样无限生长；2）Bt11 玉米与野生型植物发生基因渗入现象的可能性极小，不会增加它们后代成为杂草的可能性。

另外，根据 2002 年，国内检测单位承担由农业部下达的对进口用作加工原料的转基因抗虫、抗除草剂玉米开展的生存竞争能力检测结果来看，没有发现这些转基因玉米有杂草化的趋势。根据吉林省农科院和山东省农科院对 Bt11 玉米生存竞争能力检测结果显示，Bt11 玉米与其对照非转基因品种，在荒地杂草的生存竞争及在栽培地的株高和发芽率等方面表现均没有显著差异，表明抗虫基因的转入没有增强受体原来生存竞争能力，因此也不会增加其杂草化趋势。

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

国外有关 Bt11 玉米对靶标生物的防治效果

Cry1Ab 蛋白对鳞翅目幼虫有毒性，低剂量摄入会降低重量增长，较高剂量摄入则会致死。为了评价 Bt11 玉米对靶标昆虫的效果，在美国进行了一系列实验，以下主要列出 Bt11 玉米对美国两种主要鳞翅目昆虫（欧洲玉米螟和玉米穗蛾）的抵抗能力。研究结论如下：

欧洲玉米螟（ECB）

欧洲玉米螟（ECB 或 *Ostrinia nubilalis*）是美国首要的鳞翅目玉米害虫。Bt11 玉米对该害虫的抵抗能力的研究表明：

- 将新鲜的 Bt11 玉米粒加入新生幼虫的单一食物源中进行实验，结果表明新生幼虫体重无法增加，并且无法存活到实验结束；
- 与非 Bt 玉米相比，Bt11 玉米穗中的幼虫数减少了 95%；
- Bt11 玉米秆中的幼虫数及相关的虫洞损害可忽略或没有；
- 与非 Bt 玉米穗相比，在 Bt11 玉米穗中存活到收获季节的幼虫大约小 2 个龄期。既往的研究表明只有达到第 5 龄期的幼虫才能越冬。

玉米穗蛾（CEW）

玉米穗蛾（CEW 或 *Helicoverpa zea*）是美国第二大玉米害虫。在实地栽培试验中，给新生和 3 天龄的幼虫饲 Bt11 甜玉米的叶片，二者的死亡率都是 100%。这些试验结果与对第 1 代 CEW 的实验结果相当。检验 Bt11 玉米效力的实地栽培实验得到以下结论：

- Bt11 玉米穗被虫蚀的比例明显低于非 Bt 玉米；
- Bt11 玉米上的幼虫数量明显少于非 Bt 玉米；
- 收获时在 Bt11 玉米上的幼虫比非 Bt 玉米平均低两个龄期；
- 由于 Bt11 玉米中 Bt 的高水平表达，幼虫很难存活到完全发育成熟。能够耐受而存活下来的幼虫也表现出明显的发育迟缓。

总之，这些数据表明 Bt11 玉米表达的 Cry1Ab 蛋白对一些玉米靶标害虫（ECB、CEW）有较强的毒杀作用。

国内检测机构有关 Bt11 玉米对靶标生物影响的研究：

2003 年在农业部指定的检测机构中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心分别对 Bt11 玉米的生物多样性进行了研究，有关 Bt11 玉米对靶标生物的检测结果显示如下：

中国农业科学院植物保护研究所的检测结果表明：Bt11 玉米对靶标害虫玉米螟有很好的控制作用，存活的幼虫数量较小，蛀孔隧道长度较短。由于 2003 年玉米螟的发生较轻，对照玉米及当地非转基因玉米农大 108 上玉米螟幼虫数量较少，危害较轻，因此 Bt11 与对照品种在幼虫存活、蛀孔隧道长度上均差异不显著。仅与农大 108 在幼虫存活上差异显著。

对穗期棉铃虫的控制效果，Bt11 玉米雌穗上没有棉铃虫幼虫存活，但因为对照和农大 108 雌穗上存活的幼虫数量较少，因此差异不显著。但在雌穗被害长度上，Bt11 玉米雌穗的被害长度显著低于非转基因对照品种和当地非转基因玉米农大 108，说明 Bt11 玉米对棉铃虫的危害有一定的控制作用。

桃蛀螟由于发生较晚，大多在灌浆期后期才在玉米雌穗上危害。桃蛀螟幼虫在 Bt11 玉米雌穗上的幼虫的存活数量和造成的隧道长度，显著高于其非转基因对照和农大 108，说明 Bt11 玉米不能控制桃蛀螟危害。

吉林省农科院生物技术研究中心的检测结果表明，试验所用当地常规品种吉单 209 是一个在生产上普遍种植的抗螟性较好的玉米杂交种，而转基因玉米 Bt11 的抗螟能力较之更为优良。

国外有关 Bt11 玉米对非靶标生物影响的研究

通过评估美国其他对农业有益的生物体或濒危物种，结果表明 Bt11 玉米对有益生物体及非靶标生物体无任何影响。其它无脊椎动物及所有的脊椎动物，包括非靶标鸟类、哺乳类动物及人也不受 Cry1Ab 蛋白的影响，因为他们不含有靶标昆虫肠道表皮细胞所含有的受体蛋白。而其他一些濒危、濒临灭绝的鳞翅类昆虫不以玉米为食。因此，认为 Bt11 玉米不会对有益于种植或农艺的生物体产生负面影响，同时也不会影响非靶标生物和濒危物种。

国内检测结构有关 Bt11 玉米对非靶标生物影响的研究

2003 年在农业部指定的检测机构，中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心分别对 Bt11 玉米对生物多样性的影响进行了研究，有关 Bt11 玉米对非靶标生物的检测结果显示如下，

对天敌昆虫种群优势度的影响：

中国农科院植物保护研究所的检测结果表明，在整个玉米生育期，玉米田的主要天敌为瓢虫类、小花蝽类、蓟马和蜘蛛类的捕食性天敌。在瓢虫中，主要以龟纹瓢虫为主，其次为食螨瓢虫，异色瓢虫较少。寄生性天敌以小蜂和茧蜂类为主。蚜虫、叶甲和叶螨在各类玉米田中均为优势种害虫，Bt11 玉米田和对照田的优势物种无明显差异，说明 Bt11 玉米对玉米田昆虫群落没有明显的影响。

对天敌昆虫种群数量的影响:

中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心的检测结果表明, 转基因玉米品种 Bt11 与其非转基因对照玉米在整个生育期的天敌总量几近一致, 没有明显的差异。

转基因玉米对生物群落多样性的影响

中国农科院植物保护研究所的检测结果表明, 转基因抗虫玉米 Bt11 对田间节肢动物多样性, 在物种生态优势度、天敌总量、捕食性天敌的种群动态上, 同其非转基因对照相比, 没有显著的影响, 说明转基因玉米 Bt11 对玉米田节肢动物多样性没有明显的影响。虽然在某些指标上, Bt11 玉米及其对照与当地非转基因常规玉米农大 108 有一定的差异, 但这种差异是不同品种间造成的, 与转基因本身无关。

上述对非靶标生物影响的研究表明, Cry1Ab 蛋白对非靶标生物没有不利影响, 因此 Bt11 玉米仅对靶标生物表现出抗性, 而对非靶标生物没有不利影响。

5.3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用

Bt11 玉米能够抗谷类作物中钻孔的昆虫, 欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 和西非大螟 (*Sesamia nonagrioides*)。此种毒蛋白对亚洲玉米螟 (*O. furnacalis*) 亦有同样或相似的抗性, 对中国种植玉米的广大农民大有帮助。中国玉米栽种以一般年份玉米螟为害情形, 每年产值损失人民币 10 亿元至 30 亿元之间。如 Bt11 玉米对亚洲玉米螟亦有与欧洲玉米螟相同的抗性时, 则种植 Bt11 玉米, 至少可增加收益 10 亿人民币以上。同时, 将显著减少农药的使用, 改善农业生态环境。

5.3.3 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。

5.3.3.1 毒性

在 Bt11 转基因玉米中导入了两个基因, 因而产生两种蛋白, 一种是 Cry1Ab 蛋白, 来自苏云金芽孢杆菌株系 HD-1; 另一种是 PAT 蛋白, 来自绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*)。本节分别提供有关 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白的毒理学评价的相关数据和信息, 具体如下:

Cry1Ab 蛋白

Cry1Ab 蛋白作用机制:

苏云金芽孢杆菌的安全应用已经有很长的时间 (Burgens, 1981)。苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性土壤细菌。在孢子形成期间, 苏云金芽孢杆菌产生具有强烈专一化杀虫活性的晶体蛋白内含物, 这种晶体蛋白能被昆虫碱性肠液降解, 其中产生的杀虫活性蛋白与敏感昆虫肠道上皮细胞相互作用, 有证据表明杀虫蛋白在细胞膜上产生穿孔, 从而影响渗透平衡, 进而细胞膨胀并溶解。敏感幼虫停止取食, 最终死亡。对于几种 Bt 蛋白, 敏感昆虫的肠道上皮细胞都具有与其高亲和性的结合位点 (Höfte and Whiteley, 1989)。Bt 蛋白分子量较大 (约 65kD), 不挥发。因此, 从吸入和皮肤途径吸收 Bt 蛋白不太可能。另外在哺乳动物肠道细胞表面没有苏云金芽孢杆菌的蛋白 δ -内毒素的受体, 而这种受体在 Bt 蛋白活性作用中具有重要作用 (Hoffmann *et al.* 1988a, 1988b; Noteborn, 1995; Sacchi *et al.* 1986; van Rie *et al.* 1990), 因此 Bt 蛋白在哺乳动物肠道内不会发生作用。

国外认证机构对 Cry1Ab 蛋白的结论：

美国环境保护署通过审查作为杀虫剂活性成分的 Cry1Ab 蛋白的安全性后，（US Environment Protection Agent）认为：“针对这种细菌蛋白，在口服、吸入、皮肤进入、毒理学和其它生物学效应方面，已经有了足够的实验数据。通过审查这些资料，环境保护署认定在毒理学方面数据是完整的，没有发现对环境中主要哺乳动物存在安全性问题”（EPA, 1986）。其他关于 Cry1Ab 蛋白安全性的大量综述也进一步证明其对人类不存在有害影响。

Cry1Ab 蛋白在模拟胃液条件下的失活和可消化性：

应用 SDS-PAGE 和 Western 蛋白印迹的方法对 Cry1Ab 蛋白在含胃蛋白酶的模拟哺乳动物胃液（SGF）的降解情况进行了评估。试验结果显示在 SGF 溶液中，2min 后就有 90%以上的 Cry1Ab 蛋白降解，说明了 Cry1Ab 蛋白与常规食物蛋白一样，在典型的哺乳动物胃环境中易于被消化。具体结果详见附件 10.3。

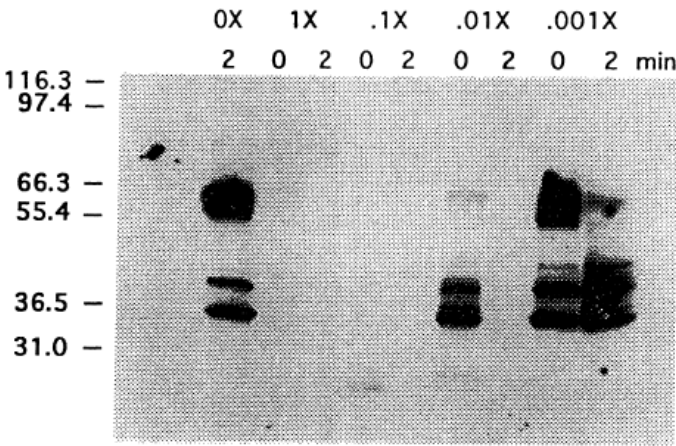


图 15 在含有不同浓度胃蛋白酶的模拟胃液中（SGF）检测 Cry1Ab 蛋白（约 65,000 摩尔 wt.）的消化情况

通过 Western 蛋白印迹法可检测经过模拟胃液消化降解的 Cry1Ab 蛋白。首先准备含有标准浓度（1X）胃蛋白酶的 SGF(人工胃液), 然后再稀释成不同梯度，分别为 0.1X, 0.01X, 0.001X 和 0X。每个泳道代表一个样品，样品起始总蛋白量为 15μg，其中 Cry1Ab 为 11 ng。分子量标准（X 10⁻³）。

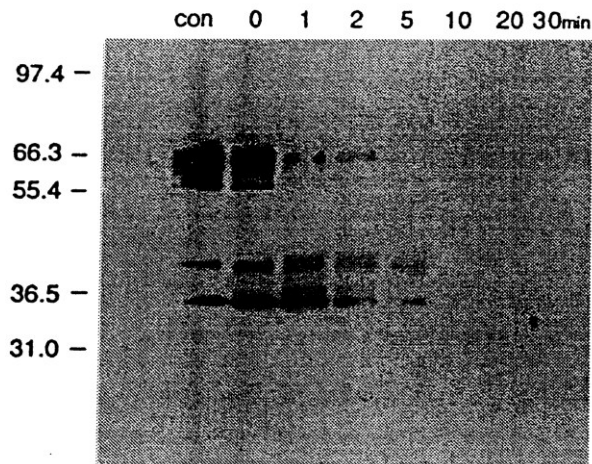


图 16 在含有 0.001X 胃蛋白酶的模拟胃液中 Cry1Ab 蛋白（约 65,000 摩尔 wt.）的不同时间的消化情况

将样品在含有 0.001X 胃蛋白酶的模拟胃液中，同时将对照在 37 °C 无胃蛋白酶的人工胃液中温浴 30 分钟。每个泳道代表一个样品，样品起始总蛋白量为 15μg，其中 Cry1Ab 蛋白为 11ng。分子量标准 ($\times 10^{-3}$)。

Cry1Ab 蛋白的小鼠急性口服毒性：

在小鼠急性口服毒性试验中，将 5 只雄鼠和 5 只雌鼠为一组，强行口服饲喂 0（对照）或 5050mg/kg 体重（Cry1Ab 蛋白测试物），以 2% w/v 水溶性羧甲基纤维素作为对照物和溶剂。研究过程中进行临床观察、测量体重和食物消耗量。处理后 14 天，将动物处死，进行尸检。取血样进行临床病理学测试，取选择的器官进行称重，将特定的组织进行处理，检测组织病理学变化。所有观察结果没有发现与 Cry1Ab 蛋白处理相关的效应， $LD_{50} > 5050\text{mg/kg}$ 体重。因此可以得出高剂量的 Cry1Ab 蛋白对小鼠没有急性毒性的结论。具体结果详见附件 10.1。

Cry1Ab 蛋白的 90 天大鼠喂养试验

2004 年在农业部农产品质量监督检验测试中心（北京）对 Bt11 玉米进行了大鼠 90 天喂养试验，检测结论如下：根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》对受试物进行 90 天喂养试验，结果表明受试物对大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响，主要脏器亦未出现特异性病理改变，90 天喂养试验结果为阴性。具体结果详见附件 10.12。

Cry1Ab 蛋白与已知毒蛋白的相似性

为确定 Cry1Ab 蛋白和已知的毒素蛋白是否存在任何显著的氨基酸序列同源性，利用 BLASTP 程序搜索了 NCBI Entrez[®] 蛋白数据库（NCBI）。结果显示，搜索到的与 Cry1Ab 蛋白具有显著同源性的 769 条蛋白序列中，没有已知或推断的毒素蛋白。具体结果详见附件 10.5。

PAT 蛋白

pat 基因编码草铵膦乙酰转移酶，这类酶在细菌和动植物细胞中普遍存在，在脂肪的合成和氧化过程中起关键作用。由于所有细胞都含有乙酰转移酶，所以，这

类酶是人类食物的一种天然组成成分。目前，没有研究表明毒性或过敏性与乙酰转移酶有关。有很多实验证明转基因 Bt11 玉米中的 PAT 安全性。有关 Bt11 玉米中 PAT 蛋白的毒理学评价的相关数据和信息，具体如下：

PAT 蛋白底物特异性：

对 PAT 酶的底物特异性研究表明：1) PAT 的底物特异性很窄，只有草铵膦和脱甲基草铵膦 (Thompson et al. 1987)；2) 对以下氨基酸没有乙酰化作用：谷氨酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酰胺、天冬酰胺酸、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸，羟脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸 (Wehrmann et al., 1996)；3) 丙二辅酶 A 和琥珀酰一辅酶 A 可作为共同底物 (Wehrmann et al. 1996)。这些结果显示 PAT 酶对草铵膦有高度的特异性，未发现 PAT 可能的内源底物。

国外认证机构对 PAT 蛋白的结论：

美国环境保护署 (EPA) 决定对所有含草铵膦乙酰转移酶 (PAT 蛋白) (其中包括 *bar* 基因和 *pat* 基因) 的农产品和遗传材料免除生产过程中必须进行抗性排除实验的要求，这项豁免包括了 *bar/pat* 基因。这进一步证明了 PAT 蛋白的安全性 (EPA, 1997)。

PAT 蛋白的模拟胃液条件下的失活和可消化性：

通过测定 PAT 蛋白在哺乳动物模拟胃液消化 (SGF) 稳定性也可以作为评价蛋白潜在毒性的内容之一。在 1X, 0.1X, 0.01X, 0.001X 标准胃酸浓度的 SGF 以及无胃蛋白酶的 SGF 环境下进行的 PAT 蛋白降解试验，结果显示在标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中，PAT 蛋白几乎在零时间内被立即降解；2 分钟之后，0.1X 或 0.01X 标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中的 PAT 蛋白刚刚降解，但在 0.001X 标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中 PAT 蛋白在缓慢降解，但还没有降解完 (图 17, 18)。这些结果都证明了 PAT 蛋白在典型的哺乳动物胃条件下敏感，很容易被降解。具体结果详见附件 10.4。

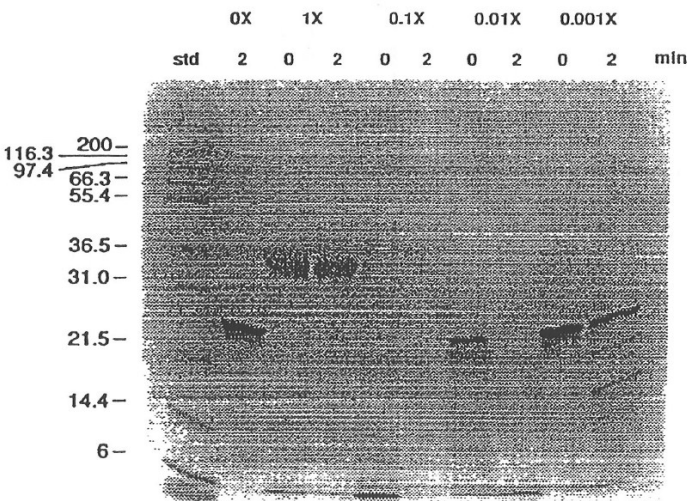


图 17 在含有不同浓度胃蛋白酶的模拟胃液中 (SGF) 中 PAT 蛋白的消化情况

通过 Western 蛋白印迹法可检测经过模拟胃液消化降解的玉米 PAT 蛋白。首先准备含有标准浓度 (1X) 胃蛋白酶的 SGF(人工胃液), 然后再稀释成不同梯度, 分别为 0.1X, 0.01X, 0.001X 和 0X。每个泳道代表一个样品, 样品起始总蛋白量为 15 μ g, 其中 PAT 为 11ng。分子量标准 ($\times 10^3$)。

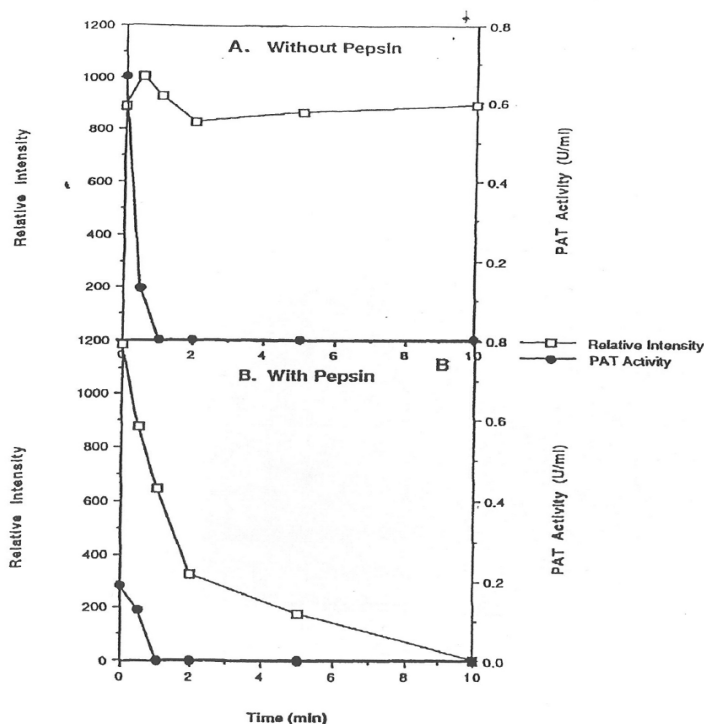


图 18 在含有 0.001X 胃蛋白酶的模拟胃液中 PAT 蛋白的消化情况

PAT 蛋白的急性口服毒性:

试验材料 (PAT 蛋白) 和对照材料都在质量体积浓度为 2% 的 CMC 悬浮为质量体积浓度为 26% 的溶液后, 并按照每千克体重 19.4 毫升的比例以强饲法喂食小鼠。第一组小鼠 (5 雄 5 雌) 服食试验物的悬浮液, 第二组小鼠 (5 雄 5 雌) 服食参照物 (PAT 蛋白对照) 的悬浮液。每一只小鼠接受的剂量都为每千克体重 5050 mg。第三组小鼠仅按照每千克体重 19.4 毫升的比例被喂食 2% 的 CMC (溶剂对照)。在小鼠存活期间 (0-14 天) 进行临床观察、称重和摄食量记录, 试验结束时对所小鼠进行安乐死并尸检, 记录任何异常现象。并保留完整的胃肠道系统, 以备日后可能进行的检查。

试验结果表明, 小鼠口服 5050 mg/kg 体重的 PAT 蛋白, 没有产生不利影响。因此, 试验结果表明 PAT 蛋白是安全的。具体结果详见附件 10.2。

PAT 蛋白的 90 天大鼠喂养试验

2004 年在农业部农产品质量监督检验测试中心 (北京) 对 Bt11 玉米进行了大鼠 90 天喂养试验, 检测结论如下: 根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》对受试物进行 90 天喂养试验, 结果表明受试物对大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响, 主要脏器亦未出现特异性病理改变, 90 天喂养试验结果为阴性。具体结果详见附件 10.12。

PAT 蛋白与已知毒蛋白的相似性:

为确定 PAT 蛋白和已知的毒素蛋白是否存在任何显著的氨基酸序列同源性，利用 BLASTP 程序搜索了 NCBI Entrez[®] 蛋白数据库（NCBI）。结果显示，搜索到的与 PAT 蛋白具有显著同源性的 3027 条蛋白序列中，没有已知或推断的毒素蛋白。具体结果详见附件 10.6。

5.3.3.2 过敏性

Cry1Ab 蛋白过敏性

为确定 Cry1Ab 蛋白氨基酸序列是否与任何已知或假定的过敏原蛋白存在序列同源性，通过两种方法搜索了 FARRP 敏原数据库（The Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Online Database），该数据库中包括 1630 条已知或假定的过敏原记录。用 FASTA 方法搜索全长序列和具有 8 个或以上相邻氨基酸序列完全匹配的方法来对比每个已知或潜在过敏原。第一个方法中没有搜索到任何与过敏原蛋白存在 35% 以上序列的同源性；第二个搜索结果中，在 FARRP 过敏原数据库中也没有搜索到任何与 Cry1Ab 蛋白具有 8 个或以上相邻氨基酸序列的同源性。研究结果证明，Cry1Ab 蛋白与已知或假定的过敏原蛋白质没有显著的氨基酸序列同源性。具体结果详见附件 10.7。

Cry1Ab 蛋白不为食物过敏原的理由还包括：Cry1Ab 蛋白非衍生自任何已知的过敏性蛋白；Cry1Ab 蛋白在一般的哺乳动物胃环境下非常容易消化。相应结论也可以在上述 5.3.3.1 节中描述。

此外，有研究表明，Bt 蛋白在玉米罐头中几乎检测不到。这表明加工过程（蒸煮或 100-110°C 下灭菌）使 Bt 蛋白失活或破坏。对于用新鲜 Bt11 玉米粒制作食品的过程也是一样的，玉米棒煮熟后才被食用的。因此，人类在食用 Bt11 玉米或其产品时不太可能接触到具活性的 Bt 蛋白。

PAT 蛋白过敏性

为确定 PAT 蛋白氨基酸序列是否与任何已知或假定的过敏原蛋白存在序列同源性，通过两种方法搜索了 FARRP 敏原数据库（The Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Online Database），该数据库中包括 1630 条已知或假定的过敏原记录。用 FASTA 方法搜索全长序列和搜索具有 8 个或以上相邻氨基酸序列完全匹配的方法来对比每个已知或潜在过敏原。第一个方法中没有搜索到任何与过敏原蛋白存在 35% 以上序列的同源性；第二个搜索结果中，在 FARRP 过敏原数据库中也没有搜索到任何与 PAT 蛋白具有 8 个或以上相邻氨基酸序列的同源性。研究结果证明，PAT 蛋白与已知或假定的过敏原蛋白质没有显著的氨基酸序列同源性。具体结果详见附件 10.8。

此外，PAT 蛋白也可能在加工过程中被破坏。PAT 蛋白在高于 45°C 条件下是不稳定的（Wehrmann et al. 1996）。Bt11 转基因玉米粒中 PAT 蛋白含量极低，加工过程中又不稳定，因此，人类在食用 Bt11 玉米或其产品时不太可能接触到具活性的 PAT 蛋白。

综上所述，Bt 蛋白与 PAT 蛋白不太可能引起过敏性。

5.3.3.3 抗营养因子

分析了 Bt11 玉米中的两种抗营养因子胰蛋白酶抑制剂和植酸，并与常规非转基因玉米进行比较。

选择 1998 年在法国大田中种植的 3 种 Bt11 玉米杂交种（Madera Bt11, Manuel Bt11 和 Magister Bt11）和与之对应的非转基因玉米杂交种（Madera, Manuel 和 Magister）。这些杂交种代表了不同的成熟类型。在收获后，用暖气干燥 42-72h 使其湿度下降到 15%，室温下储藏。分别对玉米中的胰蛋白酶抑制剂和植酸进行测定。结果表明，Bt11 玉米和非转基因对照之间并没有显著性差异（表 8）。

国内的检测结果表明，转基因玉米 Bt11 的植酸和胰蛋白酶抑制剂分别是 $7.76 \pm 0.57 \text{mg/g}$ 和 $7.16 \pm 0.38 \text{TIU/mL}$ ；亲本 NP2153 的植酸和胰蛋白酶抑制剂分别是 $7.63 \pm 0.63 \text{mg/g}$ 和 $7.67 \pm 0.58 \text{TIU/mL}$ 。二者的检测值均在文献报道的范围内，二者之间也不存在生物学意义上的差异，是实质等同的，不会对食用安全构成威胁。因此，Bt11 在抗营养因子和天然毒性成分方面的评价是安全的。

表 8 Bt11 转基因玉米与对照玉米中的抗营养因子

杂交种	样品数	胰蛋白酶抑制剂 (TIU/g)	植酸 (g/100g)
Madera Bt11	10	1220	0.46
Manuel Bt11	11	1250	0.59
Magister Bt11	12	1100	0.56
平均数±标准差		1190 ± 79	0.54 ± 0.07
Madera	16	1270	0.60
Manuel	17	1300	0.47
Magister	18	1120	0.52
平均数±标准差		1230 ± 96	0.53 ± 0.07

5.3.3.4 营养成分

营养成分的“实质等同性”是转基因作物及其产品的安全性评价的一个重要方面。实质等同性的概念是除了导入的性状之外，转基因作物的其它性状应与常规种相当，这个概念是由 WHO 和 OECD 为从现代生物技术生产的食品提供参考而引入的（OECD, 1993, 2000）。OECD 定义的“实质等同性”的概念是：在评估人类消耗一种经改造的或新的食物或食物成分的安全性时，现有的食物或食物来源可以作为比较的基准。根据准确的数据分析，性状的表现和变异必须在该性状的自然变异范围内（Food Standards Agency, 2001）。实质同等性（或不具实质同等性）可以证明一个特定转基因作物或其产品的安全性（或不安全性）。如果发现一种新的食物或食物成分基本与现有食物或食物成分相等，那么，它们在安全性方面可与现有食物相同。实质等同性本身不是一个安全评估标准，而是新食物与对应传统食物比较的一种方法。

为评估 Bt11 玉米营养成分，选择 1998 年在法国大田中种植的 3 种 Bt11 玉米杂交种（Madera Bt11, Manuel Bt11 和 Magister Bt11）和与之对应的非转基因杂交种玉米（Madera, Manuel 和 Magister）。这些杂交种代表了不同的成熟类型。在收获后，用暖气干燥 42-72h 使其湿度下降到 15%，室温下储藏。分别对以下参数进行测定，

蛋白（根据氮元素）：AOAC981.10/39.1.19/1983（Kjeldahl）

脂肪（酸水解）：BS4401Pt4:1970

纤维：TDF AOAC

能量：由各种分析结果计算得到

碳水化合物：由各种分析结果计算得到。

氨基酸：AOAC982.30/45.3.05

脂肪酸：ISO 5508：1995

胰蛋白酶抑制物：AOCS Ba12-75(1989)

植酸：Analytical Biochemistry,vol,77:536-539(1977)

检测结果如下：

组分分析：表 9 给出了组分分析的结果。以不同的杂合体为重复，做了一次 *F*-检验以测定 Bt11 杂交玉米的值与非转基因对照玉米在统计上是否有显著性差异。结果所有的测定参数都没有显著性差异（ $P=5\%$ ）。

表 9 Bt11 杂交玉米的组分分析（转基因和对照）

杂合体	样品号	能量 (KJ/100g)	碳水化合物 (%)	蛋白 (%)	脂肪 (%)	纤维 (%)
Madera Bt11	10	1417	70.6	7.3	2.5	8.4
Manuel Bt11	11	1404	67.8	8.9	2.7	8.6
Magister Bt11	12	1470	70.1	8.3	3.7	7.1
均值±方差		1430±35	69.5±1.5	8.2±0.8	3.0±0.6	8.0±0.8
Madera	16	1419	70.5	7.5	2.5	7.6
Manuel	17	1414	67.5	8.7	3.2	7.9
Magister	18	1466	68.4	8.9	4.1	7.7
均值±方差		1433±29	68.8±1.5	8.4±0.8	3.3±0.8	7.7±0.2

氨基酸：结果见表 10。根据法国 AGPM 的标准，氨基酸测定中 10%的波动被认为是可以接受的。因此，Bt11 杂合体和非转基因杂合体给出的结果是相差不多的。在比较三种 Bt11 和三种非转基因杂合体时，苏氨酸，甘氨酸和苯丙氨酸的 *F*-检验分析发现它们的含量在统计上有着显著性差异（ $P=5\%$ ），虽然这些值还在“10%的波动”之中。对于这些统计分析结果，可以认为，基于两种“处理”的标准平均差都很小（低于±10%）的事实，再考虑到重复的数量和测量的精确性，这种差异是不真实的。以前的研究中也并没有观察到这种苏氨酸，甘氨酸和苯丙氨酸浓度上的差异。

表 10 Bt11 杂交玉米的氨基酸成分（转基因和对照）

杂合体	样品号	天冬氨酸 (mg/kg)	苏氨酸 (mg/kg)	丝氨酸 (mg/kg)	谷氨酸 (mg/kg)	脯氨酸 (mg/kg)	甘氨酸 (mg/kg)
Madera Bt11	10	4540	2680	3440	14800	8320	3200
Manuel Bt11	11	5380	2860	3900	18000	8620	3290
Magister Bt11	12	5180	3010	3880	15900	8160	3070
均值±方差		5033±439	2850±165	3740±260	16233±1626	8267±234	3187±111
Madera	16	4780	2580	3570	15200	7730	2940
Manuel	17	4540	2570	3590	16400	9320	2930
Magister	18	4790	2810	3570	15500	8830	2890
均值±方差		4703±142	2653±136	3577±12	15700±625	8590±769	2920±26

表 10（续）Bt11 杂交玉米的氨基酸成分（转基因和对照）

杂合体	样品号	丙氨酸 (mg/kg)	缬氨酸 (mg/kg)	甲硫酸 (mg/kg)	异亮氨酸 (mg/kg)	亮氨酸 (mg/kg)	酪氨酸 (mg/kg)
Madera Bt11	10	5230	2620	1210	1980	8310	3830
Manuel Bt11	11	6420	3910	1190	2710	10500	4730
Magister Bt11	12	5630	3450	1410	2270	9150	4160
均值±方差		5760±606	3327±654	1270±122	2320±368	9320±1105	4240±455
Madera	16	5330	3010	1170	2000	8410	3800
Manuel	17	5730	3250	1200	1980	9240	4140
Magister	18	5440	3370	1140	2060	8710	3930
均值±方差		5500±207	3210±183	1170±30	2013±42	8787±420	3957±172

表 10（续）Bt11 杂交玉米的氨基酸成分（转基因和对照）

杂合体	样品号	苯丙氨酸 (mg/kg)	赖氨酸 (mg/kg)	组氨酸 (mg/kg)	精氨酸 (mg/kg)
Madera Bt11	10	3260	2340	2160	3480
Manuel Bt11	11	3660	2170	2310	3540
Magister Bt11	12	3700	2160	1970	3310
均值±方差		3540±243	2223±101	2147±170	3443±119
Madera	16	3040	2000	1660	2900
Manuel	17	3540	1790	1970	3360
Magister	18	3510	2110	1930	3220
均值±方差		3363±280	1967±163	1853±169	3160±236

脂肪酸：表 11 给出了软脂酸，硬脂酸，油酸，亚油酸和亚麻酸的测定结果。根据这些脂肪酸的测定，法国 AGPM 认为 10%的波动是可以接受的。依据这种标准，Bt11 玉米和非转基因杂交种显示了大体相同的脂肪酸测定结果。*F*-检验进一步证实了 Bt11 杂交玉米和非转基因对照之间并没有显著性差异（*P*=5%）。

表 11 Bt11 杂交玉米的脂肪酸成分（转基因和对照）

杂合体	样品号	软脂酸（%）	硬脂酸（%）	油酸（%）	亚油酸（%）	亚麻酸（%）
Madera Bt11	10	12.6	2.7	29.8	52.4	1.0
Manuel Bt11	11	11.0	2.4	26.5	58.2	1.3
Magister Bt11	12	13.3	2.1	26.0	56.8	0.9
均值±方差		12.3±1.2	2.4±0.3	27.4±2.0	55.8±3.0	1.1±0.2
Madera	16	10.7	2.3	26.9	57.4	1.3
Manuel	17	10.4	2.0	26.1	59.1	1.3
Magister	18	12.6	2.2	28.7	54.6	1.0
均值±方差		11.2±1.2	2.2±0.2	27.2±1.3	57.0±2.3	1.2±0.2

其他营养成分，如碳水化合物、能量、蛋白、脂肪、纤维等，通过分析表明转基因玉米和非转基因玉米在生物学上没有显著的差异。

总结来说，分析结果表明，在总蛋白水平和氨基酸水平上，Bt11 玉米与非转基因玉米没有生物学的显著差别。另外，在碳水化合物、灰分、粗纤维、水分、矿物质营养等方面，差异也不显著，因此，作为食品和动物饲料的原料，转基因玉米 Bt11 是安全的。

5.3.3.5 抗生素抗性

在 Bt11 转基因玉米中不存在编码抗生素的基因。

5.3.3.6 对人类和食品安全性的其他影响

导入 Bt11 玉米的 Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白不具有毒性（见本申请 5.3.3.1 节）；无致敏性（见本申请 5.3.3.2 节）；Bt11 玉米籽粒与非转基因玉米籽粒营养成分没有本质差别（见本申请 5.3.3.4 节）。

根据现有的科学文献资料以及上述为评价 Bt11 玉米安全性而开展的研究结果，先正达公司认为 Bt11 玉米和常规非转基因玉米一样安全。

5.3.4 根据上述评价，参照本办法第十三条有关标准划分基因植物的安全等级

Bt11 转基因玉米是以安全级别 I 的材料为受体，通过类型 2 的转基因方法培育而成的。大量研究表明，Bt11 转基因玉米对人体健康和环境安全没有危害。因此，Bt11 转基因玉米属于安全级别 I。

5.4 转基因植物产品安全性评价

5.4.1 生产和加工活动对转基因植物的安全性的影响

Bt11 玉米主要利用部分是籽粒。玉米籽粒可以加工成玉米粉、玉米淀粉、玉米油、酒精、玉米片和甜玉米等。这些玉米产品与非转基因玉米没有区别。如上所述，Bt11 转基因玉米与非转基因玉米在营养成分、抗营养因子、毒性和致敏性等方面没有本质差别。上述加工方法和加工条件没有改变关键营养成分，也不会降低 Bt11 转基因玉米的安全性。

5.4.2 转基因植物产品的稳定性

如上所述，除了导入 *cry1Ab*、*pat* 基因之外，转基因玉米 Bt11 在农艺性状、遗传稳定性、营养成分、加工稳定性等方面与其近等基因系常规玉米非常相似。导入的基因对玉米的加工过程和加工产品的稳定性没有影响。因此推测 Bt11 玉米的相关产品也是稳定的。另外，Bt11 玉米引入的遗传修饰预期不会影响玉米的收获，因此不会影响收获产品的稳定性。

5.4.3 转基因植物产品和转基因植物之间环境安全性的差异

如上所述，转基因玉米 Bt11 产品与转基因植物本身对环境都是安全的。

5.4.4 转基因植物产品和转基因植物之间 对人类健康影响的差异

Bt11 玉米与传统玉米一样安全，推论 Bt11 玉米产品也与传统玉米产品一样安全。5.3.3.6 节所述，Bt11 玉米对人类健康和食品安全与常规非转基因对照等同。

5.4.5 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

参照《农业转基因生物安全管理条例》第十四条有关标准，用转基因玉米 Bt11 制作的产品与其本身一样同属安全等级 I 级。

六、相关附件资料

附件 1 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

附件 2 目的基因与载体构建的图谱

附件 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

附件 3.1 Bt11 玉米特异性定性 PCR 检测

附件 3.2 Bt11 玉米特异性定量 PCR 检测

附件 3.3 Bt11 玉米的 Southern 杂交检测

附件 3.4 Bt11 玉米外源插入片段的全长 DNA 序列（含旁侧序列）

附件 3.5 Bt11 玉米 T-DNA 插入位点侧翼序列的 BLASTX 分析

附件 4 转基因性状及产物的检测和鉴定技术

附件 4.1 Bt11 玉米中的 Cry1Ab 和 PAT 蛋白在转基因玉米组织和整株植物中的定量研究

附件 5 转基因植物对生态环境安全和食用安全性的综合评价报告

附件 6 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

附件 7 该类转基因植物国内外生产应用概况

附件 8 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；

附件 9 境外公司出口的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

附件 10 审查所需的其它相关资料

附件 1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

cry1Ab 基因的核苷酸序列（1848bp）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

cry1Ab 基因推导的氨基酸序列（615aa）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

pat 基因核苷酸序列（552bp）：

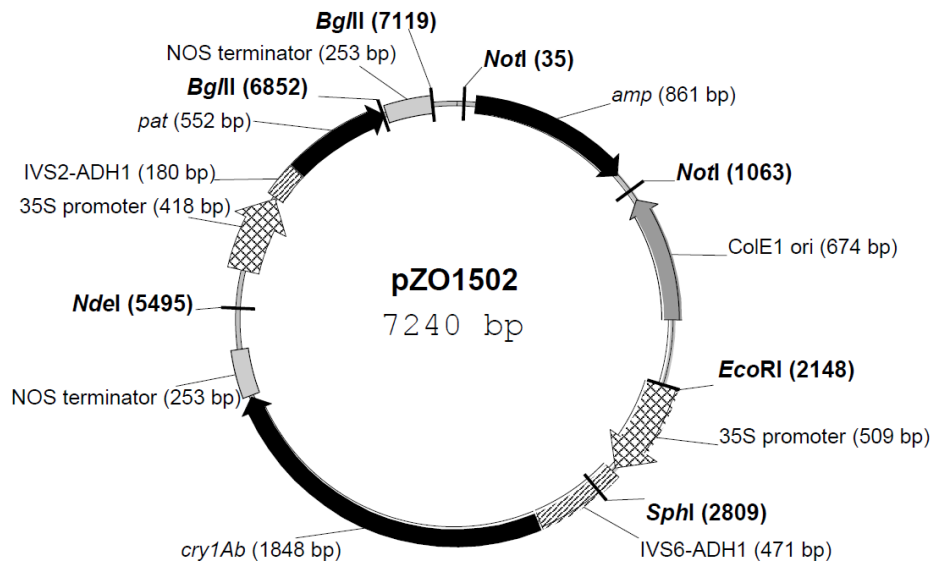
涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

pat 基因导的氨基酸序列（184aa）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附件 2. 目的基因与载体构建的图谱

Bt11 转化体所用的载体是 pZO1502，大小为 7240bp，来源于大肠杆菌，目的基因与载体构建的物理图谱如下。载体是安全的，无致病性。



附图 1 pZO1502 质粒图谱以及用于 Southern 分析的限制酶酶切位点

附表 1. pZO1502 各种功能元件描述

基因元件	大小 (bp)	功能
基因表达盒		
35S 启动子-1	509	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 和玉米中乙醇脱氢酶 (<i>adh</i>) 基因的内含子序列 VI (471bp) 形成互补, 提高玉米中的基因表达水平 (Mascarenhas <i>et al.</i> , 1990)。
IVS6-ADH1	471	玉米中的间插内含子序列 6, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049) (NCBI, 2012)
<i>cry1Ab</i>	1848	经过修饰的 <i>cry1Ab</i> 基因, 可编码一种具有抗某些鳞翅目昆虫活性的 Cry1Ab 蛋白。 <i>cry1Ab</i> 基因最初是从苏云金芽孢杆菌 var.kurstaki HD-1 中克隆获得的。原始编码序列在 3'末端被截短, 经过修饰提高其在玉米中的表达水平。但截短后剩余的 Cry1Ab 蛋白的氨基酸序列保持不变 (Perlak <i>et al.</i> , 1991)。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
选择标记表达盒		
35S 启动子-2	418	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 补充了玉米中 <i>adh1</i> 基因 (Freeling and Bennet 1985) 内含子序列 2 (180bp), 以增强基因在玉米中的表达 (Mascarenhas <i>et al.</i> 1990)。
IVS2-ADH1	180	玉米中的间插内含子序列 2, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049.1) (NCBI, 2012)。
<i>pat</i>	552	绿产色链霉菌 <i>Tu494</i> 菌株的基因, 编码选择性标记 PAT。原始编码序列经过密码子优化, 提高了在玉米中的表达水平。PAT 对含草铵膦类除草剂具有抗性。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1) (NCBI,202)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
载体组成		
Col1EL1	674	复制起始位点能促使质粒在大肠杆菌中自我复制。与 Accession Number V00268.1 (NCBI, 202)类似 (Itoh and Tomizawa,1978)。

**附件 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)**

3.1 Bt11 转化体特异性定性 PCR 检测方法

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

3.2 Bt11 转化体特异性定量 PCR 检测方法

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

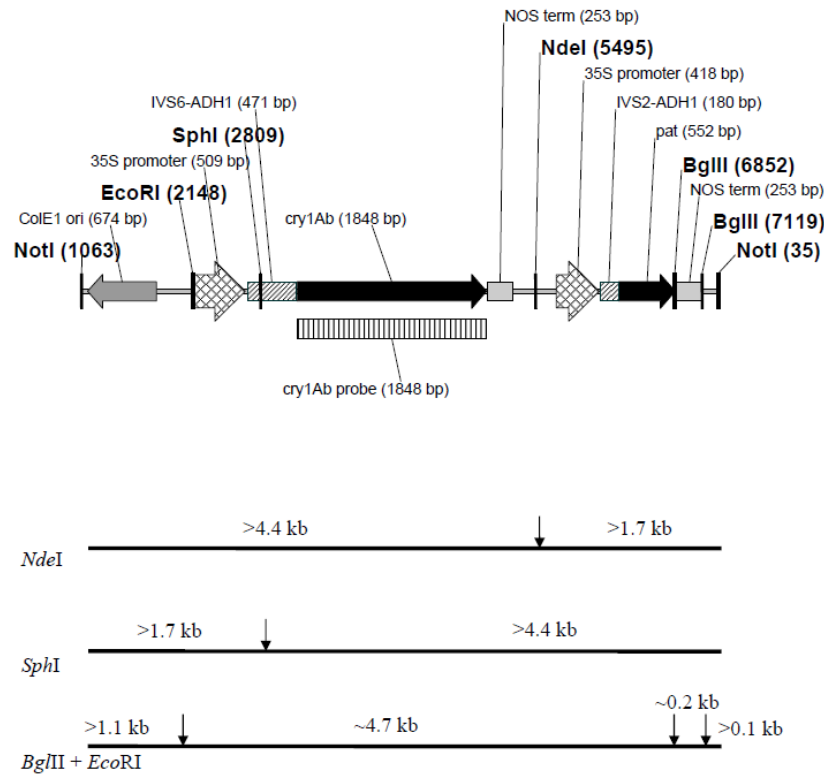
3.3 Bt11 玉米的 Southern 杂交检测结果

3.3.1 目的基因拷贝数验证

利用 Southern 杂交可以确定 Bt11 玉米中插入序列的拷贝数。基因组 DNA 取自 Bt11 玉米植株，探针是 ^{32}P 标记的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因序列。玉米基因组 DNA 分别用 *Nde*I、*Sph*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 酶切 (*cry1Ab* 探针) 和 *Nde*I、*Bcl*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 消化 (*pat* 探针)。此外玉米基因组 DNA 用 *Nde*I、*Msc*I 和 *Hind*III+*Nde*I 酶切 (骨架探针) 以验证 Bt11 玉米是否包含任何来源于载体骨架的序列。

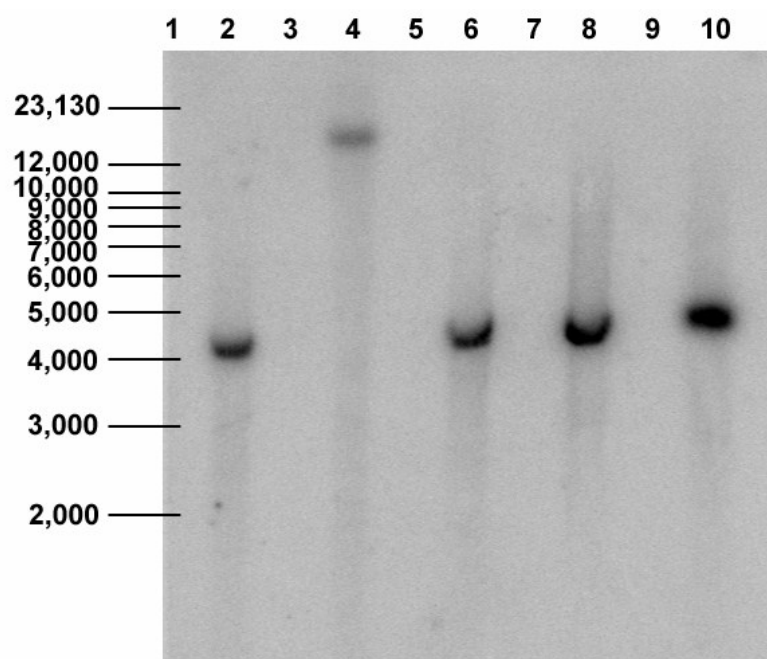
Southern 杂交结果如下图，结果表明，Bt11 玉米中插入的 *cry1Ab* 和 *pat* 基因均显示为单一杂交条带，证明两个基因均以单拷贝插入；并且 Bt11 玉米不含任何来源于载体骨架的序列。

cry1Ab 探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点如下：



附图 2 Southern 杂交选用的酶切位点以及 1848 bp *Cry1Ab* 探针在载体 pZO1502 上的位置显示了 Bt11 转化使用的载体 pZO1502 的 6.2 kb *Not*I 限制性酶切片段。黑体字标明用 *Cry1Ab* 探针进行 Southern 杂交分析时所使用的限制性酶切位点。箭头显示限制性酶消化的位置，标明了根据 pZO1502 线性图谱推算的酶切片段的大小。

cry1Ab 特异探针的杂交结果:



附图 3 Bt11 玉米用 1848 bp *cry1Ab* 特异探针 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 µg) 用 *Nde*I、*Sph*I 和 *Bgl*II+*Eco*RI 限制性内切酶消化，电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上，与 *cry1Ab*-特异性探针杂交 (1848 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Kb DNA ladder, Stratagene Cat. No. 201115-81; Lambda DNA-*Hind*III Digest ladder, New England Biolabs Cat.No. N3012S)；

泳道 2: 用 *Nde*I 消化的 Bt11；

泳道 3: 用 *Nde*I 消化的阴性对照；

泳道 4: 用 *Sph*I 消化的 Bt11；

泳道 5: 用 *Sph*I 消化的阴性对照；

泳道 6: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 Bt11 DNA；

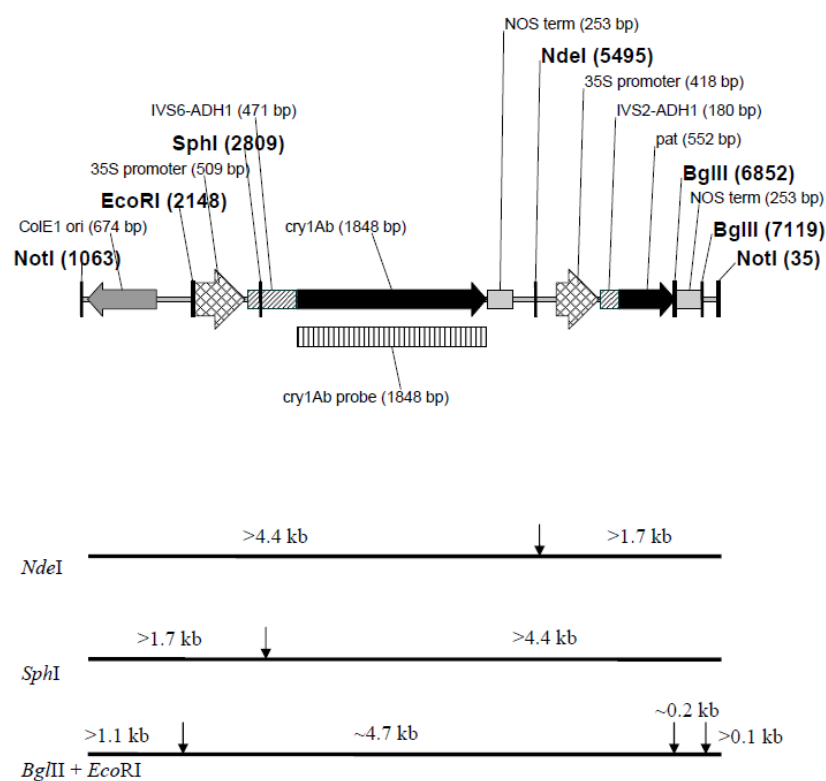
泳道 7: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性等位基因对照；

泳道 8: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照和 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA 混合；

泳道 9: 空白；

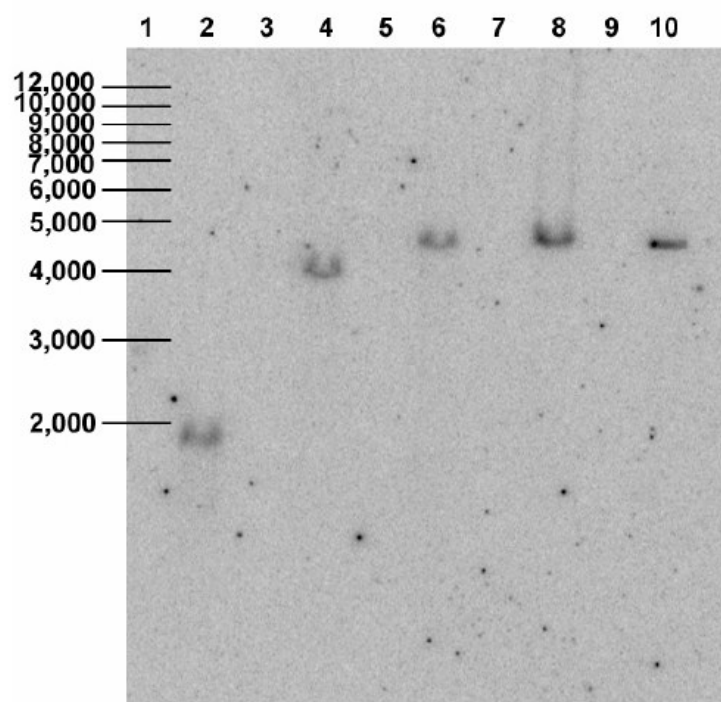
泳道 10: 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA。

pat 探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点：



附图 4 Southern 杂交选用的酶切位点以及 552 bp *pat* 探针在载体 pZO1502 上的位置显示了 Bt11 转化使用的载体 pZO1502 的 6.2 kb *NotI* 限制性酶切片段。黑体字标明用 *Pat* 探针行 Southern 杂交分析时所使用的限制性酶切位点。箭头显示限制性酶消化的位置，标明了根据 pZO1502 线性图谱推算的酶切片段的大小。

pat 特异探针的杂交结果:



附图 5 Bt11 玉米用 552bp *pat* 特异探针进行 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 µg) 用 *Nde*I、*Bcl*II 和 *Bgl*II+*Eco*RI 限制性内切酶消化，电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上，与 *Pat* 特异性探针杂交 (552 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Kb DNA ladder, Stratagene Cat. No. 201115-81)；

泳道 2: 用 *Nde*I 消化的 Bt11；

泳道 3: 用 *Nde*I 消化的阴性对照；

泳道 4: 用 *Bcl*II 消化的 Bt11；

泳道 5: 用 *Bcl*II 消化的阴性对照；

泳道 6: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 Bt11 DNA；

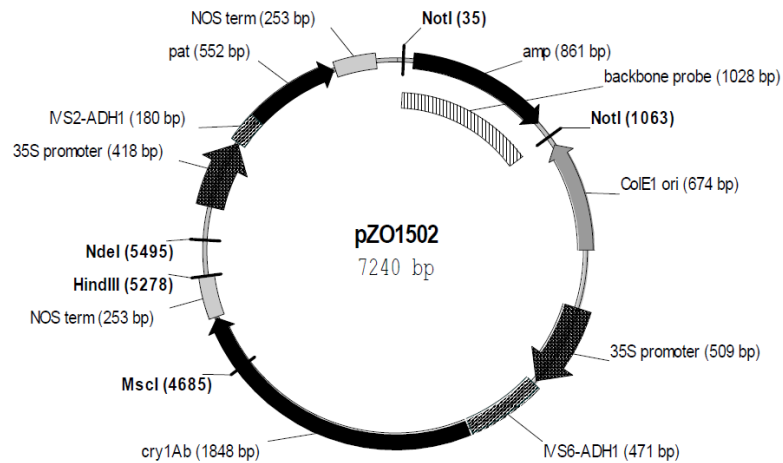
泳道 7: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照；

泳道 8: 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的阴性对照和 10.2 pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA 混合；

泳道 9: 空白；

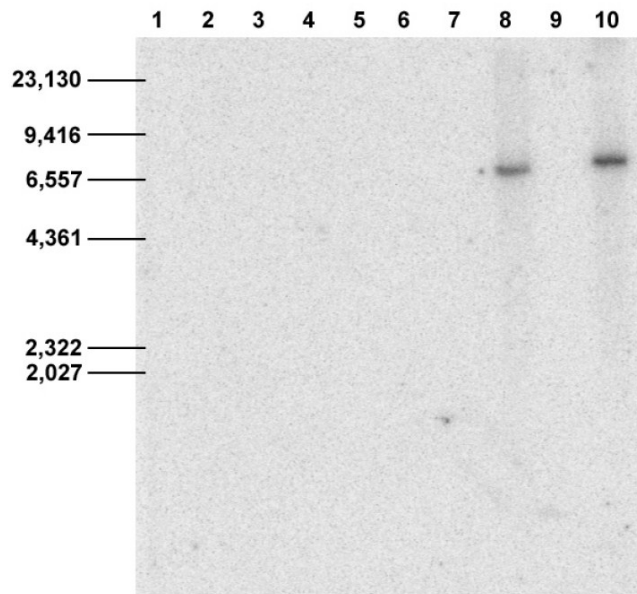
泳道 10: 10.2pg 用 *Bgl*II+*Eco*RI 消化的 pZO1502 DNA

骨架特异性探针在转化载体上的位置及杂交选用的酶切位点：



附图 6 Southern 杂交选用的酶切位点和骨架特异性探针在载体 pZO1502 上的位置

骨架特异性探针杂交结果：



附图 7 Bt11 玉米用骨架 特异探针进行 Southern 杂交结果

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *NdeI*, *MscI* 和 *HindIII+NdeI* 限制性内切酶消化, 电泳后转移到 Zeta-Probe® GT 膜上, 与骨架特异性探针杂交 (1028 bp)。

泳道 1: 分子量标准 (Lambda DNA-HindIII Digest ladder, New England Biolabs Cat. No. N3012S) ;

泳道 2: 用 *NdeI* 消化的 Bt11;

泳道 3: 用 *NdeI* 消化的阴性对照;

泳道 4: 用 *MscI* 消化的 Bt11;

泳道 5: 用 *MscI* 消化的阴性对照;

泳道 6: 用 *HindIII+NdeI* 消化的 Bt11 DNA;

泳道 7: 用 *HindIII+NdeI* 消化的阴性对照;

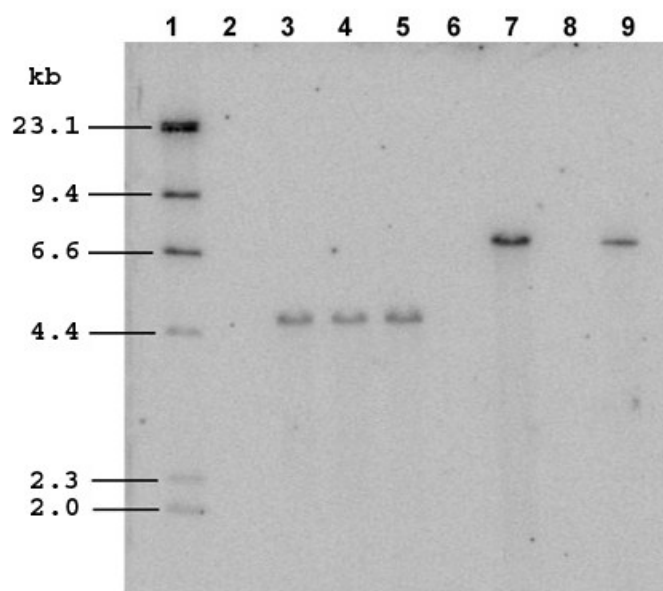
泳道 8: 用 *HindIII+NdeI* 消化的阴性对照和 10.2 pg 用 *HindIII+NdeI* 消化的 pZO1502 DNA 混合;

泳道 9: 空白;

泳道 10: 10.2pg 用 *HindIII+NdeI* 消化的 pZO1502 DNA。

3.3.2 插入片段遗传稳定性的 Southern 验证结果

通过 Southern 杂交分析了 Bt11 玉米多个世代（BC1, BC3, BC5）中插入片段的遗传稳定性。分别以 *cry1Ab* 和 *pat* 特异性探针进行 Southern 杂交，结果表明不同世代的 Bt11 玉米 DNA 显示为一致的杂交条带，表明 Bt11 玉米的插入片段在多世代遗传中是稳定的。附图 8 和附图 9 分别为以 *cry1Ab* 探针和 *pat* 探针，经 *NdeI* 酶切消化的玉米基因组 DNA 进行 Southern 杂交的结果。



附图 8 Bt11 玉米世代遗传稳定性 southern 分析结果 (*cry1Ab* 探针)

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *NdeI* 限制性内切酶消化，电泳后转移至 Zeta-Probe® GT 膜，并用 *cry1Ab* 特异性探针 (1848 bp) 进行杂交。

泳道 1: 分子量标准(Lambda DNA-HindIII ladder, New England Biolabs Cat. No. N3012S);

泳道 2: 空白;

泳道 3: Bt11 BC1 DNA 酶切产物;

泳道 4: Bt11 BC3 DNA 酶切产物;

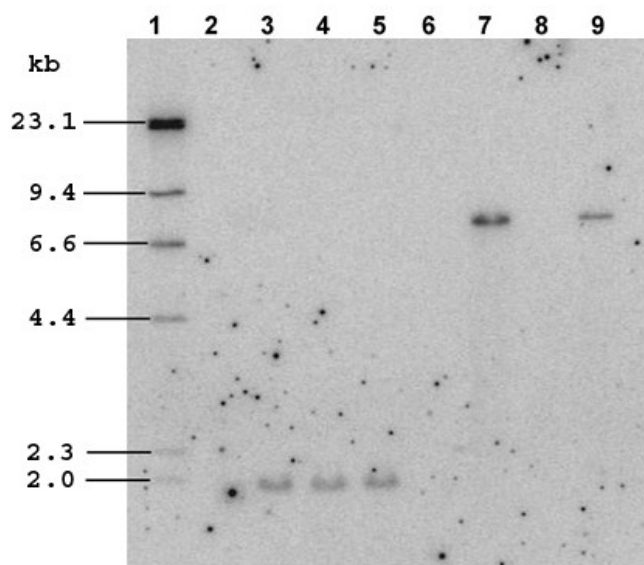
泳道 5: Bt11 BC5 DNA 酶切产物

泳道 6: BC5 阴性对照酶切产物;

泳道 7: BC5 阴性对照酶切产物+ 10.2 pg *NdeI/HindIII* 酶切的 pZO1502 质粒 DNA;

泳道 8: 空白;

泳道 9: 10.2 pg *NdeI/HindIII* 酶切的 pZO1502 质粒 DNA。



附图 9 Bt11 玉米世代遗传稳定性 southern 分析结果 (*pat* 探针)

玉米基因组 DNA (7.5 μ g) 用 *Nde*I 限制性内切酶消化, 电泳后转移至 Zeta-Probe® GT 膜, 并用 *cryIAb* 特异性探针 (1848 bp) 进行杂交。

泳道 1: 分子量标准 (Lambda DNA-HindIII ladder, New England Biolabs No. N3012S) ;

泳道 2: 空白;

泳道 3: Bt11 BC1 DNA 酶切产物;

泳道 4: Bt11 BC3 DNA 酶切产物;

泳道 5: Bt11 BC5 DNA 酶切产物

泳道 6: BC5 阴性对照酶切产物;

泳道 7: BC5 阴性对照酶切产物+ 10.2 pg *Nde*I/*Hind*III 酶切的 pZO1502 质粒 DNA;

泳道 8: 空白;

泳道 9: 10.2 pg *Nde*I/*Hind*III 酶切的 pZO1502 质粒 DNA。

3.4 Bt11 外源插入片段的全长 DNA 序列

下列序列显示了实际插入 Bt11 玉米基因组的全长 DNA 序列和插入位点的两端边界序列（1000bp）。并提供了转化事件特异性 PCR 验证时相应引物名称、序列及其扩增产物长度。

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

3.5 玉米 T-DNA 插入位点侧翼序列的 BLASTX 分析

为了确定 Bt11 插入基因是否干扰了已知的内源玉米基因。将 Bt11 插入基因侧翼的玉米基因组序列在已发表可利用的蛋白数据库内使用检索工具（BLASTX）分析进行相似性比对。结果显示，Bt11 插入基因没有干扰任何已知的内源玉米基因。

附件 4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术

Cry1Ab 蛋白在 Bt11 玉米中的表达

测定了种植于温室的 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白的水平。在植物生长的不同阶段分析多种植物组织，每个数据测定至少 5 个单株。分别对包括叶、茎、雄穗、花丝、苞叶、根以及籽粒等在内的组织进行分析。组织样品经液氮研磨后，加 6 倍体积提取液（50mM bis-Tris 丙烷、pH7.5, 5mM DTT, 0.1 mM PMSF），在 4°C 温育 30-60 分钟，11000g 离心 20 分钟，用 ELISA 法和 Bio-Rad 蛋白分析方法测定 Bt 蛋白和总蛋白的含量。所有的数据都用一个比浓度表示：ng Cry1Ab 蛋白/mg 植物提取的蛋白。

结果表明温室种植 Bt11 玉米的植物组织中均能检测到 Cry1Ab 蛋白，并且叶片中 Cry1Ab 蛋白含量最高。组织生育早期 Cry1Ab 蛋白含量一般较高。Cry1Ab 水平随着植株完全成熟和组织衰老而降低（附表 2）。

附表 2 温室种植 Bt11 玉米组织中不同生育时期 Cry1Ab 蛋白含量

组织	ng Cry1Ab 蛋白/mg 植物蛋白（播种后天数）									
	5	10	15	20	25	30	37	59	84	119
子叶	20.5 (0.4)	36 (1.7)								
根	22.1 (1.3)	11.7 (0.8)					37 (7)	12 (3.4)	18.2 (4)	2.2 (1.2)
第 2 叶		106 (4.7)	27.9 (3)	22.4 (0.9)	125 (5)	38 (1.3)	55.6 (4)			
第 5 叶				45.7 (2)	168 (5)	34 (1.3)	54 (3.3)	16.7 (1.2)		
第 10 叶							102 (6)	30 (1.5)	9.4 (1)	
第 15 叶								37.9 (2.2)	10.2 (1.1)	
茎秆表皮							36 (3.3)	10.4 (2.6)	12.6 (3.4)	9.0 (2.2)
茎髓							27 (4)	19.2 (3.1)	18.0 (4.8)	8.8 (2.0)
雄穗								8.0 (1.4)	8.8 (2.0)	6.8 (4.2)
花粉								1.25 (0.8)		
花丝								2.4 (0.6)	6.8 (1.8)	5.2 (3.8)
穗轴								13.6 (2.3)	27.2 (8.8)	5.2 (1.4)
苞叶								24.8 (2.9)	15.4 (5.3)	2.6 (2.6)
玉米棒								3.2(3.0)	26.6 (6.4)	16.2 (3.3)
气生根								3.2 (1.2)	7.0 (2.1)	4.8 (2.1)
籽粒									8.2 (2.5)	0.4 (0.4)

（括号中的数据为平均数的标准差）

此外，测定了田间种植的 Bt11 玉米不同组织中 Cry1Ab 蛋白含量。供试材料玉米杂交种 X4334CBR 和 X4734CBR 种植在明尼苏达州 Stanton，玉米杂交种 X6534CBR 和 X7634CBR 种植在伊利诺州 St Joseph。对照是具有相同遗传背景的非转基因杂交种 NK4242 和 NK7514。所有绿色健康的组织样品均达到生理成熟。所测定的玉米组织包括：叶片，由穗位叶及其相邻的上部叶片的前半部分组成；茎，穗上 20 厘米长的茎秆；苞叶，外苞叶的上部 1/3；籽粒，取自乳熟早期（水分 50-60%，Stanton 试点）和乳熟晚期（水分 40-50%，St Joseph 试点）。

结果显示，在大田种植的玉米植株中，叶片组织中 Cry1Ab 蛋白含量最高。叶片、苞叶和茎秆中 Cry1Ab 蛋白的比浓度（ng Bt 蛋白/mg 总蛋白）相近，但籽粒中显著降低。四个杂交种中 Cry1Ab 蛋白表达量相近。这与预测结果相同，因为它们都来源于相同的原始转基因植株，都是在相同的生理时期和条件下进行测定的（附表 3）。

附表 3 大田种植的的 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白水平

杂交种/组织	提取的总蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)	测定的 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)	测定的 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 鲜重)	估计的总 Cry1Ab 蛋白 (mg 蛋白/g 总蛋白)
X4334CBR 叶片	26.5 (1.5)	161 (16)	4.3 (0.66)	27.0 (4.2)
苞叶	5.23 (1.7)	220 (18)	1.1 (0.26)	5.6 (1.3)
茎	4.71 (1.2)	146 (2.6)	0.71 (0.11)	3.0 (0.5)
籽粒	30.8 (1.1)	38 (5.3)	1.5 (0.21)	4.9 (0.7)
X4734CBR 叶片	31.2 (2.7)	163 (9.6)	5.05 (0.35)	31.8 (2.2)
苞叶	5.25 (0.6)	170 (12)	0.84 (0.18)	4.2 (0.9)
茎	3.9 (0.4)	145 (18)	0.55 (0.06)	2.3 (0.25)
籽粒	35.2 (4.3)	43 (5.7)	1.3 (0.28)	4.2 (0.89)
X6534CBR 叶片	21.6 (2.1)	333 (71)	5.3 (0.90)	33.2 (5.7)
苞叶	2.9 (0.3)	280 (29)	0.79 (0.03)	3.9 (0.2)
茎	1.3 (0.1)	495 (43)	0.64 (0.04)	2.6 (0.2)
籽粒	26.6 (1.0)	56 (3.3)	1.50 (0.04)	4.7 (0.13)
X7634CBR 叶片	24.0 (1.3)	216 (24)	5.24 (0.78)	33.0 (4.9)
苞叶	3.88 (0.3)	271 (64)	1.04 (0.23)	5.2 (1.2)
茎	2.09 (0.3)	254 (23)	0.53 (0.06)	2.2 (0.25)
籽粒	27.1 (0.5)	58 (5.5)	1.60 (0.13)	5.0 (0.42)

*括号中是平均标准差。

**用提取估量值调整实际测量值：叶=15.9%，苞叶=20.0%，茎=24.1，谷粒=31.3%。

PAT蛋白在Bt11玉米中的表达

通过 ELISA 分析了 Bt11 玉米中 PAT 蛋白的水平。供试材料为两个转基因杂交种 X4334CBR 和 X4734CBR，种植在明尼苏达州 Stanton 的试验田中，每个杂交种取 3 个单株。分析的组织包括叶片、根、茎、花粉、花丝、雄穗和籽粒等组织。籽粒样品为成熟种子。

组织抽提物稀释至 0.40 mg/ml 总蛋白浓度，以使检测背景最低。在这个水平上，有些样品的 PAT 水平较低。最低检测极限（LOD）设定为 1 ng/ml，此水平以下的测定值被认为是负值。结果显示，叶片和雄穗样品中的 PAT 蛋白水平较高，花丝中也能检测出 PAT 蛋白，但在根、花粉和籽粒中的 PAT 蛋白低于 LOD 值（附表 4）。

附表 4 Bt11 转基因玉米各组织中 PAT 蛋白水平

组织/杂交种	PAT 蛋白测定值* (ng PAT/ml 抽提物)	提取的总蛋白* (mg 蛋白/gfw)	PAT 含量** (ng PAT/gfw)
雄穗: 对照	[-0.014]	12.1	[0]
X4734CBR	0.86 (0.44)#	12.2 (0.67)	24.7 (7.0)
X4334CBR	0.91 (0.21)#	12.3 (1.6)	27.2 (7.0)
叶片: 对照	[-0.179]	8.4	[0]
X4734CBR	1.95 (0.07)	10.2 (1.14)	49.4 (5.2)
X4334CBR	1.67 (0.11)	9.48 (1.24)	38.6 (2.94)
籽粒: 对照	1.06	30.37	80.8
X4734CBR	[0.96]	26.8	[50.7]
X4334CBR	[0.77]	17.9	[43.7]
花粉: 对照	[0.88]	58.9	[141]
X4734CBR	[0.60]	78.7	[110]
X4334CBR	[0.13]	77.1	[26.3]
花丝: 对照	[0.307]	3.31	[0]
X4734CBR	0.34 (0.34)#	1.93 (0.20)	1.91 (1.9)
X4334CBR	0.84 (0.63)#	2.19 (0.21)	4.97 (2.4)
茎秆: 对照	[-0.306]	1.90	[0]
X4734CBR	[0]	2.34 (0.14)	[0]
X4334CBR	[0.04 (0.04)]	2.18 (0.31)	[0.22 (0.22)]
根: 对照	[0.093]	1.40	[0.46]
X4734CBR	[0.77 (0.66)]	1.80 (0.27)	[4.04 (0.46)]
X4334CBR	[0.21 (0.06)]	1.36 (0.07)	[1.02 (0.28)]

* 程序中测定下限（LOD）设定为 1 ng/ml。所有负数和黑体数据不高于对照，列于方括号中。园括号中数据为标准差。

平均值低于 LOD，但其中一个或多个重复样本高于 LOD，因此也被认为是显著的。

附件 5. 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《转 *cry1Ab* 基因玉米 Bt11 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

附件 6. 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，其营养成分及抗营养因子分析报告等

转基因植物对食品安全性的综合评价报告请见下页《转 *cry1Ab* 基因玉米 Bt11 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

转 *cry1Ab* 基因玉米 Bt11 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告

一、摘要

Bt11 玉米是将 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因经 PEG 介导转化法转入玉米受体细胞基因组，所用转化载体为 pZ01502。其中 *cry1Ab* 基因来自苏云金芽孢杆菌株系 HD-1 (*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, Bt) (Perlak *et al.* 1991)，对玉米螟等鳞翅目害虫有抗性作用。*pat* 基因是从绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 株系 Tu494 克隆获得，编码草铵膦乙酰转移酶 (PAT 蛋白)，抗草铵膦类除草剂，在遗传转化过程中作为选择标记。

先正达公司已开展了大量研究，并结合农业部指定检测机构对 Bt11 玉米的环境和食用安全性进行了系统的评价。研究结果表明，Bt11 玉米对生态环境没有不利影响：不会影响田间杂草的自然发生率；在农艺性状、生存竞争力等方面与非转基因玉米无差异；自然条件下发生遗传物质转移的可能性很小；在生物多样性评价中，Bt11 玉米对田间主要靶标害虫有很好的控制作用；对田间非靶标生物没有产生任何不利影响。在食品安全评价上：在测定的营养成分和抗营养因子上 Bt11 玉米与普通对照玉米无显著差异；Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白在哺乳动物模拟胃液消化 (SGF) 下均很敏感，容易被降解；小鼠的急性口服毒性试验结果表明，Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白对小鼠未产生任何不良反应。在国内检测机构对 90 天大鼠喂养试验，结果证明，受试物 (Bt11 玉米粉) 对大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响，主要脏器亦未出现特异性病理改变，90 天喂养试验结果为阴性。通过生物信息学比对，Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白没有发现任何与已知或推断的毒素或过敏原氨基酸序列有同源性。

二、背景介绍

1996 年美国批准了 Bt11 玉米应用于食品、饲料和商业化种植等用途，之后相继在加拿大、日本、南非、巴拉圭、菲律宾、巴西和哥伦比亚等国家被批准商业化种植；Bt11 玉米在更多国家或地区被批准用作食品、饲料和加工原料，包括美国、欧盟、阿根廷、马来西亚、墨西哥、南非、中国、韩国、日本、菲律宾、澳大利亚、中国台湾和乌拉圭等。中国于 2004 年 4 月批准转基因玉米 Bt11 进口用作加工原料，又于 2006 年 12 月，2009 年 9 月和 2012 年 12 月再次批准转基因玉米 Bt11 进口用作加工原料的续申请。

三、受体生物学特性

3.1 受体生物分类地位与分布

受体植物为栽培玉米，学名为 *Zea mays* L.，俗名为玉米，也称为玉黍、苞谷、棒子等。在植物分类学上属于单子叶植物的禾本科、玉蜀黍属、玉米种、栽培玉米亚种。玉米是西半球起源的少数主要作物种类之一，世界各地几乎都有种植。现代玉米的确切起源多年来一直是植物学家争论的话题，尽管有证据支持起源于野生墨西哥类蜀黍和人类干预的理论 (Galiant 1988)。玉米确定不是起源于中国，引入中国的确切时间尚无定论，但根据研究，玉米大约是在 1511 年前若干年引入中国的，因为公元 1511 年《颍州志》中有关玉米的记载。

3.2 在自然界中生存繁殖能力

玉米是一年生植物，被认为没有也不可能演化为杂草。籽粒（种子）是唯一有生存力的结构。玉米籽粒的生存取决于温度、籽粒的湿度、基因型、苞叶的保护和发育阶段。极冷的温度对玉米种子发芽有不良作用，被视为玉米种子生产的主要危险。有报告说，高于 45°C 的温度对玉米种子的成活力也有损害。在玉米开花期持续高温（38°C 以上）会影响花粉的活力，进而降低玉米的结实率。玉米是比较耐旱的作物，其抗旱性主要表现在苗期，但玉米的耐盐性不高。栽培玉米作为完全驯化的植物，没有人类的管理，不能存活（Dowswell *et al.*, 1996）。

3.3 抗病、虫、草性

玉米品种间由于遗传背景不同，对玉米病虫害的抗性存在很大的差异。通过人们的多年选育，通过常规育种方法，已培育出对不同病虫害有不同程度抗性的品种，但尚未见有对杂草有抗性的玉米栽培种。

3.4 落粒性与自生苗

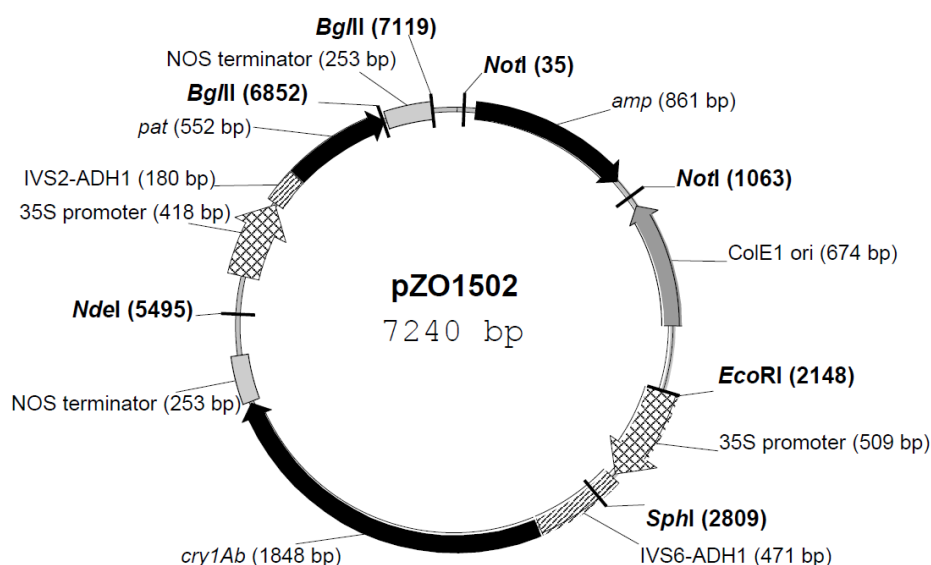
由于玉米穗的构造，籽粒生长在穗轴上，外面还有苞叶包被，籽粒很难自行脱落，单个种子的扩散在自然界很难发生。田间遗落的雌穗是因玉米植株倒折后所致，出现的自生苗也常于雌穗遗落位置成簇出现，较难发育成正常的植株发育至成熟。

3.5 安全应用史

人类食用玉米已有上千年的历史了，玉米提供给人类生存所需要的各种营养。因其漫长的栽培历史，玉米已经具有与周围生态环境共存的特性，因此，对生态环境中的许多生物是安全的。从玉米栽培到目前为止，有文字记载的历史中，没有有关玉米对人类健康和其它生物产生不利影响的记载和报道。作为人类的基本食物之一，很多地区的人们使用玉米来制备面包、小吃和发酵食品，目前，人们食用玉米所产生的健康问题，是由微生物毒素和致病性微生物引起的，并不是玉米本身所造成的。因此，玉米具有长期安全食用的历史。作为受体植物的玉米不会对人类的健康产生危害或不利的影 响，根据农业部“农业转基因生物安全评价管理办法”第九条的规定受体植物玉米的安全等级应为 I 级。

四、基因操作

Bt11 转化体所用的载体是 pZO1502，大小为 7240bp，来源于大肠杆菌，目的基因与载体构建的物理图谱如下。载体是安全的，无致病性。



附图 10 pZO1502 质粒图谱以及用于 Southern 分析的限制酶酶切位点

附表 5 pZO1502 各原件描述

基因元件	大小 (bp)	功能
基因表达盒		
35S 启动子-1	509	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 和玉米中乙醇脱氢酶 (<i>adh</i>) 基因的内含子序列 VI (471bp) 形成互补, 提高玉米中的基因表达水平 (Mascarenhas <i>et al.</i> , 1990)。
IVS6-ADH1	471	玉米中的间插内含子序列 6, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049) (NCBI, 2012)。
<i>cry1Ab</i>	1848	经过修饰的 <i>cry1Ab</i> 基因, 可编码一种具有抗某些鳞翅目昆虫活性的 Cry1Ab 蛋白。 <i>cry1Ab</i> 基因最初是从苏云金芽孢杆菌 var.kurstaki HD-1 中克隆获得的。原始编码序列在 3'末端被截短, 经过修饰提高其在玉米中的表达水平。但截短后剩余的 Cry1Ab 蛋白的氨基酸序列保持不变 (Perlak <i>et al.</i> , 1991)。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
选择标记表达盒		
35S 启动子-2	418	该启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981), 补充了玉米中 <i>adh1</i> 基因 (Freeling and Bennet 1985) 内含子序列 2 (180bp), 以增强基因在玉米中的表达 (Mascarenhas <i>et al.</i> 1990)。
IVS2-ADH1	180	玉米中的间插内含子序列 2, 来自玉米 <i>adh1</i> 基因 (Accession Number X04049.1) (NCBI, 2012)。
<i>pat</i>	552	绿产色链霉菌 <i>Tu494</i> 菌株的基因, 编码选择性标记 PAT。原始编码序列经过密码子优化, 提高了在玉米中的表达水平。PAT 对含草铵膦类除草剂具有抗性。
NOS 终止子	253	终止子序列来自根癌土壤杆菌 (Entrez Accession Number V00087.1 (NCBI,202)的胭脂碱合成酶基因。它的作用是提供多聚腺苷酸化位点 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
载体组成		
ColE1	674	复制起始位点能促使质粒在大肠杆菌中自我复制。与 Accession Number V00268.1 (NCBI, 202)类似 (Itoh and Tomizawa,1978)。

五、遗传稳定性：

Southern 杂交实验

通过 Southern 杂交分析了 Bt11 玉米多个世代（BC1，BC3，BC5）中插入片段的遗传稳定性。分别以 *cry1Ab* 和 *pat* 特异性探针进行 Southern 杂交，结果表明不同世代的 Bt11 玉米 DNA 显示为一致的杂交条带，表明 Bt11 玉米的插入片段在多世代遗传中是稳定的。分别为以 *cry1Ab* 探针和 *pat* 探针，经 *NdeI* 酶切消化的玉米基因组 DNA 进行 Southern 杂交的结果。具体结果参见正文 5.3.1 节。

孟德尔分离试验

为了确定 Bt11 玉米的遗传稳定性，通过性状分离实验，观察多个世代目的基因（*cry1Ab*）和抗除草剂选择标记基因（*pat*）的表达。经过检验确认带有 *cry1Ab* 和 *pat* 基因的 F1 植株自交产生 S1 代株系，具 Bt11 性状的植株再分别与非转基因对照 H8540 和 977 玉米回交，然后再自交或不自交。用欧洲玉米螟接种并限量喷施除草剂（把 1% 草铵膦溶液涂抹到叶尖，以避免对敏感玉米植株产生严重伤害）。受检植株应表现为或抗欧洲玉米螟，或抗草铵膦，或对两者都敏感。

通过分离比例分析，证明 *cry1Ab* 和 *pat* 基因以单显性位点遗传，并且 *cry1Ab* 基因和 *pat* 基因是紧密连锁的，总是一起分离。具体结果参见正文 5.3.1 节。

六、环境安全评价

6.1 生存竞争能力：

Bt11 玉米基因转化的目的是加强玉米的抗虫性，而不是改变其生存竞争力。农艺性状观察试验表明 Bt11 玉米与亲本对照玉米在生存竞争能力上没有差别。

另外，2002-2003 年在农业部指定的检测机构，即吉林省农科院生物技术研究中心及山东省农业科学院植物保护研究所，对 Bt11 玉米进行了生存竞争能力检测，结果如下，

荒地条件下生存竞争能力的检测：

2002-2003 年吉林省农科院生物技术研究中心和山东省农业科学院植物保护研究所的研究表明，在表面撒播的条件下，转 *cry1Ab* 基因抗虫玉米 Bt11 及对照的出苗率均较低。说明 Bt11 玉米与普通玉米一样，其籽粒由于各种原因洒落在地表面，出苗率低甚至不出苗。

5cm 深播情况下，Bt11 玉米及其非转基因对照种子出苗率相对较高。Bt11 玉米及非转基因对照在长势、株型、生育期等方面无差异。深播、撒播及对照区杂草种类基本相同。玉米和杂草覆盖度随调查时间依次增加，Bt11 玉米及其非转基因对照玉米区玉米和杂草覆盖度大小和增幅基本一致，且差异不显著。撒播区杂草覆盖度均低于深播区，试验区杂草覆盖度显著低于空白对照区。

栽培地条件下生存竞争能力检测：

2003 年吉林省农科院生物技术研究中心和山东省农业科学院植物保护研究所的研究表明，栽培地 Bt11 玉米及其非转基因对照玉米在长势、株型、各生育期株高等方面无显著差异。Bt11 及其非转基因对照玉米在产量方面没有显著差异。Bt11 玉米在生长、繁殖和发芽率等方面，没有显示出比普通玉米有更强的生存竞争能力。

转基因玉米自生苗：

玉米在山东省济南市能够越冬，但次年春天出苗率较低，越冬性较差。根据山东省农科院植保所在 2003 年 5, 6 月对上一年试验后的自生苗的调查结果，Bt11 玉米与非转基因对照小区都未能发现自生苗的存在。试验过程中没有发现 Bt11 玉米对试验区内及周围植物种类有影响作用。

上述试验结果均证实了 Bt11 玉米与非转基因对照玉米在生存竞争能力上无显著差异，Bt11 玉米并没有因为引入抗虫特性而改变玉米固有的遗传性状。

6.2 基因漂移：

玉米是典型的风媒授粉植物，产生大量的花粉，使穗上胚珠成功地受精。玉米田间风的运动使雄穗的花粉落在同一或毗邻植株的花丝上。玉米花粉直径 0.1mm，在正常的从较低高度靠风媒传播的花粉中是最大的。这种大颗粒和迅速沉降影响了玉米花粉的传播。由于玉米雌雄异花，所以昆虫传粉对玉米的可能性很小，这样也就限制了玉米花粉随昆虫远距离传播的可能。

由于玉米的起源中心在中美洲地区，且只有少数均属美洲大陆物种的植物能和玉米杂交。玉米和墨西哥类蜀黍（*Zea mays* ssp. *mexicana* Schrad.）从遗传角度来看是相容的，在墨西哥和危地马拉某些地区，两种植物如果长得靠近能自由进行杂交。大刍草（teosinte）也很容易和玉米进行有性杂交，杂种一代表现出高度可育，且能自交和回交。

玉米同多种三囊草属(*Tripsacum*)植物杂交十分困难，且杂交后代为雄性不育。大田未曾发现三囊草—玉米杂交种，三囊草—墨西哥类蜀黍也未曾产生过杂交。

转基因植物转移到微生物也不会有显著的危害。*Bacillus thuringiensis* 是土壤中的常见微生物，*cry* 基因通过 HGT 转移到其他物种已有相当长的时间，没有因为长期接触而发生有害事件。

尽管转基因玉米 Bt11 表达的 Cry1Ab 蛋白在序列上和微生物产生的全长 Bt 蛋白的开始的 615 个氨基酸相同。但在 Bt11 中表达的 *cry1Ab* 基因在合成时设计了缺失和 DNA 序列的改变，而且除 35S 启动子外，还受玉米乙醇脱氢酶 IVS6 基因内含子的信号调控，从而增强在植物中的表达。截短的 Cry1Ab 蛋白在微生物系统中难以高水平表达，在大肠杆菌和苏云金芽孢杆菌中所取得的成功也都有限。因此，如果 *cry1Ab* 基因整合进质粒或细菌染色体中，也极不可能产生 Cry1Ab 蛋白。

实验室测定 Cry1Ab 蛋白对各种非靶标生物的影响，没有发现不良效应。因此 Cry1Ab 蛋白在土壤微生物中极不可能稳定整合，也不会产生有害效应。

上述研究结果和国内外的其他研究均表明，在我国转基因玉米的外缘基因向近缘种传播的可能性很小，也没有证据说明 Bt11 玉米比其他植物更有可能向其他生物物种，包括微生物发生基因转移。可能的问题是向栽培种漂移。如果 Bt11 玉米的花粉在存活期内能够传到任何一个接受玉米的柱头内，交叉授粉便发生了。但随着与转基因植物距离的增加这种潜在的转移会变得不可能。美国环保署在审阅了关于 *cry1Ab* 基因向玉米野生或杂草类亲缘植物渗透的可能性报告后认为，在美国任何 *cry* 内毒素基因均无被玉米的野生型杂草类亲缘植物捕获和表达的明显的可能性。综上所述，Bt11 玉米对野生植物的基因渐渗杂交是不太可能的，而且如此罕见的

情况即便出现，也不会增加子代产生杂草丛生的可能性及对生物多样性造成负面影响。

再者，本申请仅限于进口该转基因玉米用作加工原料，在国内进行环境安全评价的侧重点是考察在运输与仓储环节，由遗撒释放至环境的可能生态风险，将极少有机率发生该转基因玉米的外缘基因飘移到周边玉米制种田的情况。

最后，中国《农业转基因生物安全管理条例》对转基因玉米隔离距离进行了规定：对普通玉米田是 200m；普通玉米制种田是 300 米进行管理，在此距离内，转基因玉米基因流散的风险完全可以减小到可忽略的程度，甚至是可以避免的。

6.3 生物多样性：

国内检测机构有关 Bt11 玉米对靶标生物影响的研究：

2003 年在农业部指定的检测机构中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心分别对 Bt11 玉米的生物多样性进行了研究，有关 Bt11 玉米对靶标生物的检测结果显示如下：

中国农业科学院植物保护研究所的检测结果表明：Bt11 玉米对靶标害虫玉米螟有很好的控制作用，存活的幼虫数量较小，蛀孔隧道长度较短。由于 2003 年玉米螟的发生较轻，对照玉米及当地非转基因玉米农大 108 上玉米螟幼虫数量较少，危害较轻，因此 Bt11 与对照品种在幼虫存活、蛀孔隧道长度上均差异不显著。仅与农大 108 在幼虫存活上差异显著。

对穗期棉铃虫的控制效果，Bt11 玉米雌穗上没有棉铃虫幼虫存活，但因为对照和农大 108 雌穗上存活的幼虫数量较少，因此差异不显著。但在雌穗被害长度上，Bt11 玉米雌穗的被害长度显著低于非转基因对照品种和当地非转基因玉米农大 108，说明 Bt11 玉米对棉铃虫的危害有一定的控制作用。

桃蛀螟由于发生较晚，大多在灌浆期后期才在玉米雌穗上危害。桃蛀螟幼虫在 Bt11 玉米雌穗上的幼虫的存活数量和造成的隧道长度，显著高于其非转基因对照和农大 108，说明 Bt11 玉米不能控制桃蛀螟危害。

吉林省农科院生物技术研究中心的检测结果表明，试验所用当地常规品种吉单 209 是一个在生产上普遍种植的抗螟性较好的玉米杂交种，而转基因玉米 Bt11 的抗螟能力较之更为优良。

国内检测结构有关 Bt11 玉米对非靶标生物影响的研究

2003 年在农业部指定的检测机构，中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心分别对 Bt11 玉米对生物多样性的影响进行了研究，有关 Bt11 玉米对非靶标生物的检测结果显示如下，

对天敌昆虫种群优势度的影响：

中国农科院植物保护研究所的检测结果表明，在整个玉米生育期，玉米田的主要天敌为瓢虫类、小花蝽类、蓟马和蜘蛛类的捕食性天敌。在瓢虫中，主要以龟纹瓢虫为主，其次为食螨瓢虫，异色瓢虫较少。寄生性天敌以小蜂和茧蜂类为主。蚜虫、叶甲和叶螨在各类玉米田中均为优势种害虫，Bt11 玉米田和对照田的优势物种无明显差异，说明 Bt11 玉米对玉米田昆虫群落没有明显的影响。

对天敌昆虫种群数量的影响：

中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农科院生物技术研究中心的检测结果表明，转基因玉米品种 Bt11 与其非转基因对照玉米在整个生育期的天敌总量几近一致，没有明显的差异。

转基因玉米对生物群落多样性的影响

中国农科院植物保护研究所的检测结果表明，转基因抗虫玉米 Bt11 对田间节肢动物多样性，在物种生态优势度、天敌总量、捕食性天敌的种群动态上，同其非转基因对照相比，没有显著的影响，说明转基因玉米 Bt11 对玉米田节肢动物多样性没有明显的影响。虽然在某些指标上，Bt11 玉米及其对照与当地非转基因常规玉米农大 108 有一定的差异，但这种差异是不同品种间造成的，与转基因本身无关。

上述对非靶标生物影响的研究表明，Cry1Ab 蛋白对非靶标生物没有不利影响，因此 Bt11 玉米仅对靶标生物表现出抗性，而对非靶标生物没有不利影响。

七、食用安全性评价

7.1. 营养学评价：

7.1.1 营养成分

为评估 Bt11 玉米营养成分，选择 1998 年在法国大田中种植的 3 种 Bt11 玉米杂交种和与之对应的非转基因杂交种玉米。收获后干燥保存，分别对蛋白、脂肪、纤维、能量、碳水化合物、氨基酸、脂肪酸、胰蛋白酶抑制物、植酸等成分分析。

结果表明，在营养水平方面，玉米作为食品和饲料的原料，是许多食品的主要成分。在我国许多山区以玉米为主要食品，提供人们必须的营养成分。通过分析表明：在总蛋白水平和氨基酸水平上，与亲本非转基因玉米没有生物学的显著差别。另外，在碳水化合物、灰分、粗纤维、水分、矿质营养等方面，差异也不显著，因此，作为食品和动物饲料的原料，转基因玉米 Bt11 是安全的。具体结果参见正文 5.3.3.4 节。

7.1.2 抗营养因子

为测定玉米抗营养因子，选择 1998 年在法国大田中种植的 3 种 Bt11 玉米杂交种和与之对应的非转基因杂交种玉米。收货后干燥保存并分别对玉米中的胰蛋白酶抑制剂和植酸进行测定。结果表明，Bt11 玉米和非转基因对照之间并没有显著性差异。

国内的检测结果表明，转基因玉米 Bt11 的植酸和胰蛋白酶抑制剂分别是 $7.76 \pm 0.57 \text{mg/g}$ 和 $7.16 \pm 0.38 \text{TIU/mL}$ ；亲本 NP2153 的植酸和胰蛋白酶抑制剂分别是 $7.63 \pm 0.63 \text{mg/g}$ 和 $7.67 \pm 0.58 \text{TIU/mL}$ 。二者的检测值均在文献报道的范围内，二者之间也不存在生物学意义上的差异，是实质等同的，不会对食用安全构成威胁。因此，Bt11 在抗营养因子和天然毒性成分方面的评价是安全的。具体结果参见正文 5.3.3.3 节。

7.2. 毒理学：

在 Bt11 转基因玉米中导入了两个基因，因而产生两种蛋白，一种是 Cry1Ab 蛋白，来自苏云金芽孢杆菌株系 HD-1；另一种是 PAT 蛋白，来自绿色产色链霉菌

(*Streptomyces viridochromogenes*)。本节分别提供有关 Bt11 玉米中 Cry1Ab 蛋白和 PAT 蛋白的毒理学评价的相关数据和信息，具体如下：

Cry1Ab 蛋白

Cry1Ab 蛋白作用机制：

苏云金芽孢杆菌的安全应用已经有很长的时间 (Burgens, 1981)。苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性土壤细菌。在孢子形成期间，苏云金芽孢杆菌产生具有强烈专一化杀虫活性的晶体蛋白内含物，这种晶体蛋白能被昆虫碱性肠液降解，其中产生的杀虫活性蛋白与敏感昆虫肠道上皮细胞相互作用，有证据表明杀虫蛋白在细胞膜上产生穿孔，从而影响渗透平衡，进而细胞膨胀并溶解。敏感幼虫停止取食，最终死亡。对于几种 Bt 蛋白，敏感昆虫的肠道上皮细胞都具有与其高亲和性的结合位点 (Höfte and Whiteley, 1989)。Bt 蛋白分子量较大 (约 65kD)，不挥发。因此，从吸入和皮肤途径吸收 Bt 蛋白不太可能。另外在哺乳动物肠道细胞表面没有苏云金芽孢杆菌的蛋白 δ -内毒素的受体，而这种受体在 Bt 蛋白活性作用中具有重要作用 (Hoffmann *et al.* 1988a, 1988b; Noteborn, 1995; Sacchi *et al.* 1986; van Rie *et al.* 1990)，因此 Bt 蛋白在哺乳动物肠道内不会发生作用。

国外认证机构对 Cry1Ab 蛋白的结论：

美国环境保护署通过审查作为杀虫剂活性成分的 Cry1Ab 蛋白的安全性后，(US Environment Protection Agent) 认为：“针对这种细菌蛋白，在口服、吸入、皮肤进入、毒物学和其它生物学效应方面，已经有了足够的实验数据。通过审查这些资料，环境保护署认定在毒物学方面数据是完整的，没有发现对环境主要哺乳动物存在安全性问题” (EPA, 1986)。其他关于 Cry1Ab 蛋白安全性的大量综述也进一步证明其对人类不存在有害影响。

Cry1Ab 蛋白在模拟胃液条件下的失活和可消化性：

应用 SDS-PAGE 和 Western 蛋白印迹的方法对 Cry1Ab 蛋白在含胃蛋白酶的模拟哺乳动物胃液 (SGF) 的降解情况进行了评估。试验结果显示在 SGF 溶液中，2min 后就有 90% 以上的 Cry1Ab 蛋白降解，说明了 Cry1Ab 蛋白与常规食物蛋白一样，在典型的哺乳动物胃环境中易于被消化。具体结果详见附件 10.3。

Cry1Ab 蛋白的小鼠急性口服毒性：

在小鼠急性口服毒性试验中，将 5 只雄鼠和 5 只雌鼠为一组，强行口服饲喂 0 (对照) 或 5050mg/kg 体重 (Cry1Ab 蛋白测试物)，以 2% w/v 水溶性羧甲基纤维素作为对照物和溶剂。研究过程中进行临床观察、测量体重和食物消耗量。处理后 14 天，将动物处死，进行尸检。取血样进行临床病理学测试，取选择的器官进行称重，将特定的组织进行处理，检测组织病理学变化。所有观察结果没有发现与 Cry1Ab 蛋白处理相关的效应， $LD_{50} > 5050\text{mg/kg}$ 体重。因此可以得出高剂量的 Cry1Ab 蛋白对小鼠没有急性毒性的结论。具体结果详见附件 10.1。

Cry1Ab 蛋白的 90 天大鼠喂养试验

2004 年在农业部农产品质量监督检验测试中心 (北京) 对 Bt11 玉米进行了大鼠 90 天喂养试验，检测结论如下：根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》对受试物进行 90 天喂养试验，结果表明受试物对大鼠的体重、食物利用率、血液学

指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响，主要脏器亦未出现特异性病理改变，90 天喂养试验结果为阴性。具体结果详见附件 10.12。

Cry1Ab 蛋白与已知毒蛋白的相似性

为确定 Cry1Ab 蛋白和已知的毒素蛋白是否存在任何显著的氨基酸序列同源性，利用 BLASTP 程序搜索了 NCBI Entrez[®] 蛋白数据库（NCBI）。结果显示，搜索到的与 Cry1Ab 蛋白具有显著同源性的 769 条蛋白序列中，没有已知或推断的毒素蛋白。

PAT 蛋白

pat 基因编码草铵膦乙酰转移酶，这类酶在细菌和动植物细胞中普遍存在，在脂肪的合成和氧化过程中起关键作用。由于所有细胞都含有乙酰转移酶，所以，这类酶是人类食物的一种天然组成成分。目前，没有研究表明毒性或过敏性与乙酰转移酶有关。有很多实验证明转基因 Bt11 玉米中的 PAT 安全性。有关 Bt11 玉米中 PAT 蛋白的毒理学评价的相关数据和信息，具体如下

PAT 蛋白底物特异性：

对 PAT 酶的底物特异性研究表明：1) PAT 的底物特异性很窄，只有草铵膦和脱甲基草铵膦（Thompson et al. 1987）；2) 对以下氨基酸没有乙酰化作用：谷氨酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酰胺、天冬酰胺酸、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸，羟脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸（Wehrmann et al., 1996）；3) 丙二辅酶 A 和琥珀酰一辅酶 A 可作为共同底物（Wehrmann et al. 1996）。这些结果显示 PAT 酶对草铵膦有高度的特异性，未发现 PAT 可能的内源底物。

国外认证机构对 PAT 蛋白的结论：

美国环境保护署（EPA）决定对所有含草铵膦乙酰转移酶（PAT 蛋白）（其中包括 *bar* 基因和 *pat* 基因）的农产品和遗传材料免除生产过程中必须进行抗性排除实验的要求，这项豁免包括了 *bar/pat* 基因。这进一步证明了 PAT 蛋白的安全性（EPA, 1997）。

PAT 蛋白的模拟胃液条件下的失活和可消化性：

通过测定 PAT 蛋白在哺乳动物模拟胃液消化（SGF）稳定性也可以作为评价蛋白潜在毒性的内容之一。在 1X, 0.1X, 0.01X, 0.001X 标准胃酸浓度的 SGF 以及无胃蛋白酶的 SGF 环境下进行的 PAT 蛋白降解试验，结果显示在标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中，PAT 蛋白几乎在零时间内被立即降解；2 分钟之后，0.1X 或 0.01X 标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中的 PAT 蛋白刚刚降解，但在 0.001X 标准胃蛋白酶浓度的 SGF 中 PAT 蛋白在缓慢降解，但还没有降解完。这些结果都证明了 PAT 蛋白在典型的哺乳动物胃条件下敏感，很容易被降解。具体结果详见附件 10.4。

PAT 蛋白的急性口服毒性：

试验材料（PAT 蛋白）和对照材料都在质量体积浓度为 2% 的 CMC 悬浮为质量体积浓度为 26% 的溶液后，并按照每千克体重 19.4 毫升的比例以强饲法喂食小鼠。第一组小鼠（5 雄 5 雌）服食试验物的悬浮液，第二组小鼠（5 雄 5 雌）服食

参照物（PAT 蛋白对照）的悬浮液。每一只小鼠接受的剂量都为每千克体重 5050 mg。第三组小鼠仅按照每千克体重 19.4 毫升的比例被喂食 2%的 CMC（溶剂对照）。在小鼠存活期间（0-14 天）进行临床观察、称重和摄食量记录，试验结束时对所小鼠进行安乐死并尸检，记录任何异常现象。并保留完整的胃肠道系统，以备日后可能进行的检查。

试验结果表明，小鼠口服 5050 mg/kg 体重的 PAT 蛋白，没有产生不利影响。因此，试验结果表明 PAT 蛋白是安全的。具体结果详见附件 10.2。

PAT 蛋白的 90 天大鼠喂养试验

2004 年在农业部农产品质量监督检验测试中心（北京）对 Bt11 玉米进行了大鼠 90 天喂养试验，检测结论如下：根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》对受试物进行 90 天喂养试验，结果表明受试物对大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、生化学指标、以及脏/体比等均无明显影响，主要脏器亦未出现特异性病理改变，90 天喂养试验结果为阴性。具体结果详见附件 10.12。

PAT 蛋白与已知毒蛋白的相似性：

为确定 PAT 蛋白和已知的毒素蛋白是否存在任何显著的氨基酸序列同源性，利用 BLASTP 程序搜索了 NCBI Entrez[®]蛋白数据库（NCBI）。结果显示，搜索到的与 PAT 蛋白具有显著同源性的 3027 条蛋白序列中，没有已知或推断的毒素蛋白。具体结果详见附件 10.6。

7.3 致敏性评价：

Cry1Ab 蛋白过敏性

为确定 Cry1Ab 蛋白氨基酸序列是否与任何已知或假定的过敏原蛋白存在序列同源性，通过两种方法搜索了 FARRP 敏原数据库（The Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Online Database），该数据库包括 1630 条已知或假定的过敏原记录。用 FASTA 方法搜索全长序列和具有 8 个或以上相邻氨基酸序列完全匹配的方法来对比每个已知或潜在过敏原。第一个方法中没有搜索到任何与过敏原蛋白存在 35%以上序列的同源性；第二个搜索结果中，在 FARRP 过敏原数据库中没有搜索到任何与 Cry1Ab 蛋白具有 8 个或以上相邻氨基酸序列的同源性。研究结果证明，Cry1Ab 蛋白与已知或假定的过敏原蛋白质没有显著的氨基酸序列同源性。

Cry1Ab 蛋白不为食物过敏原的理由还包括：Cry1Ab 蛋白非衍生自任何已知的过敏性蛋白；Cry1Ab 蛋白在一般的哺乳动物胃环境下非常容易消化。相应结论也可以在上述 5.3.3.1 节中描述。

此外，有研究表明，Bt 蛋白在罐装玉米粒中几乎检测不到。这表明加工过程（蒸煮或 100-110°C 下灭菌）使 Bt 蛋白失活或破坏。对于用新鲜 Bt11 玉米粒制作食品的过程也是一样的，玉米棒煮熟后才被食用的。因此，人类在食用 Bt11 玉米或其产品时不太可能接触到具活性的 BT 蛋白。

PAT 蛋白过敏性

为确定 PAT 蛋白氨基酸序列是否与任何已知或假定的过敏原蛋白存在序列同源性，通过两种方法搜索了 FARRP 敏原数据库（The Food Allergy Research and

Resource Program Protein Allergen Online Database），该数据库中包括 1630 条已知或假定的过敏原记录。用 FASTA 方法搜索全长序列和搜索具有 8 个或以上相邻氨基酸序列完全匹配的方法来对比每个已知或潜在过敏原。第一个方法中没有搜索到任何与过敏原蛋白存在 35% 以上序列的同源性；第二个搜索结果中，在 FARRP 过敏原数据库中也没有搜索到任何与 PAT 蛋白具有 8 个或以上相邻氨基酸序列的同源性。研究结果证明，PAT 蛋白与已知或假定的过敏原蛋白质没有显著的氨基酸序列同源性。具体结果详见附件 10.8。

此外，PAT 蛋白也可能在加工过程中被破坏。PAT 蛋白在高于 45°C 条件下是不稳定的（Wehrmann et al. 1996）。Bt11 转基因玉米粒中 PAT 蛋白含量极低，加工过程中又不稳定，因此，人类在食用 Bt11 玉米或其产品时不太可能接触到具活性的 PAT 蛋白。

综上所述，Cry1Ab 蛋白与 PAT 蛋白不太可能引起过敏性。

7.4 抗生素抗性：

Bt11 玉米中不含任何抗生素抗性标记基因，因此不会产生抗生素抗性。

八、非预期效应

从大量现有的 Bt11 的环境安全、食用安全评价试验来看，结果如预期的一样，表明 Bt11 是安全的，未发现非预期效应。在中国境内的环境安全和食用安全检测结果也是如此，未发现非预期效应。

九、生产应用前景及拟采取的安全监控措施

中国是世界上的玉米生产大国，也是玉米消费大国。据中国海关总署数据显示，2011 年中国玉米进口量为 175 万吨，2012 年进口玉米 520 万吨，同比增长近两倍。2013 年 7 月玉米进口量 7.27 万吨，环比增加 829%，预计未来玉米将逐步适当扩大进口量。Bt11 玉米表现为抗玉米鳞翅目害虫，大大降低了玉米对杀虫剂的依赖，同时为玉米产业带来更多的经济效益。

2004 年 4 月，转 *cry1Ab* 基因抗虫 Bt11 玉米首次获得农业部颁发的转基因安全证书作为进口加工原料。后续又进行了多次续申请沿用至今。作为供应商，先正达公司在安全证书的使用上，严格遵守中国的相关法律法规以及安全证书的要求。在提供安全证书复印件给境外贸易商时，要求贸易上同时签订相关协议书确保其在进口过程中的安全操作，并按照相关法律，要求贸易商在将玉米作为加工原料进口过程中采取相应的监控措施。对加工企业也进行相应的监管。

十、结论

转 *cry1Ab* 基因抗虫 Bt11 玉米在 1996 年分别获得美国批准后，陆续获得了包括加拿大在内的 20 个国家的批准。在此期间大量的环境安全、食用安全评价及由中国农业部指定的检测机构进行的国内环境安全、食用安全检测结果均表明 Bt11 玉米对环境、食用方面的安全性，未发现可预期的风险。

附件 7. 该类转基因植物国内外生产应用概况

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种常见的土壤细菌, Bt 的一个突出特征就是在芽孢形成过程中, 产生由蛋白质组成的且具有杀虫活性的伴胞晶体, 它能在昆虫中肠上皮细胞的特异性受体结合, 使其产生穿孔, 从而杀灭昆虫。我们将编码这种蛋白的基因统称为 Bt。目前已经从不同的 Bt 亚种中分离出 400 多种 Bt, 它们对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种昆虫和无脊椎动物有特异的查毒作用。Bt 已成为世界上植物抗虫基因工程中研究和应用最多的基因。自 1996 年, Bt 转基因植物逐渐商业化以来, Bt 转基因抗虫植物越来越多。截止到 2010 年, 在美国注册的 Bt 植物就有 41 种

(http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/pip_list.htm)。已经有多种转单一 Bt 和复合 Bt 的转基因玉米、棉花、马铃薯等作物得到大面积的种植。还有许多新的具有良好抗虫性的 Bt 转基因植物, 如水稻、大豆、油菜、苜蓿、花椰菜、蓖麻等已经试验成功, 并逐渐推广种植。Bt 转基因抗虫植物的培育为提高产量, 减少杀虫剂的使用和保护环境作出了举足轻重的贡献。在种植该类转基因植物的国家, 根据转基因植物类别功能不同, 主要用于食品、饲料和加工原料。

中国是大规模种植转基因抗虫棉的国家, 其它转基因作物包括转基因玉米的研究也受到我国科学家的广泛重视。1999 年, 中国水稻研究所研制成功世界首创的转基因杂交稻, 中国农业科学院生物技术研究所以和棉花研究所培育的转基因抗虫棉获准大面积推广种植。2009 年中国批准通过了对转基因 Bt 水稻和转基因植酸酶玉米的生物安全认证, 这一举措具有里程碑意义, 对转基因作物在中国、亚洲乃至全世界的应用将产生重大影响。此外, 在中国, 有 700 万资源贫乏的小农户种植了 390 万公顷的 Bt 棉花, 占棉花种植总面积的 71.5%。

2011 年, 印度庆祝其成功种植 Bt 棉花十周年。在改革棉花作物使其变成本国最富有生产效率和最有经济效应的作物方面, 印度取得了巨大的成功。2011 年, 印度 Bt 棉花种植面积创历史新高, 达到 1060 万公顷, 10 年内增长了 212 倍, 占 1210 万公顷的棉花种植面积的 88%。印度的 Bt 茄子被称为“蔬菜皇后”, 能够大量减少杀虫剂的使用, 菲律宾也打算在 2012/2013 年批准该品种。

澳大利亚棉花种植面积达到了有史以来的最大值, 其中 99.5% (59.7 万公顷) 应用了转基因技术, 包括 95% 的复合性抗冲和耐除草剂品种。

六个欧盟国家 (西班牙、葡萄牙、捷克、波兰、斯洛伐克和罗马尼亚) 种植了 11.45 万公顷的转基因 Bt 玉米, 比 2010 年大幅增长了 26% (2.33 万公顷)。其中西班牙种植的转基因 Bt 玉米面积占欧盟总面积的 85%, 以 28% 的种植率创下纪录。

附件 8. 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

Bt11 玉米仅涉及进口用作加工原料安全证书的申请。根据农业部要求, 在国内由指定检测机构进行了小规模控制条件下 Bt11 玉米的环境安全检测。试验方案由检测机构依据相关法规要求及技术标准制定。检测机构拥有完备的转基因植物田间试验所需的场地、人员及技术等条件。

在对进口用作加工原料的转基因玉米进行环境生态安全性评估验证时, 选择符合试验地周围 300 米隔离条件完好的地块, 并指定专人负责, 设立标志, 阻止非

工作人员进入或接近试验区，确保将可能出现的风险降低的最小程度。同时，检测试验结束后，要有相应的措施，防止转基因植物的残留和扩散。在检测试验结束后，第二年严禁在同一地块种植相同的作物，并对试验地进行检测，及时清除可能出现的自生苗，并采取相应的措施处理意外情况。

附件 9 境外公司出口的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

附表 6. Bt11 玉米全球审批情况

国家	申请目的	批准日期
美国	种植	1996 年 1 月
	食用、饲用、加工	1996 年 5 月
	食用、饲用、加工、种植	1996 年 8 月
加拿大	种植	1996 年 5 月
	饲用	1996 年 6 月
	食用	1996 年 8 月
欧盟	食用、饲用、加工	1998 年 6 月
欧盟	食用	1998 年 2 月
日本	食用	1996 年 9 月
	饲用	1996 年 9 月
	种植	1996 年 10 月
澳大利亚/新西兰	食用	2001 年 8 月
阿根廷	食用、饲用、加工	2001 年 7 月
巴西	食用、饲用、种植	2008 年 7 月
哥伦比亚	饲用	2008 年 2 月
	食用	2009 年 4 月
	种植	2008 年 5 月
白俄罗斯	食用	2011 年 7 月
印度尼西亚	食用	2011 年 9 月
哈萨克斯坦	食用	2011 年 7 月
韩国	食用	2003 年 12 月
	饲用、环境	2006 年 2 月
马来西亚	食用、饲用、加工	2012 年 3 月
墨西哥	食用、饲用、加工	2007 年 7 月
巴拉圭	食用、饲用、种植	2012 年 10 月
菲律宾	食用、饲用、加工	2003 年 7 月
	种植	2005 年 4 月
俄罗斯	食用	2003 年 9 月
	饲用	2006 年 12 月

南非	种植	2003 年 6 月
	食用、饲用、加工	2002 年 2 月
瑞士	食用	1998 年 10 月
	饲用	1998 年 10 月
中国台湾	食用	2004 年 6 月
英国	食用、饲用	1997 年 2 月
瑞士	食用	1998 年 10 月
	饲用	1998 年 10 月
乌拉圭	食用、饲用、种植	2004 年 6 月

以下分别列出美国、加拿大、欧盟、日本和澳大利亚/新西兰的审批原件和参考译文。

9.1 美国农业部（USDA）对 Bt11 玉米解除监控地位

（参考译文）

USDA/APHIS 对 Bt11 玉米以非规范性法律地位决定的申请（95—195—01）

环境评估及无重要影响的发现

1996 年 1 月

美国农业部动植物健康调查服务机构(APHIS)在发给一个基因工程产品 Bt11 玉米的解除法规监管地位决定之前准备了一份环境评估。APHIS 收到一份来自 Northrup King 公司申请关于 Bt11 玉米在 APHIS 章程的 7CFR 第 340 项之地位的正式项目申请。APHIS 对此申请，支持文件及其它相关的技术信息已进行一项详细的复查。基于对此环境评估所述之文件的分析，APHIS 从其判定对鳞翅目昆虫具抗性的 Bt11 玉米将不再是受管制的物品，而达成一项对环境无明显冲击的发现（结论）。

John H. Payne 博士

代理主管

生物技术，生物药品及环境保护

动植物健康调查机构

美国农业部

日期：1996 年 1 月 8 日

(原件扫描)

03-01-98 04:22pm From-USDA

T-088 P.01/14 F-776

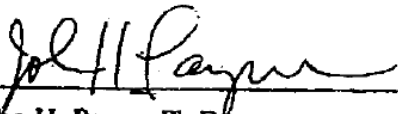


USDA/APHIS Petition 95-195-01 for Determination of Nonregulated Status for

**Environmental Assessment and
Finding of No Significant Impact**

January 1996

The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) of the U. S. Department of Agriculture has prepared an environmental assessment before issuing a determination of nonregulated status for a genetically engineered corn line called Bt11 corn. APHIS received a petition from the Northrup King Company regarding the status of Bt11 corn as a regulated article under APHIS regulations at 7 CFR Part 340. APHIS has conducted an extensive review of the petition, supporting documentation, and other relevant scientific information. Based upon the analysis documented in this environmental assessment, APHIS has reached a finding of no significant impact on the environment from its determination that lepidopteran insect resistant Bt11 corn shall no longer be a regulated article.



John H. Payne, Ph.D.
Acting Director
Biotechnology, Biologics, and Environmental Protection
Animal and Plant Health Inspection Service
U.S. Department of Agriculture
Date: JAN 18 1996

9.2 美国食品药品管理署（FDA）-Bt11

（参考译文）

Diana G. Williams 女士 管理处主管
Northrup King 公司 P.O.Box 959
Minneapolis, 明尼苏达州 55440

亲爱的威廉斯女士：

本信答复 Northrup King 公司向食品及药务管理局（FDA）（兽用医药处及食品安全和营养处）所进行的有关转基因玉米，尤其是 Bt11 玉米的商议。

据 Northrup King 公司所述，Bt11 基因玉米转形是经过修饰的 *CryIA(b)* 基因及 *pat* 基因，它们分别类似于从苏云金杆菌亚种 *kurstaki* 中分离的 *cryIA(b)* 基因及绿色链霉菌中的 *pat* 基因。此 *cryIA(b)* 基因编码 Bt 蛋白，它们在被吞食后对鳞翅目昆虫有毒。*pat* 基因编码磷酸乙酰转移酶（phosphinothricin），造成对除草剂草胺磷的抗性，PAT 蛋白也通过 Northrup King's 对 Bt11 玉米株系的筛选而标记。

1995 年 2 月，Northrup King 与 FDA 会面商讨关于 Bt11 玉米的安全性和营养性评估。为此，Northrup King 于 1995 年 10 月 25 日递交了关于 Bt11 玉米的综合评估。附加在其它递呈分别于 1996 年 2 月 28 日及 1996 年 4 月 14 日被本处收到。

这些通信告知了 FDA，Northrup King 为确保产品符合 FDA 所辖之法令及管理条例所执行的步骤。根据你们所作出安全性及营养性评估的基础上，我们十分理解 Northrup King 所作结论：新品种产生的玉米粒，饲料及青贮饲料的成份，其安全性与市场所测的相关成份无区别，及转基因玉米不需要 FDA 的市场前评估或特许，所有与此通告相关的材料被放入标号 BNF0017 的文件中，此文件被市场前特许处保存。

在 Northrup King 提供信息的基础上，现时我们对 Bt11 玉米饲料及青贮饲料无更进一步的问题。但是，你们必须知道，Northrup King 有责任继续保证，由此商号出产的食品安全，卫生符合所有适用的法律或规章要求。

此致

Alan M. Rulis, Ph.D

主任

市场前准许处

食品安全和营养中心

(原件扫描)

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

MAY 22 1996

Ms. Diana G. Williams
Manager, Government Regulations
Northrup King Company
P. O. Box 959
Minneapolis, MN 55440

Dear Ms. Williams:

This is in regard to Northrup King's consultation with the Food and Drug Administration (FDA) (Center for Veterinary Medicine and Center for Food Safety and Applied Nutrition) on genetically modified corn, specifically transformation event Bt 11. According to Northrup King, transformation event Bt 11 corn is modified to express synthetic versions of the modified *CryIA(b)* and *pat* genes, similar to the *CryIA(b)* and *pat* genes isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) and *Streptomyces viridochromogenes*, respectively. The *CryIA(b)* gene encodes the Btk protein, which is toxic to certain lepidopteran insects upon ingestion. The *pat* gene encodes the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein, which confers tolerance to the herbicide glufosinate ammonium. For Northrup King's purpose, PAT expression functions as a selectable marker for development of the Bt 11 corn line.

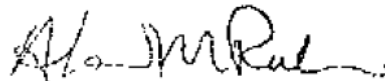
In February of 1995, Northrup King met with FDA to discuss their proposed safety and nutritional assessment of corn containing transformation event Bt 11. As part of bringing Northrup King's consultation regarding this product to closure, Northrup King submitted a summary assessment of corn containing transformation event Bt 11 on October 25, 1995. Additional submissions were received by the Agency on February 28, 1996 and May 14, 1996.

These communications informed FDA of the steps taken by Northrup King to ensure that these products comply with the legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment you have conducted, it is our understanding that Northrup King has concluded that corn grain (kernels), fodder, and silage derived from the new variety, are not materially different in composition, safety, and other relevant parameters from corn grain, fodder and silage currently on the market and that the genetically modified corn does not raise issues that would require premarket review or approval by FDA. All materials relevant to this notification have been placed in a file designated BNF0017. This file will be maintained in the Office of Premarket Approval.

Page 2 - Ms. Diane G. Williams

Based on the information Northrup King has presented, we have no further questions concerning grain, fodder, and silage from event Bt 11 at this time. However, as you are aware, it is Northrup King's continued responsibility to ensure that foods marketed by the firm are safe, wholesome and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Alan M. Rulis", with a horizontal line extending from the end of the signature.

Alan M. Rulis, Ph.D.

Director

Office of Premarket Approval

Center for Food Safety and

Applied Nutrition

9.3 美国环境保护署 (EPA) -Bt11

中文翻译 (扫描部分) :



美国环境保护署
WASHINGTON, D.C. 20460

预防、病虫害和毒性物质办公室

发信日期:

1996 年 8 月 5 日,

[收件人信息]:

Ms. Diana Williams
Director of Regulatory Affairs
Northrup King Company
7500 Olson Memorial Hwy
Golden Valley, MN 55427

尊敬的 Williams 女士:

主题: 贵公司申请对种子增加/杂交生产的注册加以修正, 扩大贵公司 Bt 玉米活性成分的应用范围, 以包括大田玉米的全部商业应用。EPA 注册号: 67979-1

根据 FIFRA § 3(c)(7)(B) 的说明, 此注册在符合以下前提的情况下, 可以有条件地加以修正, 以允许包括作为食物和饲料的大田玉米在内的相应产品应用:

- 1) 当我机构要求所有的同类产品申请人提交相应数据时, 贵方应该按照 FIFRA § 3(c)(5) 的要求提交/陈述产品的全部注册资料。
- 2) 按照 ICFRA § 29 的要求, 提交大田玉米产品在其商业用途被有条件注册的相应财政年度内的生产信息 (产量以 80 公斤为单位), 财政年度自 10 月 1 日起至次年 9 月 30 日止。向我机构提交生产信息的时间应在前一个财政年度结束之后, 截止到 11 月 15 日。
- 3) 此次注册将在 2001 年 4 月 1 日自动到期。在 2001 年 4 月 1 日午夜前, EPA 将重新评估 Northrup King 公司抗性管理方案的有效性, 以决定是否将其转换为永久性注册。
- 4) 此次注册仅限大田玉米。
- 5) Northrup King 公司:
 - a) 若不能向 EPA 提供满意的证据, 证明备选的抗性管理方案与“结构性”昆虫庇护区同等有效或较之更加有效的情况下, 则在 98 年 8 月 9 日之前制定并向 EPA 提交“结构性”昆虫庇护区草案, 并于 99 年 1 月 31 日之前提交最终方案;
 - b) 将在制定和实施的整个过程中, 与 EPA 共同探讨该计划以及备选的抗性管理方案开发和实施的情况;
 - c) 将在 2001 年 4 月 1 日之前, 实施“结构性”昆虫庇护区方案或 EPA 批准的替代抗性管理方案。



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON, D.C. 20460

OFFICE OF
PREVENTION, PESTICIDES AND
TOXIC SUBSTANCES

AUG 5 1996

Ms. Diana Williams
Director of Regulatory Affairs
Northrup King Company
7500 Olson Memorial Hwy
Golden Valley, MN 55427

Dear Ms. Williams:

Subject: Application to Amend Your Seed Increase/Hybrid Production Registration to Expand the Use of Your Bt Corn Active Ingredient to Include the Full Commercial Use in Field Corn
EPA Registration No. 67979-1

This registration is conditionally amended to allow the additional use of the product for food and feed in field corn in accordance with FIFRA § 3(c)(7)(B) provided that you:

- 1) Submit/cite all data required for registration of your product under FIFRA § 3(c)(5) when the Agency requires all registrants of similar products to submit such data.
- 2) Submit production information (80 kilogram units produced) for this product for the fiscal year in which the use of commercial field corn is conditionally registered, in accordance with FIFRA § 29. The fiscal year begins October 1 and ends September 30. Production information will be submitted to the Agency no later than November 15, following the end of the preceding fiscal year.
- 3) This registration will automatically expire on midnight April 1, 2001. EPA will reevaluate the effectiveness of Northrup King's resistance management plan before April 1, 2001 on whether to convert the registration to a non-expiring registration.
- 4) This registration is for field corn only.

9.4 加拿大-食用

中文翻译（部分）：



发信人信息：

Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1a 0L2

发信日期：1996 年 8 月 15 日

收信人信息：

Mr. Kevin Peyton
Regulatory Specialist
Northrup King Co.
500 Olson Memorial Highway
Golden Valley, Minnesota 55427

尊敬的 Peyton 先生：

对于具有草丙膦铵抗性的抗欧洲玉米螟杂交玉米（玉蜀黍）作为新型食品的申请，健康保护司的官员已经审阅了 Northrup King 公司提交的关于该玉米在加拿大作为人类食品售卖的可行性评价。

根据提交的资料信息获悉，开发该玉米品种（即 Bt11 玉米）中应用的操作包括：导入一个合成型的 (*Cry IA(b)*) 基因，该基因由来源于土壤细菌苏云金芽胞杆菌-克尔斯达基 (*Kurstaki*) 变种 (Btk) 的 *Cry IA(b)* 基因剪切后得到；转入另一个来源于吸水链霉菌的 PAT 基因。转基因引起 Bt11 玉米获得了下列新型组分：

- (1) *CryIA(b)* 基因；
- (2) *CryIA(b)* 基因编码的杀虫蛋白；
- (3) PAT 基因；
- (4) 由 PAT 基因表达的 PPT 乙酰转移酶 (PAT) 蛋白。

转化的结果是 Bt11 玉米表达了杀虫蛋白，并对欧洲玉米螟产生抗性；另一结果是 Bt11 玉米表达 PAT 蛋白，产生对草丙膦铵除草剂的抗性。

基于对提交的数据资料的评估，我们对 B11 玉米在加拿大作为人类食品销售没有反对意见。

您应该注意，该意见仅仅针对 Bt11 玉米作为人类食品销售的合适性。Northrup King 公司有义务继续保证该产品符合所有的适用性法令及法规的要求。

请您注意,我们正在向加拿大的农业及农业食品部 (AAFC) 的同志提供一份本信件的副本,以提醒该部门负责进行品种注册并处理关于动物饲料、环境许可及标签的问题。同时我们也向虫害管理法规机构 (PMRA) 的同志提供了本函的一份副本,以供他们参考。

此致

G. M. Paterson
Director General
Food Directorate

抄送: Dr. A. Mackenzie, AFFC
Ms. C. Franklin, PMRA

英文原版（部分）



Health and Welfare Canada Santé et Bien-être social Canada

Health Protection Branch Direction générale de la protection de la santé

Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0L2

August 15, 1996

Mr. Kevin Peyton
Regulatory Specialist
Northrup King Co.
7500 Olson Memorial Highway
Golden Valley, Minnesota 55427

Dear Mr. Peyton:

This will refer to the Novel Food Submission concerning transgenic corn (*Zea mays* L.) resistant to European Corn Borer and tolerant to glufosinate ammonium herbicide. Officers of the Health Protection Branch have reviewed the information that Northrup King Co. provided for assessment of the acceptability of this corn for sale as human food in Canada.

According to the submitted information, the procedure used in developing the subject corn line, designated Bt-11 Corn, involved the introduction of a synthetic cryIA(b) gene representing a truncated form of the cryIA(b) gene from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and the PAT gene derived from *Streptomyces viridochromogenes*. As a result of this genetic modification, the Bt-11 Corn contains the following novel constituents:

- (1) the cryIA(b) gene;
- (2) the insecticidal protein encoded by the cryIA(b) gene;
- (3) the PAT gene; and
- (4) the protein, phosphinothricin acetyltransferase (PAT), which is expressed by the PAT gene.

.../2

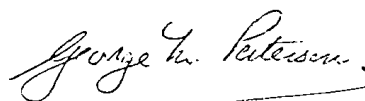
The result of this genetic modification is the expression of the insecticidal protein in Bt-11 Corn, conferring resistance to the European Corn Borer and expression of the PAT protein which confers tolerance to glufosinate ammonium herbicide.

Based on our evaluation of the submitted data, we have no objection to the sale of corn from Bt-11 Corn as human food in Canada.

It should be noted that this opinion is solely with respect to the suitability for sale as human food of Bt-11 Corn. It is the continuing responsibility of Northrup King Co. to ensure that its products are in compliance with all applicable statutory and regulatory requirements.

Please note that we are providing our colleagues in Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) with a copy of this letter in regard to that Department's responsibility respecting variety registration, animal feeds, environmental release and labelling issues. We are also providing our colleagues in the Pest Management Regulatory Agency (PMRA) with a copy of this letter for their information.

Yours truly,



G.M. Paterson, Ph.D.
Director General
Food Directorate

c.c. Dr. A. MacKenzie, AAFC
Ms. C. Franklin, PMRA

9.5 加拿大-饲用

中文翻译（部分）



发信人信息：
Food Inspection Directorate
Nepean, Ontario,
K1A0Y9
Phone: 613-952-8000
Fax: 613-992-5219

发信日期：1996 年 6 月 11 日

收信人信息：
Dr. Thomas Francis
Research Director and General Manager
Northrup King Seeds Ltd.
15910 Medway Road, RR#1
Arva Ontario, N0M 1C0
Phone: (519)461-0072
Fax: (519)461-0770

尊敬的 Francis 博士：

对于您的关于“X4334CBR 及 X4734CBR 两种抗欧洲玉米螟杂交玉米（玉蜀黍）作为牲畜饲料应用”的申请，我们已经审阅。该转化植株具有一个细菌的（*Cry IA(b)*）基因，该基因能够使植物具有对鳞翅类昆虫的幼虫产生抗性；及另一个使玉米对草丙膦胺杀虫剂产生抗性的基因，后者作为一个选择性标记物。

玉米、玉米粉及其它一些副产品目前出现于加拿大饲料法规的第 IV 部分的列表中，因此它被认可作为牲畜饲料应用。又因经过评估发现抗 ECB 杂交玉米与传统的玉米品种在安全性及营养学质量方面实质上等同，所以该玉米品种及其产品被认为符合目前加拿大对牲畜饲料组分的规定，并在加拿大被认可作为牲畜饲料组分应用。该官方认可涉及 X434CBR 及 X4734CBR 杂交玉米、他们的子代、及任何衍化的同类品种（如果他们符合下述条件：该品种未进行种类交互杂交，具有作为动物饲料的预期用途，该植物未显示其他的新特征。）

在任何时候，贵公司一旦发现这种抗 ECB 的杂交玉米产品作为饲料后引起对动物及人类健康、或环境安全性造成风险，您应立即将相关信息呈送给本处。

我们将在不久之后公开一份与植物生物技术办公室联合的决议文件，以解释我们做出该审议的根据。

此致

Phil Macdonald
Biotechnology
Officer
Feed Section

抄送：Kevin Peyton
Simon Barber
Linda Morrison
Glenn Hansen

英文原件：（部分）



Agriculture and
Agri-Food Canada

Agriculture et
Agro-alimentaire Canada

Food Production
and Inspection Branch

Direction générale de la production
et de l'inspection des aliments

Food Inspection Directorate
Nepean, Ontario
K1A 0Y9
Tel: 613-952-8000
Fax: 613-992-5219

Your file Votre référence

Our file Notre référence

June 11, 1996

Dr. Thomas Francis
Research Director and General Manager
Northrup King Seeds Ltd.
15910 Medway Road, RR # 1
Arva Ontario, N0M 1C0
Phone: (519) 461-0072
Fax (519) 461-0770

Dear Dr. Francis:

We have reviewed your application for livestock feed use of the European corn borer resistant corn (*Zea mays*) hybrids X4334CBR and X4734CBR. These plants have been transformed with a bacterial gene (*cryIAb*) that confers lepidopteran larvae resistance, and a gene conferring tolerance to glufosinate ammonium herbicide, used as a selectable marker.

Corn, cornmeal and several other byproducts are currently listed in Schedule IV of the Feeds Regulations and are, therefore, approved for use in livestock feeds in Canada. As the ECB resistant corn hybrids have been assessed and found to be substantially equivalent to traditional corn varieties with respect to safety and nutritional quality, these lines and their products are considered to meet the present ingredient definitions and are approved for use as livestock feed ingredients in Canada. This authorization relates to hybrids X434CBR and X4737CBR, their descendants and any derived sister lines, provided no inter-specific crosses are performed, the intended use is as animal feed and that these plants do not display any additional novel traits.

If at any time, your company becomes aware of any risk to animal and human health or environmental safety that could result from feed use of ECB resistant corn hybrids, you must provide such information to this office.

A joint Decision Document in collaboration with the Plant Biotechnology Office, explaining the rationale behind our deliberations, will be available shortly.

Yours sincerely,

Phil Macdonald
Biotechnology Officer
Feed Section

cc Kevin Peyton
 Simon Barber
 Linda Morrison
 Glenn Hansen

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

9.6 加拿大-种植

中文翻译（部分）



加拿大农业及农业食品部
食品生产及监察司

发信人信息:

Food Inspection Directorate
Plant Products Division
59 Canelot Drive
Nepean, Ontario, K1A0Y9
Phone: (613)9528000
Fax: (613)9925219

发信日期: 1996 年 5 月 3 日

收信人信息:

Mr. Kevin Peyton
Regulatory Specialist
Northrup King Co.
500 Olson Memorial Highway
Golden Valley, Minnesota 55427
Fax: (612)536-9381

尊敬的 Peyton 先生:

对于您的关于“撤销两种转基因杂交玉米（玉蜀黍）（以前的信函中称为 4334CBR 及 4734CBR）的栽培管制”的申请，我们已经审阅。该转基因植株具有：(1) 一个被剪切的 Cry IA(b) 基因，来源于苏云金芽胞杆菌-克尔斯达基 (Kurstaki) 变种 (Btk) 的 Cry IA(b) 基因，编码的一个 δ 内毒素杀虫蛋白能够特异性地使玉米对加拿大的季节性玉米虫害——欧洲玉米螟 (ECB) 产生抗性；及，(2) 一个微生物基因，编码的蛋白能够使玉米对草丙膦铵杀虫剂产生抗性，并可以作为一个转化后的选择性标记物。

根据已经呈送给我们的信息，撤销对 4334CBR 及 4734CBR 杂交玉米品种的管制不会有环境安全性方面的问题，因此被加拿大官方认可。研究发现 4334CBR 及 4734CBR 杂交玉米及其相关产物与传统玉米品种实质上等同。然而，请注意 ECB 可能逐步显示对 4334CBR 及 4734CBR 杂交玉米产生的杀虫蛋白的抗性，且同时引起原来用以控制 ECB 灾害的表面应用型 B.t.k. 微生物杀虫剂失效。

加拿大农业及农业食品部 (AAFC) 认为，可以应用有效的管理策略来减少并延缓 ECB 种群逐渐显示抗性的可能性。虽然 Northrup King 公司已经提交了抗性管理计划，但是因为提议的策略的有效性尚未通过实地栽培加以确认，现在很难预测 ECB 种群出现抗性的程度和速度。因此有必要对这些玉米植株进行管理。按照 AAFC 的理解，Northrup King 将要实施已经制定的虫害抗性管理计划，内容包括本函的附录中概述的项目。

在任何时候，Northrup King 一旦发现新的相关信息表明该产品在加拿大撤销管制后引起对环境的风险（包括对农业的风险），如 ECB 出现对表达杀虫蛋白的玉米的抗性，或者对动物及人类健康的风险，Northrup King 应立即将相关信息呈送给 AAFC。AAFC 将根据这些新信息重新评估上述撤销管制的提案所带来的潜在影响，并决定是否附加其他条款；或在上述风险被认为无法接受时召回该官方认可，同时要求 Northrup King 公司进行必要的相关行动来消除风险或使风险最小化。

目前官方的认可涉及撤销对 4334CBR 及 4734CBR 杂交玉米品种的环境管制，它同时涉及：通过同一转基因操作的所有其他玉米品种，它们被认为与前述品种实质上等同，并符合下述条件：该品种未进行种类交互杂交，具有相似的预期用途，该植物未显示其他的新特征，并进行本函附录中概述的既定虫害抗性管理计划）。

请注意，对具有新型特征的植物进行环境的安全性及作为饲料的安全性检测，是该品种的植物商业化之前必须进行的步骤，它同时也需要符合其他的条款要求，如对种子的评估（加拿大农业及农业食品部）及食品安全性评估（加拿大卫生部）。在安全性评估完成之前，抗 ECB 杂交玉米品种衍化的物品材料不能作为动物饲料或人类食品应用。而且，在获得食品饲料安全性认可之前，依照种子法案及规章这些杂交玉米不能作为品种注册，不能作为种子登广告或售卖。

我们将公开一份决议相关文件，以解释 AAFC 做出该决议的根据。同时我们将向加拿大地方机构转达该决议。如果您需要了解该认可的详细说明，请致电分机 - 5325 向 Anne-Christine Bonfils 咨询。

此致

Glenn Hanson
Director

抄送：T. Francis；地方联络处；EC；HC（食物生物技术；生物局）；种子项目官；品种部门；种子部门；PBO；主任；植物保护。

附件(附录)

附录 为撤销对 4334CBR 及 4734 CBR 杂交玉米的管制

1. 于发生玉米杀虫蛋白抗性的欧洲玉米螟 (ECB) 种群，极有必要进行早期检测。因此，在发生 ECB 抗性的玉米田地及其周围区域对该种群存在与否有必要进行紧密的监测。

英文原件（部分）



Agriculture and
Agri-Food Canada

Agriculture et
Agroalimentaire Canada

Food Production
and Inspection Branch

Direction générale de la production
et de l'inspection des aliments

Food Inspection Directorate

Plant Products Division

59 Camelot Drive

Nepean, Ontario K1A 0Y9

Phone (613) 952-8000

Fax (613) 992-5219

Your file Votre référence

Our file Notre référence

May 3, 1996

3625-6-10N1

Mr. Kevin Peyton
Regulatory Specialist
Northrup King Co.
500 Olson Memorial Highway
Golden Valley, Minnesota 55427
fax: (612) 536-9381

Dear Mr. Peyton:

We have reviewed your application for unconfined field release of two transformed corn hybrids (*Zea mays*), referred to as 4334CBR and 4734CBR in the present letter. These plants have been transformed with: (1) a truncated version of the *cry1Ab* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.), coding for an insecticidal δ -endotoxin that confers resistance to the European Corn Borer (ECB), a periodic pest of corn in Canada, and (2) a bacterial gene coding for a protein that confers tolerance to glufosinate ammonium, used as a selectable marker following the transformation process.

On the basis of the information provided to us, the unconfined release of the corn hybrids 4334CBR and 4734CBR should not pose concern to environmental safety, and is therefore authorized in Canada. Please note however, that ECB could develop resistance to the B.t.k. protein produced in 4334CBR and 4734CBR, and that this could contribute to the loss of topically applied B.t.k. microbial pesticides that could be used to control ECB infestations.

Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) believes that sound management practices can reduce and delay the potential for development of resistant ECB populations. Although Northrup King has submitted an insect resistance management plan, it is very difficult at this point to predict the extent and rapidity of resistance development without field validation of the proposed strategy. These corn plants should therefore be responsibly managed. AAFC understands that Northrup King will implement the developed pest resistance management plan that includes the items outlined in the attached Addendum.

If at any time, Northrup King becomes aware of any information regarding risk to the environment, including risk to agriculture such as development of ECB resistance to the corn expressed insecticidal protein, or risk to animal or human health, that could result from release of these materials in Canada,

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

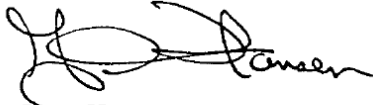
or elsewhere, Northrup King must immediately provide such information to AAFC. On the basis of such information, AAFC may re-evaluate the potential impact of the proposed release, and determine that additional conditions be imposed, or if the risk is deemed unacceptable, revoke this authorization and require Northrup King to take any appropriate action necessary to eliminate or minimize the risk.

The present authorization relates to the environmental release of 4334CBR and 4734CBR corn hybrids. Also, any *Zea mays* line resulting from the same transformation event may be considered substantially equivalent to these lines, provided it is known that: no inter-specific crosses are performed; the intended use is similar; these plants do not display any additional novel traits; and the understood pest resistance management summarized in the enclosed Addendum is applied.

Please note that, while determining the environmental safety of plants with novel traits is a critical step in the commercialization of these plant types, other requirements must be addressed, such as the evaluation of feed (Agriculture and Agri-Food Canada) and food safety (Health Canada). Until these safety evaluations are completed, materials derived from these ECB resistant corn hybrids must not be used for animal feed or human food. Also, until food and feed safety approvals are given, these hybrids will not be registered as varieties under the Seeds Act and Regulations, and cannot be advertised or sold as seed.

A Decision Document, which explains the rationale behind our decision, will be made publicly available. We will also inform provincial agencies of this decision. Should you require any clarification about this authorization, please call Anne-Christine Bonfils at extension -5325.

Yours sincerely,



Glenn Hansen
Director

cc. T. Francis; Provincial Contacts; EC; HC (Food Biotechnology; Bureau of Biologics); Seed Program Officers; Variety Section; Feed Section; PBO; Director, Plant Protection.
Enclosure (Addendum).

9.7 欧盟-食用、饲用、加工

中文翻译（部分）：

DRLM SMITH
化学和生物技术部

环境部
运输与地域

FLOOR 3/F5
ASHDOWN HOUSE
123 VICTORIA STREET
伦敦 SW1E 6 DE
英国

直接电话：0171 890 5240
化学与生物技术部咨询电话：0171 890 5275/5277
传真：0171 890 5259

参见申请：96/M4/1

日期：1998 年 6 月 9 日

Novartis Seeds AG 公司
CH 4002 Basel
瑞士

亲爱的先生，

环境保护法案 1990，第 111 和 112 章节：转基因生物投放市场的许可。

1. 国务大臣和农业、渔业及食品部部长联合授予 Novartis Seeds AG 公司(CH-4002 Basel 瑞士) 许可书。该许可书是根据本许可书计划书中限制和条件陈述以及 1998 年 4 月 22 日的委员会决议（C（1998）978 终案）（1998 年 5 月 5 日 OJL131 28-29 页）就该公司的转基因生物投放市场的申请 96/M4/1 做出的答复
2. 因为它们关系到人体健康和安全的保护，所以本许可书的条款和条件是和健康和安全 Exeutive 相一致的。
3. 附在本许可书中的解释性备忘录解释了计划书中的限制和条件，其中包含了通常条件的重要信息以及本许可书所依据的法律条款。但是该备忘录不属于许可书的一部分。

您诚挚的

L. M. Smith 博士
化学和生物技术部

经国务大臣和农业、渔业及食品部部长联合授权。

英文原件（扫描部分）：



Novartis Seeds AG
CH-4002 Basel
Switzerland

DR LM SMITH
CHEMICALS AND BIOTECHNOLOGY DIVISION

DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT
TRANSPORT AND THE REGIONS

FLOOR 3/F5
ASHDOWN HOUSE
123 VICTORIA STREET
LONDON SW1E 6DE
UK

DIRECT LINE: 0171 890 5240
DIVISIONAL ENQUIRIES: 0171 890 5275/5277
FAX: 0171 890 5259

OUR REF: 96/M4/1

DATE: 9th June 1998

Dear Sir

**ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT 1990, SECTIONS 111 AND 112:
CONSENT TO MARKET GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS**

1. The Secretary of State and the Minister of Agriculture, Fisheries and Food, acting jointly, hereby grant consent to Novartis Seeds AG, CH-4002 Basel, Switzerland, for application 96/M4/1 to market genetically modified organisms in accordance with the limitations and conditions set out in the Schedule to this consent and the Commission Decision of 22 April 1998 (C(1998) 978 final) (OJ L131 5 May 1998 pp 28 - 29).
2. Insofar as they relate to the protection of human health and safety, the terms and conditions of this consent have been agreed with the Health and Safety Executive.
3. The explanatory memorandum attached to this consent explains the limitations and conditions set out in the Schedule and contains important information on the general conditions and other provisions to which the consent is subject, but does not form part of the consent.

Yours faithfully,

Dr L.M. Smith
Chemicals and Biotechnology Division

By authority of the Secretary of State and the Minister of Agriculture, Fisheries and Food, acting jointly

9.8 日本-食用

中文翻译:

229 号

1996 年 9 月 3 日

Masahiro Michisuzi 先生
日本 Monsanto 公司总裁

健康与福利部
环境健康办公署
处长

标题: 符合对重组 DNA 技术生产食物和食物添加剂安全性评估指导法案的确认通知

下面在 1996 年 2 月 20 日申请安全性评估的食物已经确认合乎重组 DNA 技术生产食物和食物添加剂的安全性评估指导法案。

1. 作物: 大豆
特性: 除草剂耐受性
开发商: 美国 Monsanto 公司
2. 作物: 油菜
特性: 除草剂耐受性
开发商: 美国 Monsanto 公司
3. 作物: 马铃薯
特性: 昆虫抗性
开发商: 美国 Monsanto 公司
4. 作物: 玉米
特性: 昆虫抗性
开发商: 美国 Notthreup King 公司

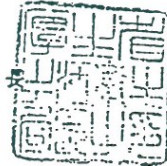
日本原件:

衛食第229号
平成8年9月3日

日本モンサント株式会社

代表取締役社長 通筋 雅弘 殿

厚生省生活衛生局長



「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」
に適合していることの確認について（通知）

平成8年2月20日付で確認申請のあった下記の食品については、当該指針
に適合することを確認したので通知します。

記

- | | | |
|---|-------|----------------------------|
| 1 | 対象品種 | 大豆 |
| | 性 質 | 除草剤耐性 |
| | 開 発 者 | Monsanto Company (米国) |
| 2 | 対象品種 | なたね |
| | 性 質 | 除草剤耐性 |
| | 開 発 者 | Monsanto Company (米国) |
| 3 | 対象品種 | ばれいしょ |
| | 性 質 | 害虫抵抗性 |
| | 開 発 者 | Monsanto Company (米国) |
| 4 | 対象品種 | とうもろこし |
| | 性 質 | 害虫抵抗性 |
| | 開 発 者 | Northrup King Company (米国) |

9.9 日本-饲用

中文翻译（部分）

8-B-1365 号

1996 年 9 月 26 日

Masahiro Michisuzi 先生
日本 Monsanto 公司总裁

Ichizou Ohara
农业、林业及渔业大臣

标题：符合对重组 DNA 技术生产饲料的安全性评估指导法案的确认通知

下面在 1996 年 3 月 19 日申请安全性评估的饲料已经确认合乎重组 DNA 技术生产饲料的安全性评估指导法案。（1996 年 3 月 19 日由农业、林业及渔业部终身部部长签署的 8-B-1365 号通知）。

产品名称：抗虫玉米（抗 ECB 玉米）

日文原件（部分）：

8 畜 B 第 1 3 6 5 号

平成 8 年 9 月 2 6 日

日本モンサント株式会社

代表取締役社長 通筋 雅弘 殿

農林水産大臣 大原



組換え体利用飼料の安全性評価指針に適合していることの確認について

組換え体利用飼料の安全性評価指針（平成 8 年 4 月 1 9 日付 8 畜 B 第 5 8 5 号農
林水産事務次官依命通達）6 の（2）に基づき、平成 8 年 5 月 1 4 日付けで申請の
あった下記の生産物については同指針に適合していることを確認する。

記

生産物の名称：ECB（アワノメイガ）抵抗性トウモロコシ

9.10 澳大利亚/新西兰-食用

中文翻译（部分）

Peter Gerner 先生
常务董事
Syngenta Seeds Pty.Ltd.
Locked Bag 1335
Dandenong South Victoria 3164

尊敬的 Gerner 先生：

关于对 **Bt-176** 玉米的 **A385** 号申请 和对 **Bt-11** 玉米的 **A386** 号申请的回复

1999 年 4 月，ANZFA 接到了您希望修改《食品标准代码》（澳洲和新西兰《食品标准代码》1.5.2）中的 A18 标准，把 Bt-176 玉米（A385 号申请）和 Bt-11 玉米（A386 号申请）添加进去的申请。ANZFA 已经对这两个申请作出了评估并作出结论，认为这两种经转基因改良的食品与用传统的玉米品种制作的食品一样安全，并富含营养成分。ANZFA 委员会决定在 2001 年 2 月向澳洲和新西兰食品标准委员会（ANZFSC）推荐批准这两种玉米加工成的食品上市。

在 2001 年 8 月，澳洲和新西兰食品标准委员会（ANZFSC）接受了我们的提议并对《食品标准代码》进行了修改，添加了由 Bt-176 玉米 和 Bt-11 玉米制作的食品。现在，经转基因改良的 Bt-176 玉米 和 Bt-11 玉米制作的食品经法律允许，可以在澳洲和新西兰销售。关于《食品标准代码》的修改在 2001 年 8 月在公报上刊登。这条消息的复印件包括在我们给您的信函中。

《食品标准代码》的修改也可以在 ANZFA 网站（www.anzfa.gov.au）上看到。

您忠实的
Peter Abbott 博士
执行部理事
产品标准，ANZFA
2001.12.8

英文原件（部分）：

RECEIVED
24 DEC 2001

BY:



Mr Peter Gerner
Managing Director
Syngenta Seeds Pty. Ltd.
Locked Bag 1335
Dandenong South Victoria 3164

Dear Mr Gerner

Re: Applications A385 – Bt-176 Corn and A386 – Bt-11 Corn

In April 1999, ANZFA received two applications from you seeking to amend Standard A18 of the *Food Standards Code* (1.5.2 in the Australia New Zealand *Food Standards Code*) to include Bt-176 corn (Application A385) and Bt-11 corn (Application A386). These two applications have been assessed by ANZFA and it was concluded that these genetically modified foods were as safe and nutritious as food derived from traditional corn varieties. The ANZFA Board agreed in February 2001 to recommend to the Australia New Zealand Food Standards Council (ANZFSC) that food derived from these two corn varieties should be approved.

In August 2001, ANZFSC accepted this recommendation and the *Food Standards Code* was amended to include food derived from Bt-176 and Bt-11 corn. Food derived from the genetically modified Bt-176 and Bt-11 corn varieties are now legally permitted for sale in Australia and New Zealand. The amendment to the *Food Standards Code* was gazetted in August 2001. A copy of this gazette is included for your information.

Please note that updates to the *Food Standards Code* can also be obtained from the ANZFA website (www.anzfa.gov.au).

Yours sincerely

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Peter Abbott", is written over a light blue horizontal line.

Dr Peter Abbott
Acting Program Manager
Product Standards, ANZFA

18 December 2001

附件 10. 审查所需的其它相关资料

附件 10.1. Cry1Ab 蛋白的小鼠急性口服毒性试验

附件 10.2. PAT 蛋白的小鼠急性口服毒性试验

附件 10.3. Cry1Ab 蛋白在模拟哺乳动物胃液环境下的体外消化情况分析

附件 10.4. PAT 蛋白在模拟哺乳动物胃液环境下的体外消化情况分析

附件 10.5. Cry1Ab 蛋白与已知或假定毒素蛋白的氨基酸序列同源性评估

附件 10.6. PAT 蛋白与已知或假定毒素蛋白的氨基酸序列同源性评估

附件 10.7 Cry1Ab 蛋白与已知或假定过敏原蛋白的氨基酸序列同源性评估

附件 10.8 PAT 蛋白与已知或假定过敏原蛋白的氨基酸序列同源性评估

附件 10.9 Bt11 玉米的田间农艺性状调查

附件 10.10 Bt11 玉米营养成分分析

附件 10.11 国内检测机构出具的环境安全检测报告

附件 10.12 国内检测机构出具的食用安全检测报告

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

该项目所使用的 Bt11 转基因玉米已经在 10 多个国家获得了商业化生产或者环境释放许可，并在中国获得了进口作为加工原料的安全证书。经过全面系统的安全评价，我们认为该转基因玉米对人类、动物和生态环境是安全的，同意向中国农业部递交本次申请。

小组组长（签章）

2012 年 6 月 26 日

八、本单位审查意见

本申报书提供的资料均符合试验数据与事实，故此同意向中国政府有关部门提出申请计划。如经批准，承诺严格执行中国有关法规法令。

单位公章

负责人（签章）

2012年6月26日

九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见

（本申请仅涉及该转基因玉米进口作为加工原材料，按照中国法规要求，本节从略）

单位公章

负责人（签章）

日期： 年 月 日