

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价

申 报 书

转 *pat* 基因抗除草剂草铵膦玉米 T25 安全证书(进口)
申请

拜耳作物科学公司

2004 年 3 月 30 日

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 *pat* 基因抗除草剂草铵膦玉米 T25 安全证书 (进口) 申

请

申请单位: 拜耳作物科学公司

申 请 人:

地 址: 北京市朝阳区东三环南路 2 号航华科贸中心二号楼 7 层

邮政编码: 100022

电 话:

传 真:

e-mail:

填报日期: 2004 年 3 月 30 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方法》等有关法规，了解相关要求。
2. 此申报书同样适用于法规规定的报告类实验研究和中间试验的报告，名称分别改为“农业转基因生物实验研究报告书”和“农业转基因生物中间试验报告书”。
3. 申报书内容应当包括以下部分：申请表、项目内容摘要、工作目的和意义、国内外研究的相关背景资料、安全性评价、试验方案、相关附件资料、本单位农业转基因生物安全小组审查意见、本单位审查意见、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见。
4. 申请实验研究的，申请表按表 2 填写，项目名称应包含转基因性状、受体生物名称、实验研究所在省（市、自治区）名称和实验研究阶段等内容，如“转基因抗虫棉花在河北省的实验研究”。一份申报书只能包含同一物种的受体生物和相同的转基因性状。“安全性评价”可不填写。“试验方案”包括研究目标、外源基因的名称和来源、载体构建图谱、转化方法和规模、地点、安全控制措施等。“相关附件资料”包括法人证书和营业执照的复印件，若涉及合作项目，应提交双方合作或转让协议等。“所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送实验研究所在省（市、自治区）的农业行政主管部门。
5. 申请中间试验的，申请表按表 2 填写。申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。“所在省（市、自治区）级农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送中间试验所在省（市、自治区）级农业行政主管部门。
6. 申请环境释放和生产性试验的，申请表按表 2 填写；申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。对于已批准过的环境释放或生产性试验，在试验结束后，若同一转基因生物在原批准地点以相同规模重复试验，在申报时“安全性评价”部分可省略。
7. 申请农业转基因生物安全证书的，申请表按表 3 填写；申报书中“安全性评价”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写，“试验方案”不用填写；转基因植物的品种命名应符合《农业植物品种命名规定》；首次申请农业转基因生物品种（或品系）生产应用安全证书的，需提供《农业转基因生物品种（或品系）生产应用综合评价报告》，主要包括对我国生产、贸易、社会等方面影响。

8.首次申请农业转基因生物生产性试验和安全证书的，在申请截止日30个工作日前提供所申报转基因生物活性样品和技术资料。样品要求：符合要求的，有活性的植物种子2.5kg，动物5ml血样或3g组织各三份，微生物3批次，各10管样品。技术资料要求：申请生产性试验提供外源片段整合进基因组的Southern杂交结果、拷贝数及检测方法等；申请安全证书提供外源插入片段信息及转化体特异性PCR检测方法等。

9. 申报书应当用中文填写，一式十份，一律使用A4纸，正文用小四宋体打印，标准字间距和单倍行距，并提供光盘。对于不符合要求的申报书，不予受理。

10. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。

11. 受理时间：每年3次，截止日期分别为3月1日、7月1日和11月1日。

12. 受理单位：农业部行政审批综合办公室科教窗口。地址：北京市朝阳区农展馆南里11号。邮政编码：100125。收款单位：农业部科技发展中心；开户行：中信银行北京朝阳支行；帐号：7111110189800000419。

目 录

附件目录.....	II
公司名称声明.....	III
商业保密资料声明.....	IV
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材料.....	6
五、安全性评价.....	7
六、相关附件资料.....	40
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见.....	73
八、本单位审查意见.....	74

附件目录

(商业保密信息)

国内检测报告

附件 1: 转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告 (生存竞争能力检测) — 山东省农业科学院植物保护研究所

附件 2: 转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告 (外源基因流散的生态风险检测) — 山东省农业科学院植物保护研究所

附件 3: 转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告 (生物多样性检测) — 中国农业科学院植物保护研究所

附件 4: 转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告 (生存竞争能力检测) — 吉林省农业科学院生物技术研究中心

附件 5: 转基因玉米 T25 大鼠 90 天喂养试验报告 — 天津市卫生防病中心

附件 6: 转基因玉米 T25 抗营养因子检测 — 天津市卫生防病中心

拜耳作物科学公司研究报告

附件 7: 转基因玉米 T25 中 P35S 启动子拷贝数检测

附件 8: 玉米转化事件 T25 的基因组特征

附件 9: 耐草铵膦转基因玉米 T25 与常规玉米栽培品种的农艺性状比较

附件 10: 在抗草铵膦玉米 T25 的整个生命周期中叶片、茎和根中的 PAT/pat 蛋白含量

附件 11: 大肠杆菌表达的 PAT/pat 蛋白与玉米 T25 表达的 PAT/pat 蛋白结构和功能的实质等同分析

附件 12: PAT/pat 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索

附件 13: PAT/pat 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 14: PAT/pat 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 15: pat 基因的产物 PAT/pat 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: pat 基因的产物 PAT/pat 蛋白的热稳定性试验

附件 17: 耐除草剂草铵膦的玉米转化事件 T25 的营养成分

公司名称声明

在这份申请材料里,可能涉及到由以下四家公司[比利时植物遗传公司(PGS)、赫斯特 先灵艾格福公司 (Agrevo)、安万特公司 (Aventis)、拜耳公司 (Bayer)] 中的其中一家公司所进行的研究, 而研究资料与以上四家公司都有关系。

2002年6月, 德国拜耳集团通过并购拜耳作物科学公司而成立了一个新的拜耳作物科学公司。拜耳作物科学公司是拜耳公司的农业贸易的一部分, 它主要从事作物保护产品、作物生产产品和种子的研究、开发和销售工作。拜耳作物科学公司是1999年12月赫斯特 先灵艾格福公司 (赫斯特公司与先灵公司的合资控股公司) 和罗纳普朗克Agro公司合并形成的。在1996年赫斯特 先灵艾格福公司收购了比利时植物遗传公司 (PGS)。因此, 这份声明的目的在于说明, 凡涉及到拜耳作物科学公司 (Bayer)、安万特公司 (Aventis)、赫斯特 先灵艾格福公司 (AgrEvo) 和比利时植物遗传公司 (PGS) 的申请材料或研究都可以被认为是涉及到拜耳作物科学公司的申请材料和研究。

商业保密资料声明

本申报书《转 pat 基因抗除草剂玉米T25安全证书（进口）申请》为拜耳作物科学公司申请资料，包含了拜耳作物科学公司开发并拥有的商业保密资料。这些保密资料除了提供产品的食品安全和环境安全方面的信息外，还包含了最基本的产品分子特征信息和关键的遗传序列信息。此外，保密商业资料还包括为获得抗除草剂玉米T25产品商业化批准而开展的相关研究必不可少的研究思路。这些技术和数据是拜耳作物科学公司花费了大量的人力和财力获得的，目前，拜耳作物科学公司只向各国农业转基因生物行政主管部门提交这些保密商业资料，用于法规安全评价和审批。商业保密信息应受到保护以免泄漏，一旦拜耳作物科学公司的竞争对手获得这些资料，他们将会以很少人力物力投入在短时间内开发出类似的相应产品，会对拜耳作物科学公司在同行业的竞争中造成实质性的危害。

拜耳作物科学公司依据《农业转基因生物安全评价管理办法》第三章第二十七条的有关规定以及本申请书的填写说明，要求对本申请书中标有的商业保密资料进行保密。

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 pat 基因抗除草剂草铵膦玉米 T25 安全证书（进口）申请					
	项目来源	拜耳作物科学公司					
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		抗除草剂玉米 T25				
	受体生物	中文名	玉米	学名	Zea mays L. mays		
		分类学地位	禾本科玉米属	品种(品系)名称	HE89	安全等级	I
	目的基因 1	名称	pat	供体生物	绿棕褐链酶菌 (Streptomyces viridochromogenes)		
		生物学功能	编码膦丝菌素乙酰基转移酶(phosphinothricin acetyl- transferase), 能使植株耐除草剂草铵膦(glufosinate ammonium)				
		启动子	P35S	终止子	T35S		
	载体 1	pUC/Ac	供体生物	大肠杆菌(Escherichia coli)			
	* 标记基因 1	名称	无完全功能性分子标记	供体生物	无		
		启动子	无	终止子	无		
	* 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	无	来源	无		
		功能	无				
转基因方法	聚乙烯乙二醇原生质体直接转化法			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				

	况	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	拜耳作物科学公司			地址	北京市朝阳区东三环南路2号 航华科贸中心二号楼7层		
	邮编	100022			电话			
	传真				电子邮件			
	单位性质	境内单位(事业)	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	拜耳作物科学公司			法人代表			
	联系人姓名				电话			
	传真				电子邮箱			
	主要完成人							
	姓名				性别	男	出身年月	
	学历	博士			专业技术职务	全球大豆、玉米法规事务经理		
	何时何地曾从事何种基因工程工作	从1986年开始从事分子生物学工作，于2000年加入拜耳作物科学公司，于2005年担任全球法规事务经理，负责转基因植物的安全评价、登记工作。						
	参与完成人							
姓名	年龄	学历	职称	单位		在本项目中的分工		
						分子生物		
						细胞生理		
						分子生物		

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

拜耳作物科学公司开发出一种转基因抗除草剂的玉米—转化植株 T25。这种玉米目前只在加拿大和美国的主要生长区种植。不过由于国际农产品贸易的进行，在不久的将来中国也会用这种玉米来加工成食品和饲料产品。本材料对 T25 玉米的加工的食品和饲料的安全性和对人类健康的影响进行了评估，包括常规玉米、用于生产转化植株 T25 的遗传因子及来源于该转化植株玉米的评价。

转化植株 T25 是由绿棕褐链霉菌 *Streptomyces viridomogenes* Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因经合成转化而成的，绿棕褐链霉菌是一种常见的土壤微生物，已知不是人类、动植物的致病菌。*pat* 基因编码 PAT/*pat*（膦丝菌素乙酰基转移酶，phospinothricin acetyl transferase），该酶是使 PPT 乙酰化的修饰酶，PAT/*pat* 酶通过乙酰化除草剂活性成分 PPT 上的游离氨基，阻止有机体产生自体中毒现象；它对高剂量的 PPT、双丙氨膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性，抗性被转化到玉米转化植株 T25 中，从而使草铵膦这种低残留、苗后广谱除草剂可在转化植株 T25 衍生的玉米生产上施用。

利用聚乙二醇（PEG）原生质体直接转化的方法，将一个拷贝的 *pat* 基因导入到了玉米 HE89 的基因组 DNA 中。*pat* 编码序列受组成型启动子 35S 表达的调节。通过 Southern 印迹杂交和 PCR 分析测序鉴定插入序列，从而验证了 *pat* 基因的插入。对插入的 DNA 全序列及其侧翼 DNA 序列均进行了测序。插入的 DNA 序列由 35S 启动子序列、*pat* 基因、35S 终止子序列组成。选择性标记基因 *ampR* (*bla*) 在 T25 中被切断且不表达。

pat 基因在转基因玉米中的遗传分离符合孟德尔遗传规律，可以稳定的遗传。*pat* 基因可以在整个植株中表达。在 T25 玉米的 V5-V6 期和成熟期两个生长期测定 PAT/*pat* 蛋白的含量，叶片、茎和根中 PAT/*pat* 蛋白含量的上限分别是 42 $\mu\text{g/g}$ 鲜重、2.85 $\mu\text{g/g}$ 鲜重和 2.06 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。PAT/*pat* 蛋白用占 TEP (可提取总蛋白) 的百分比表示，叶片中 PAT/*pat* 蛋白含量范围是 3.33-1.58%，茎中是 0.52-0.277%，根中是 0.672-0.56%。

转基因玉米 T25 和非转基因的近等基因系品种的农艺特征比较表明，转基因玉米没有出现竞争能力增强或杂草化能力增强的影响，没有证据表明抗草铵膦转基因玉米 T25 会对环境产生不良影响。

转基因玉米 T25 加工的食品与其非转基因对照加工的食品具有实质等同性。拜耳作物科学公司用两年时间对 15 个试验地点的转基因玉米 T25 与非转基因玉米应用同样的常规农事操作，比较农艺性状以及未加工产品玉米籽粒的组成成分，证实了两者等同。与对应的非转基因品种相比，转基因玉米 T25 中所有基本成分、钠、所有总氨基酸、游离半胱氨酸、大多数总脂肪酸和游离脂肪酸具有实质等同性。非转基因样品与转基因样品中的大多数矿物质、维生素、肌醇六磷酸、游离氨基酸、总棕榈油酸 (C16:1) 和二十烯酸 (C20:1) 以及游离亚麻酸 (C18:3) 观察到差异，由于测定到的统计学差异十分小，未观察到明确的趋势，并且这种差异在所有试验点中未见到一致的趋势，分析的所有数值均在文献报道的范围之内，因此，转基因玉米 T25 与其对应的非转基因玉米的组成成分和营养价值实质等同。

对 PAT/*pat* 蛋白的检测没有发现安全性方面的问题。食品和饲料中存在的 PAT/*pat* 蛋白不会带来潜在的风险。利用 Edman 降解法、SDS-PAGE 电泳中的蛋白

质迁移率、Western 印迹分析、糖蛋白 SDS-PAGE 染色和酶活性测定的方法证明了大肠杆菌和 T25 玉米产生的 PAT/pat 蛋白结构和功能具有等同性。序列的同源检索结果表明 PAT/pat 蛋白与已知过敏原和毒蛋白均无相似性。急性经口饲喂 2000 mg/kg 体重的 PAT/pat 蛋白后，雄/雌 C57BL/6J 小鼠没有出现死亡或者与摄入该蛋白有关的临床症状，体重和摄食量未受影响，在尸检过程中不存在大体变化。在 90℃ 条件下加热 60 min 轻微降解。在 37℃ 条件下被胃蛋白酶迅速降解。最终 PAT/pat 蛋白在胃蛋白酶存在 pH 1.2 的模拟人体胃液条件下被迅速降解，孵育时间不超过 30 s。

此外，根据农业部要求，由山东省农业科学院植物保护研究所和天津市卫生防病中心开展了 T25 玉米的食用安全性和环境安全性的国内验证试验。

90 天大鼠喂养和抗营养成分检测结果表明：未发现 T25 玉米对试验大鼠体重、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察有生物学意义的改变；在植酸和胰蛋白酶抑制剂两个指标方面 T25 与其亲本含量相似。

环境安全性检测结果表明：转基因玉米 T25 与亲本对照玉米相比，除了能够耐受草铵膦除草剂以外，在出苗率、长势、株型、生育期、株高、产量和杂草的竞争力等方面均无显著差异；T25 对田间节肢动物多样性、主要玉米病害等生物多样性没有不利影响；T25 向其他物种间基因漂移的可能性很小。

迄今，在美国获得了 T25 玉米和由 T25 玉米加工的食品在市场上应用，随后加拿大、日本、欧盟、阿根廷、南非和新西兰等国也相继批准了它们的应用。

综上，所有对转基因玉米 T25 的安全性评价数据均支持 T25 对人类健康及环境没有不良影响的结论。

三、工作目的和意义

通过插入抗除草剂基因，拜耳作物科学公司已经开发出了一种具有重要经济价值的玉米品种，它对 PPT (phosphinothrin) 除草剂草铵膦具有抗性。这一成果通过分离绿棕褐链酶菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 中的 *pat* 基因，在不改变 PAT 蛋白氨基酸序列的前提下，按照植物偏爱密码子，对 *pat* 基因的核苷酸序列进行了人工改造。

pat 基因的产物是膦丝菌素乙酰基转移酶 PAT，PAT 是使草铵膦乙酰化的修饰酶，通过对除草剂活性成分草铵膦的游离氨基的乙酰化，阻止有机体产生自体中毒现象，并且对高剂量的 PPT、双丙氨膦或草铵膦具有完全的抗性。

PAT/*pat* 对热和酸均不稳定，在用模拟的人体胃酸液的模拟消化试验中，酶的活性在几秒内降低，同时蛋白迅速而完全地降解。

PAT/*pat* 在抗草铵膦的玉米转化植株 T25 中表达，使玉米对除草剂草铵膦具有高度抗性，对目前的农业耕作将产生积极影响，体现在以下几方面：

- (1) 提供了广谱、萌后杂草控制系统；
- (2) 为放弃萌前除草剂及减少在田间残留活性化合物提供机会；
- (3) 提供了一种新的除草作用模式，以利于改进玉米田中杂草抗性的管理；
- (4) 提供使用对环境安全的天然除草剂的机会；
- (5) 鼓励根据需要使用除草剂；
- (6) 减少耕作；
- (7) 使除草剂有效成分的总施用量比过去减少。

本申请的目的在于获得转 *pat* 基因抗草铵膦玉米 T25 的进口用作加工原料的安全证书，以支持国内玉米贸易商可以顺利进口该玉米及相应的玉米加工产品。

四、国内外研究的相关背景材料

玉米是一年生禾本科草本植物，是重要的粮食作物和饲料来源，也是全世界总产量最高的粮食作物。草害严重威胁着玉米的品质和产量，除草剂的推广使用，可大幅度减少玉米田管理用工，降低劳动强度。但是由于目前推广的玉米品种对除草剂不具有抗性，经常出现药害现象，对玉米植株造成一定的损伤，但开发高效、低毒、无残留的除草剂新产品，费用高、耗时长、难度大。因此，培育抗除草剂作物品种是防止除草剂药害最有效的途径。

i. 抗除草剂基因

目前，在抗除草剂的基因工程上，主要有以下3种策略：

（1）增加靶标酶或靶标蛋白的拷贝数：这种方法是将除草剂作用的靶标酶或蛋白质的基因转入植物，使其拷贝数增加，提高植物体内此种酶或蛋白质的含量，从而提高抗性。

（2）作用靶标酶的修饰：通过基因突变的方法使靶标酶上与除草剂结合位点的氨基酸发生突变，使其丧失与除草剂的结合能力。

（3）分离能解除除草剂毒性的酶基因：这种方法是将以除草剂或其有毒代谢物为底物的酶基因转入植物，该基因编码的酶可以催化降解除草剂以达到保护植物的目的。

ii. 抗除草剂作物

自 1996 年世界第一个转基因作物被批准商业化以来，转基因作物的商业化发展速度很快，从 1996 年 170 万公顷到 2003 年的 677 万公顷，实现 7 年连续增长的态势。就转基因性状而言，目前通过转基因技术导入并商业化开发的最重要的性状当属抗除草剂性状，占全球转基因作物种植面积的 73%。

iii. 抗除草剂转基因玉米转化事件 T25 研究资料

抗草铵膦玉米 T25 于 1995 年在美国首次商品化之前，已在美国、加拿大和欧洲的几个国家进行了多处田间试验，评估对象包括农艺性状、产量及对草铵膦的抗性，结果证实 T25 玉米对除草剂草铵膦具有抗性，其农艺性状与常规玉米相似。以上结果已经在 2002-2004 年在国内进行的环境安全性检测中获得验证。

除田间评估之外，对 T25 玉米也进行了分子鉴定，确定哪些遗传元件已成功转入 T25，遗传元件是否表达，和遗传元件从一代遗传至下一代稳定性如何。也评估了新的表达产物对玉米的潜在毒性和过敏性，以及目的蛋白 PAT/pat 的表达水平。评估得出了以下结论：来源于转化植株 T25 的玉米与常规玉米在安全性和对人类健康的影响方面没有实质区别。以上结果已经在 2002-2004 年在国内进行的食用安全性检测中获得验证。

1995 年美国首次批准 T25 玉米和由 T25 玉米加工的食品在市场上应用，随后加拿大（1997）、日本（1997）、欧洲（1998）、阿根廷（1998）、南非（2001）、新西兰（2002）等国也相继批准了它们的应用。目前，没有任何一个国家发现转基因玉米 T25 对环境及健康有影响。鉴于国际间贸易，可以预料在中国也会使用这种 T25 玉米加工成的食品和饲料产品。

五、安全性评价

1 受体植物的安全性评价

1.1 受体植物的背景资料：

1.1.1 学名、俗名和其他名称；

玉米的拉丁名称为 *Zea mays* (Linnaeus) *mays*，在中国统称玉米。

1.1.2 分类学地位；

玉米的分类学地位：

亚目：禾本目

科：禾本科

属：玉米属

种：玉米

亚种：玉米

染色体数目： $2n = 20$

1.1.3 试验用受体植物品种（或品系）名称；

受体名称为 HE89。

1.1.4 是野生种还是栽培种；

玉米种玉米亚种是一种栽培种。

1.1.5 原产地及引进时间；

据推测，玉米种 *Zea mays* 于 8000 多年前由玉米草，*Zea mays Mexicana* (*Sharder*) *Iltis* 转变而来，原产地是墨西哥。

1.1.6 用途；

玉米作为动物饲料、新鲜食品或食品添加成分和工业原料如燃料等在全球种植和应用。

1.1.7 在国内的应用情况；

我国过去以玉米为粗粮，但随着人民生活的提高，玉米的用途已逐渐从粮用为主转向以饲料和工业原料为主。南方玉米生产也将日益发展。饲用玉米籽粒是优质饲料，一般 2-3 kg 籽粒可转换 1 kg 肉产品，籽粒加工成配合饲料促进饲养业发展。据美国 150 个农场的资料，每公顷生产的可消化营养物质，粒用玉米为 2662.5 kg，饲用玉米为 3120 kg，而小麦只有 1249.5 kg。50 kg 玉米籽粒的饲养价值大致相当于 75 kg 稻谷或 61.5 kg 大麦。

玉米籽粒及其副产物都可作为工业原料，玉米淀粉广泛应用于食品、化工、医药和纺织工业。例如，经二次加工的玉米果葡糖浆，果糖含量 77%-90%，甜度高，营养丰富。甜玉米制成的罐头是饮食佳品。玉米淀粉可加工制造酒精丙酮

醋酸和丁醇等化工产品。玉米胚含油量高，每 50 kg 可榨油 15-20 kg，可治疗高血压病。玉米茎秆可加工制造纤维素、纸张和胶板等；穗轴可提取糖醛，是高级塑料的主要原料；玉米苞叶质地坚韧，可编织精美手工艺品。玉米的药用价值在 15 世纪李时珍的《本草纲目》中早有记载。近几年来从玉米花粉中提炼的浓缩汁，已成为药用珍品。

1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响；

玉米的种植已有几百年历史。在应用史上它一直是安全的，除非玉米被真菌侵染后产生真菌毒素污染。玉米本身不含有效的天然毒素。

1.1.9 从历史上看，受体植物演变成有害植物（如杂草等）的可能性；

玉米是一种完全的驯化植物，其分布取决于人类的活动，它偶尔也在一些田间或路边自生自长，但不靠栽培它无法成长结实。

1.1.10 是否有长期安全应用的记录。

16 世纪以来玉米作为粮食作物而栽培，是全球产量最大的三大作物之一，2000 年 7 月至 2001 年 6 月共产出 5.86 亿吨。美国、中国和巴西处于世界玉米生产和消费的前列。

1.2 受体植物的生物学特性：

1.2.1 是一年生还是多年生；

玉米是一年生植物。

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

玉米对人类及其他生物无毒。如前所述，玉米对真菌病害很敏感，这些真菌病害能使在不利条件下生产或贮存的玉米感染真菌毒素。如果将可致毒的玉米喂养给动物，病害症状就会显现。不过玉米中的真菌毒素易于分析，使得受感染水平在可接受程度以上的玉米进口或应用得以阻止。

1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏原存在的部位及其致敏的特性；

玉米不含致敏原。

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；

玉米的繁殖方式是有性繁殖，可异花授粉或自花授粉。玉米是风媒传粉。

1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率；

在自然条件下，玉米可发生种内杂交。玉米品系间的杂交率与近缘种的生物学感受能力、是否存在物理屏障、风向和风速及与污染源的距离等因素有关。在发展近交系的过程中，为了确保近交系与其它品系之间不发生杂交污染，在它们之间保持约 200 米的隔离距离。尽管栽培玉米与二倍体或三倍体的野生玉米杂交

可产生可育的 F1 杂交种，但与野生玉米不发生渐渗杂交，原因在于地理区域不同，且种间存在大量形态和发育上的差异。进口的转基因原料将只作为加工产品使用，不能用于种植，因此异型杂交的可能性很小。

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）；

受体植物完全可育。

1.2.7 全生育期；

玉米从种植到收获的生育期因品种、气候条件和收获时的风干程度不同而表现出很大差异。典型的生育期是 4-5 个月。

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。

玉米种子偶尔能在土壤中存活过冬，第二年在田中再生，但不靠栽培它无法持续繁殖。抗逆程度是育种的一个因素，玉米品系与品系之间抗逆性不同。

1.3 受体植物的生态环境：

1.3.1 在国内的地理分布和自然生境；

我国玉米分布很广，从海拔 3000 米以上的西藏到东海之滨，从黑龙江到海南岛都有种植。但主要产区集中在东北到西南的斜长弧形带上。我国玉米产区依据分布范围、自然条件和种植制度，分六个区：1. 北方春玉米区；2. 黄淮平原春、夏播玉米区；3. 西南山地丘陵玉米区；4. 南方丘陵玉米区；5. 西北灌溉玉米区；6. 青藏高原玉米区。

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；

玉米是一种植株高大的一年生雌雄同体作物。大部分玉米生长在纬度 30° 至 47° 之间的区域。它是暖季节作物，需要充足的湿度和营养沃土来保证其良好地生长。玉米适宜生长在年降雨量范围在 25-500 厘米的区域。在夏季未实施灌溉的条件下，15 厘米的降雨量是玉米生产的下限。

1.3.3 是否为生态环境中的组成部分；

在玉米栽培的农业区如中国，它是生态环境的一个组成部分。

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；

野生亲缘种存在于墨西哥和危地马拉，但前面已提到，它们不会发生渐渗杂交。因此玉米不会对生态系统中的其他植物产生不利影响。

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

对人类健康或生态环境的不利影响。

在生态系统中，玉米和土壤内外的其他生物具有一定的生态学关系。玉米根系同为生物群体、原生动物和螨类等均有一定关系，同时对土壤具有调节作用。玉米和有益昆虫保持生态关系，同时玉米也会发生一些常见病虫害。玉米与生物共存的生态学关系的任何变化，预计将不会对人类健康或环境产生不利影响。

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，在中国有长期的栽培历史，不会对生态环境产生影响。

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环境和有关其天然捕食者、寄生物、竞争物和共生物的资料。

中国是世界上主要的玉米生产国之一，玉米在中国具有长期的栽培历史，不是非通常种植植物物种，因此，不涉及此项。

1.4 受体植物的遗传变异：

1.4.1 遗传稳定性；

玉米自交系是稳定的，它们通过几代回交以确保性状的一致。由两个自交系杂交第一代而来的品种通常只用作食品或饲料，而不用作进一步育种。

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；

目前没有资料表明玉米的遗传变异对人类健康或生态环境产生过不利影响。

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；

玉米能与其他玉米类植物杂交，但前面已提到，野生亲缘种只在墨西哥和危地马拉生长。因为进口玉米只用于加工，其遗传信息转移到国内种植玉米上的可能性很小。

1.4.4 在自然条件下与其他生物（例如微生物）进行遗传物质交换的可能性。

在非贫瘠的土壤中没有发现从植物到微生物的水平基因转移现象，也没有研究人员提出这类转移的明确的机制。大部分已知细菌在自然条件下是不可转移的，迄今为止也没有证据表明在通常情况下植物基因可转移到细菌中和在细菌中表达。细菌在自然情况下可以转移到许多土壤中，但还没有发现特定基因发生水平基因转移的现象。而且也没有证据表明来自于植物体的完整基因能被转移至哺乳动物细胞中，并在其中表达。此外，转基因玉米原料将只用作加工产品。

1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性。

通常于次年在种植玉米的田间对再生植物进行监控，然后按通常的杂草管理措施将其杀死。因为进口原料将只用于加工而不用作栽培，因此不必对自生植物实行田间监控。

1.6 受体植物的其他资料。

无

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

2 基因操作的安全性评价

2.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的叙述。

拜耳作物科学公司通过聚乙二醇（PEG）原生质体直接转化的方法开发出了抗草铵膦除草剂玉米转化事件T25。该转基因玉米表达由*pat*基因编码的PAT/*pat*蛋白（膦丝菌素乙酰基转移酶）。PAT/*pat*的表达可保护玉米不受以谷氨酰胺合成酶为靶标的草铵膦的抑制。如果没有这种保护，用草铵膦处理后玉米体内会积累过量的氨，导致植物死亡。

2.2 实际插入或删除序列的以下资料：

2.2.1 插入序列的大小和结构，确定其特性的分析方法；

玉米转化事件 T25 是通过聚乙二醇原生质体直接转化的方法，将质粒载体 pUC/Ac 中含有的 *pat* 基因转入玉米基因组而获得的，赋予植物草铵膦的抗性。

Southern杂交和PCR分析证实，转基因玉米T25的*pat*基因以单拷贝插入，作为P35S-*pat*-T35S表达盒的一部分而存在。*ampR(bla)*基因被断裂成碎片，约有25%的片段丢失。

T25 中插入片段中包含的遗传元件见表 1。

表1：T25插入序列中的遗传元件总结

基因组成	核苷酸位置	说明
5'侧翼DNA	1-308	5'侧翼序列
T-DNA	309-4447	插入的T-DNA
5'bla	313-5	bla基因的5'序列
T35S	1130-925	来源于pDH51载体的花椰菜花叶病毒35S终止子
<i>pat</i>	1701-1150	人工合成的 <i>pat</i> 基因，氨基酸序列来源于绿棕褐链霉菌 (<i>Streptomyces viridochromogenes</i>)
P35S	2260-1730	来源于pDH51载体的花椰菜花叶病毒35S启动子
<i>Bla</i> 片段	4100-3435	核苷酸196至核苷酸861为bla基因序列
P35S片段	4447-4095	核苷酸80至核苷酸433为35S启动子序列
3'侧翼DNA	4448-4597	3'侧翼序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 1: T25 插入序列及侧翼序列

2.2.2 删 除 区 域 的 大 小 和 功 能;

抗草铵膦玉米 T25 通过导入 *pat* 基因而获得耐受除草剂草铵膦的能力，开发 T25 玉米的过程中无去除玉米基因组的遗传物质。

2.2.3 目 的 基 因 的 核 苷 酸 序 列 和 推 导 的 氨 基 酸 序 列;

A. *pat* 基因大小为 552 bp, 核苷酸序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

B. PAT/*pat* 蛋白有 183 个氨基酸，推导的氨基酸序列

```
1 msperrpvei rpataadmaa vcdivnhyie tstvnfrtep qtpqewiddl erlqdrypwl
61 vaevegvvag iayagpwkar naydwtvest vyvshrhgrl glgstlythl lksmeaqqfk
121 svvaviglpn dpsvrheal gytargtlra agykhggwhd vgfqwqrdfel papprpvrvp
181 tqi
```

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;

通过孟德尔遗传规律对不同代的观察证实，转基因被插入到染色体中。

2.2.5 插 入 序 列 的 拷 贝 数。

提取转基因玉米T25及其非转基因玉米(品种B73)的基因组DNA, 利用P35S探针和转化质粒(pUC/Ac)探针对一系列酶切片段进行Southern杂交分析(图2-图5)。将基因组DNA进行限制性酶切得到的DNA片段用琼脂糖凝胶电泳分离后转化到膜上, 将印迹与P35S探针进行杂交, 来证实P35S的拷贝数; 用完整的T-DNA探针进行杂交, 证实DNA样品的性质。

P35S 探 针 (图 4) 杂 交 结 果:

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Nco* I 酶切消化, 并与 P35S 探针进行杂交, 结果发现 8000 bp 左右大小的整合片段和 4600 bp 左右大小的整合片段(见图 4, 第 4 泳道)。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Eco* R V 酶切消化, 并与 P35S 探针进行杂交, 结果发现约 11 kb 的 3' 端整合片段。预期的 190 bp 的内部片段因太小而无法看到(图 4, 第 5 泳道)。P35S 探针与 5' 端 *Eco* R V 整合片段不具有任何同源性。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Eco* R I 酶切消化, 并与 P35S 探针进行杂交, 结果

发现预期大小的 1342 bp 的内部片段和 3' 端整合片段 (大于 14 kb) (图 4, 第 8 泳道)。P35S 探针与 5' 端 *EcoR I* 整合片段不具有任何同源性。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Dra I* 酶切消化, 并与 P35S 探针进行杂交, 发现 2 400 bp 左右大小和 5200 bp 左右大小的两个整合片段 (图 4, 第 9 泳道)。

用 P35S 探针所得到的 T25 Southern 印迹杂交结果与 T25 插入序列的结构一致。未检测到另外的杂交片段。这些结果证实在转基因玉米 T25 中存在两个 P35S 启动子片段。

转化质粒探针 (图 5) 杂交结果:

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Nco I* 酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现 8000 bp 左右大小的整合片段和 4600 bp 左右大小的整合片段 (见图 5, 第 4 泳道), 这两个片段也能与 P35S 启动子探针杂交。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *EcoR V* 酶切消化, 并与转化质粒 pUC/Ac 进行杂交, 结果发现两个预期大小的整合片段。3800 bp 左右大小的整合片段表示 5' 端整合片段, 约 11 kb 左右的片段表示 3' 端整合片段 (图 5, 第 5 泳道)。这一个 11 kb 的片段也能与 P35S 启动子探针杂交。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *EcoR I* 酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现 1342 bp 的内部片段, 一个 8 kb 左右的 5' 端整合片段和大于 14 kb 的 3' 端整合片段 (图 5, 第 8 泳道)。内部片段和 3' 端整合片段也能与 P35S 启动子探针杂交。

玉米 T25 基因组 DNA 用 *Dra I* 酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现一个 692 bp 的内部片段, 以及 2400 bp 左右大小和 5200 bp 左右大小的两个整合片段 (图 5, 第 9 泳道)。这两个整合片段也能与 P35S 启动子探针杂交。

用转化质粒作探针进行杂交, 结果所有片段的数量和大小都与预期相符。这一观察结果证实所制备的 T25 基因组 DNA 的性质。

综上, 用 P35S 探针进行杂交的结果与 T25 插入序列的结构相一致, 没有检测到另外的杂交片段, 证实了转基因玉米 T25 中存在两个 P35S 启动子片段。

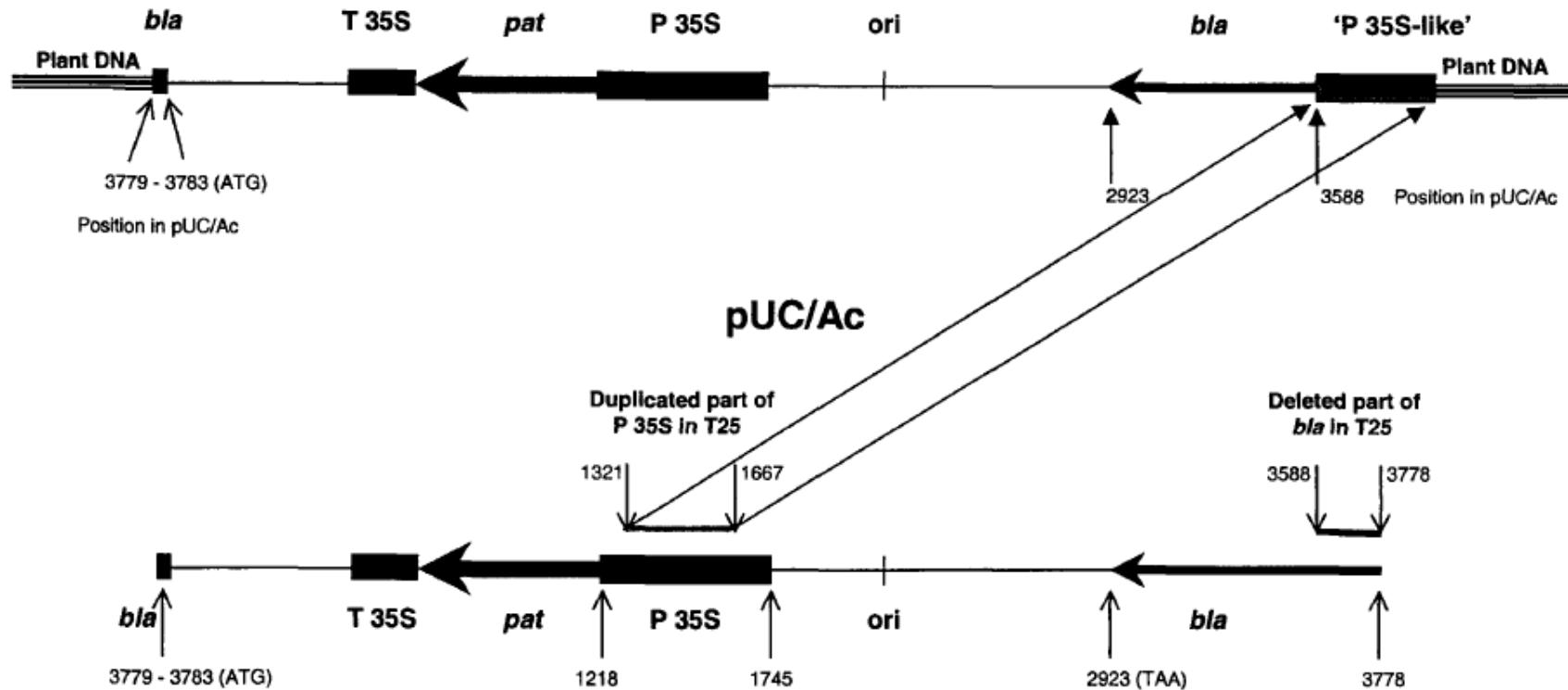


图 2：转基因玉米 T25 的插入图

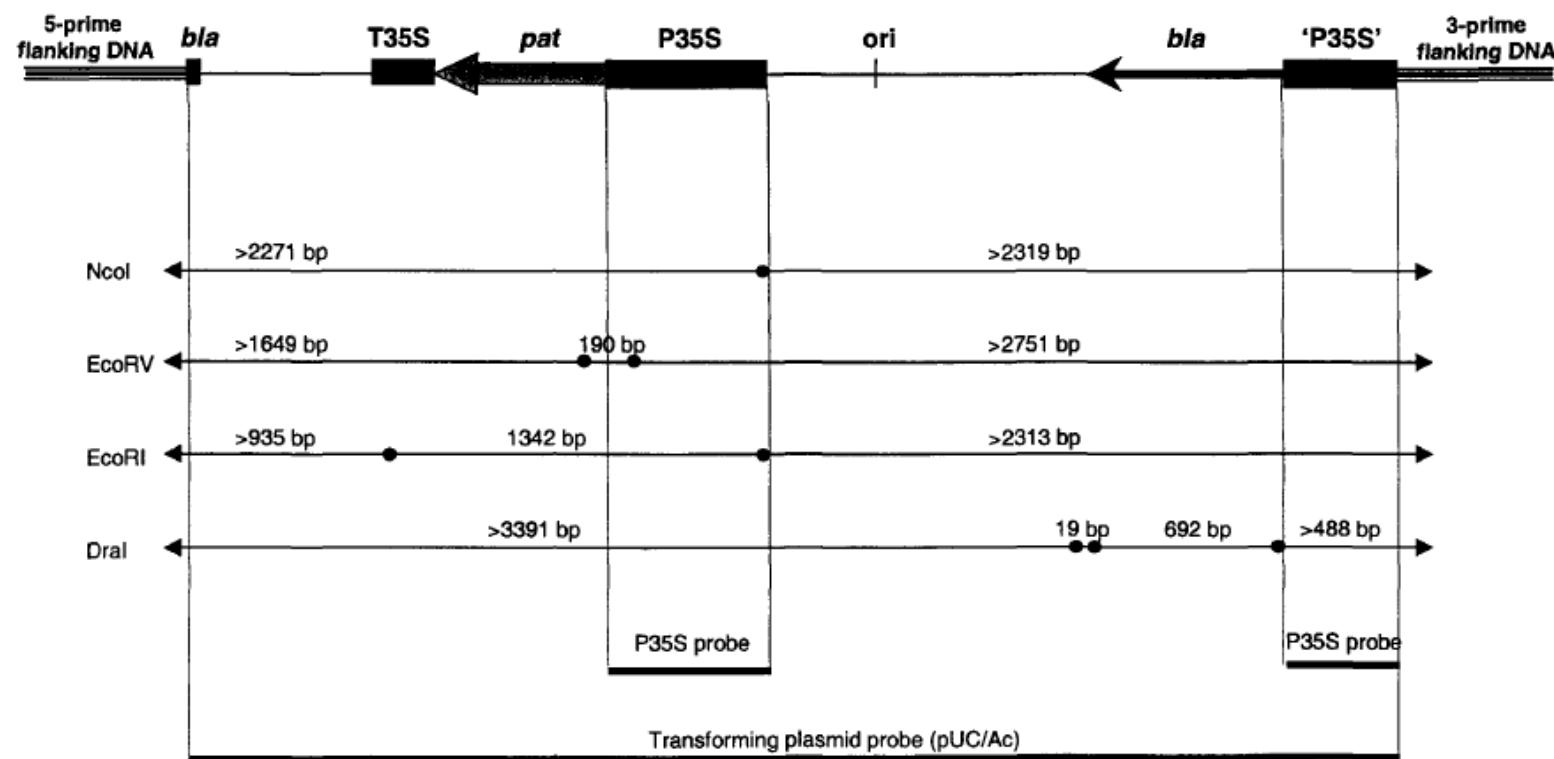


图 3: 转基因玉米 T25 的杂交策略

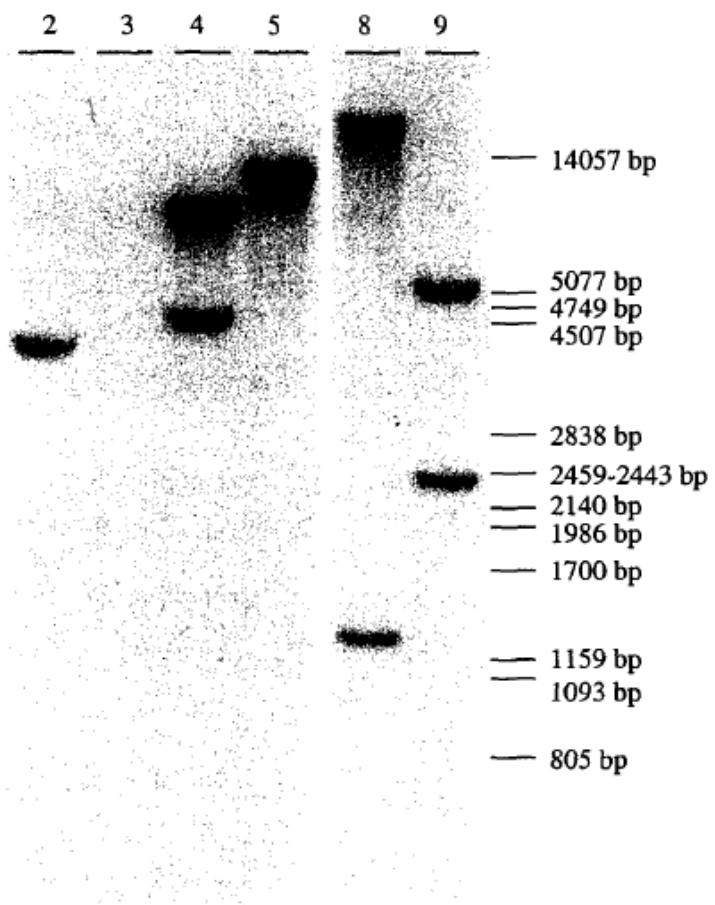


图 4: 转基因玉米 T25 的 Southern 杂交—探针: P35S 探针

凝胶上样顺序:

- 泳道 1: 噬菌体λDNA: *Pst* I 单酶切消化
- 泳道 2: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化 + 1 个拷贝的 pUC/Ac – *Hind* III 消化
- 泳道 3: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化
- 泳道 4: 转基因玉米 T25- *Nco* I 消化
- 泳道 5: 转基因玉米 T25- *Eco*R V 消化
- 泳道 8: 转基因玉米 T25- *Eco*R I 消化
- 泳道 9: 转基因玉米 T25- *Dra* I 消化

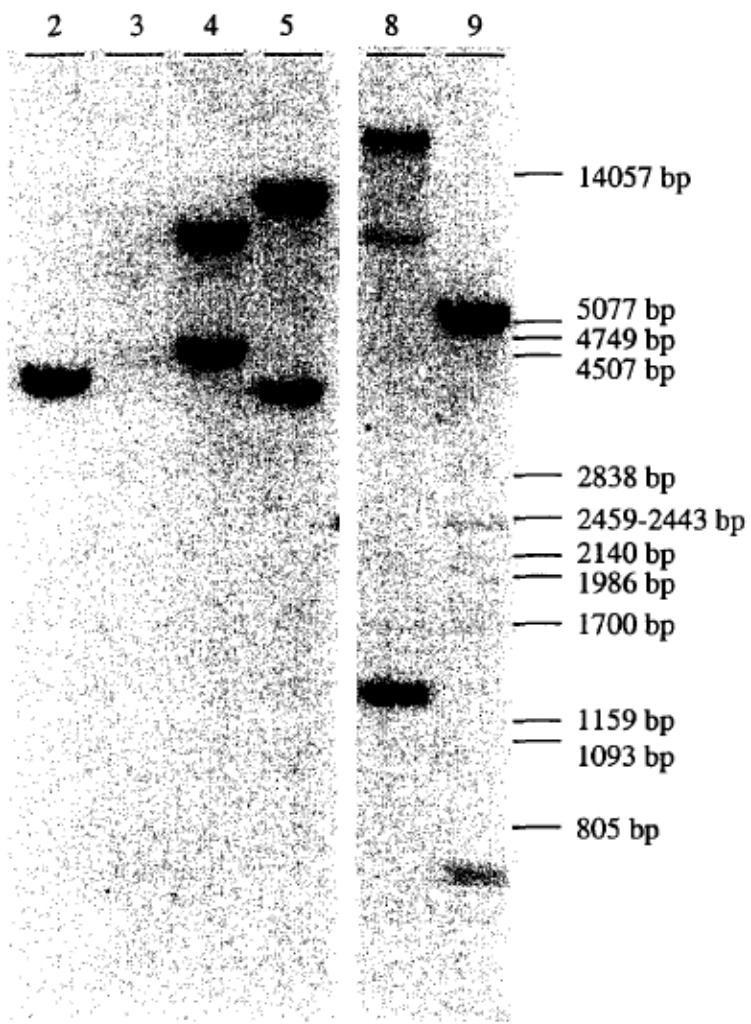


图 5: 转基因玉米 T25 的 Southern 杂交—探针: pUC/Ac 探针

凝胶上样顺序:

- 泳道 1: 噬菌体λDNA: *Pst* I 单酶切消化
- 泳道 2: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化+ 1 个拷贝的 pUC/Ac – *Hind* III 消化
- 泳道 3: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化
- 泳道 4: 转基因玉米 T25- *Nco* I 消化
- 泳道 5: 转基因玉米 T25- *Eco*R V 消化
- 泳道 8: 转基因玉米 T25- *Eco*R I 消化
- 泳道 9: 转基因玉米 T25- *Dra* I 消化

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

质粒pUC/Ac是pDH51载体的衍生物(图6)。将花椰菜花叶病毒的启动子和终止子序列插入载体pUC18多位点接头的酶切位点产生了载体pDH51。合成的*pat*基因插入到35S启动子和终止子之间的*Sal*I位点上来获得pUC/Ac。尽管启动子和终止子序列来源于花椰菜花叶病毒,但它的寄主范围主要限定于*Brassicaceae*。没有致病性被转移至玉米中。

各遗传元件在载体图谱中展示(图6)并于表2中作具体描述。

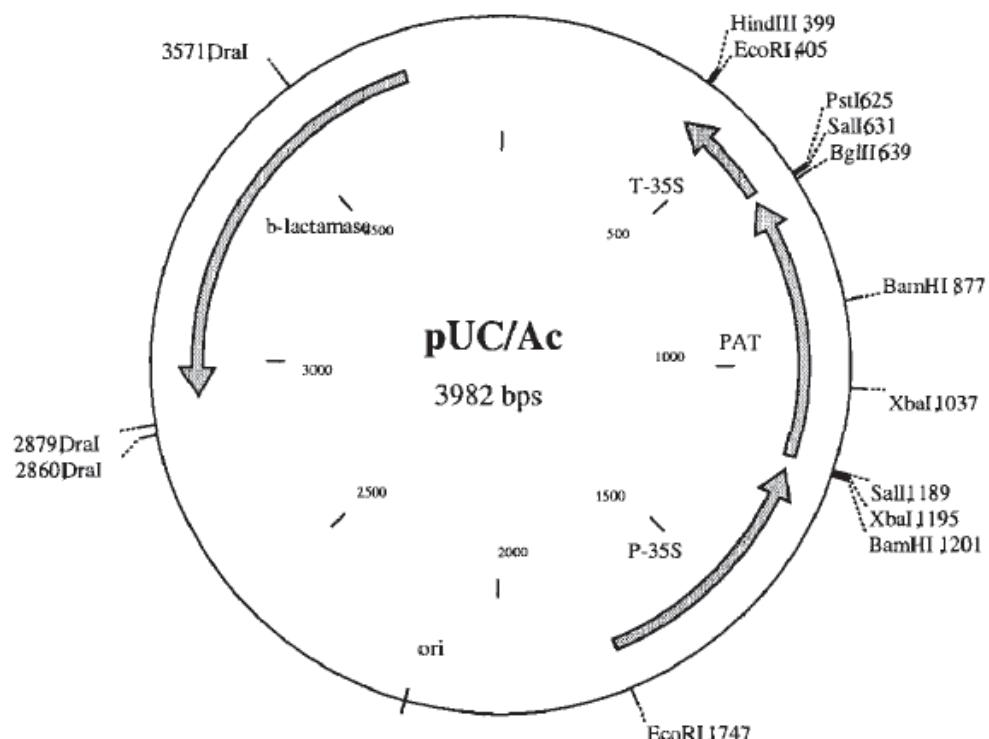


图6: 载体 pUC/Ac 图谱

表2: pUC/Ac 的组成描述

核苷酸的位置	说明及文献
412-618	35S 终止子, 来自载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), pp. 5857-5868)
619-636	合成的多接头序列
637-1188	合成的 <i>pat</i> 基因 (来自绿棕褐链酶菌的氨基酸序列) (Strauch et al. (1993) European patent 275957 B1)
1189-1216	合成的多接头序列
1217-1746	35S 启动子来自载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), pp. 5857-5868)
1747-411	载体 pUC18 的序列, 包括 β -内酰胺酶基因 (第 2922-3782 位) 和第 2163 位的复制起点 (Yanisch-Perron et al., (1985), Gene 33, pp. 103-119)

2.4 载体中插入区域各片段的资料:

2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称;

在pUC/Ac中组成*pat*基因表达的DNA序列组件的35S启动子和终止子来源于花椰菜花叶病毒。启动子序列位于质粒的412-618位碱基对之间，终止子序列位于1217-1746位碱基对之间。35S启动子是组成型启动子，通常被广泛用作植物基因的高度表达。

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;

在转化载体pUC/Ac产生过程中，*ampR(bla)*基因被用作选择性标记基因，它编码TEM-1B-lactamase。*ampR(bla)*基因是大肠杆菌转座因子TnA3的一部分。TnA3广泛存在于各种质粒/R因子中。*ampR(bla)*基因在T25中被切断且不表达。在pUC/Ac载体中它是pUC18序列前体的一部分，位于2922-3782位碱基对之间(载体pUC/Ac质粒图谱见图6)。

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)。

调控序列具体描述见2.4.1。

2.5 转基因方法。

以聚乙二醇(PEG)为介导将基因直接转入原生质体的方法，将原生质体和DNA混合在缓冲液中，逐滴加入聚乙二醇溶液，将*pat*基因转入玉米中，可在含草铵膦的培养基上选择存活的菌落，推测这些菌落是否由被转化的原生质体发育而来。

2.6 插入序列表达的资料:

2.6.1 插入序列表达的器官和组织，如根、茎、叶、花、果、种子等;

通过Southern blot分析，说明插入序列基因已被插入到细胞染色体中。在华分钟没有检测到PAT酶的活性，但在茎、叶、根和种子(谷粒)中检测到了它的活性。

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法;

在拜耳作物科学公司(比利时Astene)温室条件下播种玉米，在2-3叶期，对玉米T25喷施除草剂草铵膦(0.5% Liberty和150 ml/m²)。采用酶联免疫分析

(ELISA)对处于两个不同生长阶段(V5-V6和成熟期)的T25和未喷施除草剂的非转基因、不耐受除草剂的野生型玉米样品的叶片、茎和根的样品进行评价。

i. 玉米组织蛋白的提取

从采集的每个组织材料中随机选取5个独立样本，在液氮中将每种组织磨碎。用优化的提取缓冲液(标准提取缓冲液+ PIC 和 DTT)提取总的可提取蛋白。优化的提取缓冲液含有50 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 5% 甘油, 1 mM 盐酸苯甲脒, 5 mM ε-氨基-n-己酸, 1 μg/mL 抗蛋白酶, 1 μg/mL 亮抑蛋白肽酶, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7.5。

ii. 确定总的可提取蛋白含量

将提取缓冲液加到 5 份不同的已预冷的磨碎组织样品中，在 4°C 的条件下，以 250 rpm 的速度摇荡试管 30 min 后，再用 12000 g 的离心力离心 20 min。为了确定 PAT/*pat* 蛋白的 ELISA 检测限，在 V5-V6 生长期，收集每种非转基因玉米组织的样本，制备 5 份蛋白质提取物。将上清液分成两份分别收集在深孔管中。

提取蛋白质后，用 Bradford 蛋白质定量方法测定总的可提取蛋白 (TEP) 的含量，用牛血清白蛋白作为标准蛋白质，测定 595 nm 波长处的光密度。

iii. ELISA 分析结果

在所有生长阶段和被分析的组织中，所有转基因玉米样品中都能检测到 PAT/*pat* 蛋白。在玉米的不同生长阶段，转基因玉米叶片和茎中的 PAT/*pat* 蛋白含量不断增多。但转基因玉米根中的平均 PAT/*pat* 蛋白含量在 V5-V6 生长期和成熟期维持不变 (图 1)。在 V5-V6 生长期，转基因玉米叶片中的 PAT/*pat* 蛋白含量高于转基因玉米根和茎中的蛋白含量，后面二者的 PAT/*pat* 蛋白含量相当。在玉米成熟期，转基因玉米叶片中的 PAT/*pat* 蛋白含量高于转基因玉米根和茎中的蛋白含量，后面二者的 PAT/*pat* 蛋白含量相当 (图 7)。

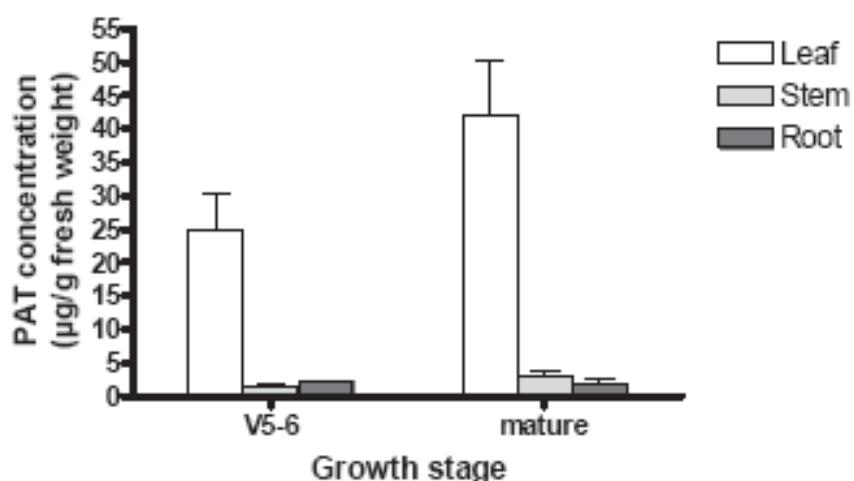


图 7：在 T25 玉米的两个生长阶段不同组织中的 PAT/*pat* 蛋白含量

转基因玉米组织中总的可提取蛋白 (TEP) 含量，即从细胞中提取的水溶性蛋白含量的研究结果表明：成熟转基因玉米中测得的 TEP 含量比幼嫩玉米叶片和茎中的低，根中的 TEP 含量在 V5-6 和成熟期基本维持不变。

PAT/*pat* 蛋白以占 TEP (可提取总蛋白) 百分比表示。在所测定的生长阶段中，玉米叶片和茎中，PAT/*pat* 蛋白含量不断下降，根中的 PAT/*pat* 蛋白含量 (占 TEP 百分比) 基本维持不变。叶片中 PAT/*pat* 蛋白含量范围是 3.33-1.58%，茎中是 0.52-0.277%，根中是 0.672-0.56%。

2.6.3 插入序列表达的稳定性。

用标准孟德尔遗传规律证明 T25 玉米具有抗草铵膦性状，从而调查了 *pat* 基因已被稳定地插入到玉米中 (表 3)。不稳定引起最突出的问题如果发生的话，将是基因功能的沉默，这会导致玉米对除草剂草铵膦敏感。为了确保稳定性，在整个育种和生产阶段要定期检查和筛选转入基因的表达情况。

表3：转基因杂合子与非转基因传统玉米杂交后代的分离数据

品种	杂交 ^b	耐受	敏感	χ^2 ^a
T25	1	305	337	1.60
	2	192	165	2.04

a. 1=16个非转基因传统玉米与纯合子杂交；2=超过24个非转基因传统玉米与纯合子杂交。

b. χ^2 检验没有显著性差异 ($p=0.05$) ($p=0.05$ 时, $\chi^2 \geq 3.84$, $df=1$)

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, 玉米转化事件 T25 采用的基因操作为聚乙二醇原生质体直接转化法。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十二条的相关标准, 用于玉米转化事件 T25 的基因操作方法属于类型 2, 不影响转基因生物的安全性, 因此, 安全等级为 I。

3 转基因植物的安全性评价

3.1 转基因植物的遗传稳定性。

为评价玉米 T25 的遗传稳定性特征, 提取最初转化体叶片、回交 3 次的后代 $B73 \times [B73 \times (B73 \times \text{转化体 T25})]$ 个体、HE89 非转基因再生植株、自交系 B73 的 DNA, 纯化后 (各 15 μg) 用 *EcoR I* 和 *BamH I* 消化之后, 与 *EcoR I* 消化的 35S-*pat* 嵌合基因片段一起进行琼脂糖凝胶电泳, 并转移到尼龙膜上并进行固定。用 *Pst I* 酶切的 λ -DNA 作为 DNA 分子量标准, 通过 Southern 杂交检测 *pat* 基因。将分离的 pUC 35S-*pat* 基因的 *Sal I* 消化片段 (由 552 个碱基组成) 进行放射性标记, 用作探针。

结果表明: 只有最初的转化体及其后代可产生与 *pat* 基因杂交的 DNA 片段。转化体 T25 中含有完整的 *pat* 嵌合基因 (1.3 kb 处的片段) (图 8-A)。与 *EcoR I* 消化的 35S-*pat* 嵌合基因片段 (5 pg DNA) 的杂交信号比较后, 可推测只有 1 个拷贝的 *pat* 基因被整合到了玉米基因组中。

在转化体 T25 及其后代中, 用 *BamH I* 消化的 DNAs 在玉米基因组中有一个整合位点 (图 8-B)。*BamH I* 在 35S-*pat* 嵌合基因中有 2 处酶切位点, 即乙酰基转移酶基因 (*pat*) 的 877 bp 处以及 35S 启动子序列的 1201 bp 处。在图 8-B 的底部可见 324 bp 的 *BamH I* 消化片段。在 1.5 kb 处可见一条强的杂交条带 (第 2-5 洼道)。由于 pUC/Ac 载体不再具有另一个 *BamH I* 限制性酶切位点, 因此对应的第 3 个 *BamH I* 限制性位点应当来自于与 *pat* 基因整合位点相邻的植物基因组。由于这个原因, 在不同转化体中或具有不同 *pat* 基因插入序列的转化体中这一条带的大小会不同。

在 1.5 kb 条带上的弱带 (约 2.5 kb) 可能是由于 *BamH I* 限制性酶的不完全切割 (部分消化) 而引起的。

在转化体 T25 中只见到一条清晰的条带, 这一事实与转化体 T25 只含有一个 *pat* 基因的推测相符。后代的杂交模式表明, 插入到植物基因组中的插入位点是稳定的。

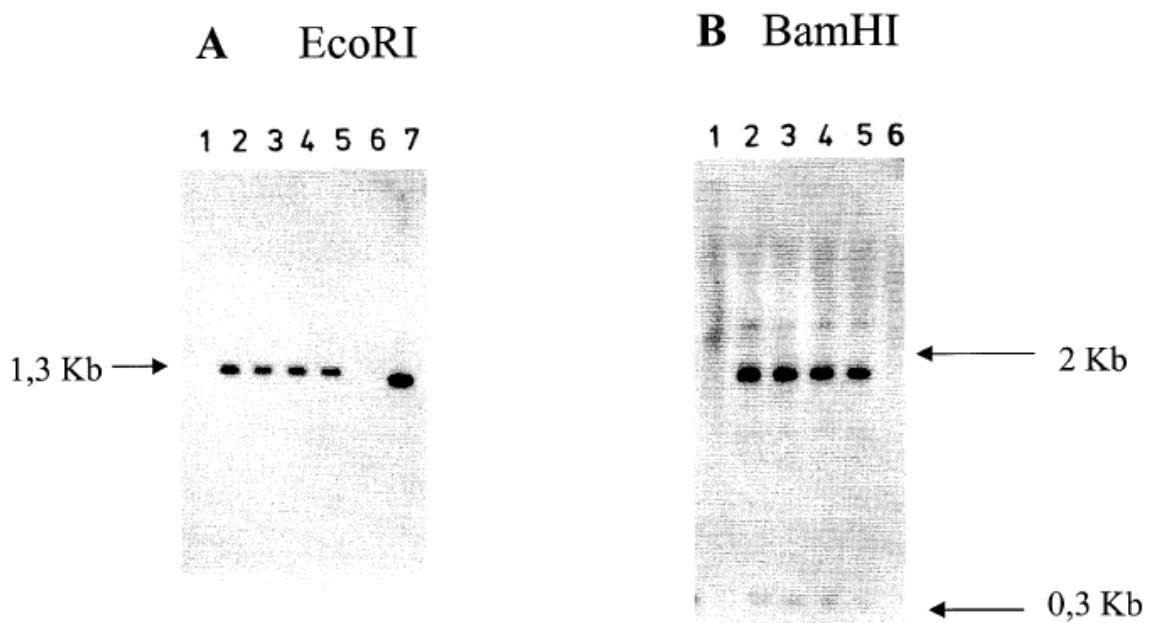


图 8：转基因玉米 T25 的 Southern 杂交图

凝胶上样顺序：

泳道 1: HE89 非转基因再生植株

泳道 2: 最初转化体的叶片

泳道 3-5: 回交 3 次的后代 $B73 \times [B73 \times (B73 \times \text{转化体 T25})]$ 个体

泳道 6: 自交系 B73

3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异：

3.2.1 生殖方式和生殖率；

为评价 T25 与其对应的常规栽培品种的区别，在安大略的 Ridgetown 和 Breslau 进行的品种评价试验 (RCBD 3 个重复)。应用参数的方差分析对数据进行分析，并应用 LSD 测验分离平均数效应 ($p < 0.05$)。

表 4: 1995 年在安大略 Ridgetown 种植的转基因玉米品系和非转基因玉米品系农艺特征的总结

品系	类型	% 数量 ^a	% 产量 ^a	% 水分 ^a	茎倒伏	病害	根倒伏
H 25B.2	T25-转化体	87.2 b	111.2 b	107.2 b	5.0 ab	0 a	0 a
B.2 近等基因系 (T25)	非转基因	105.1 bc	125.6 b	107.0 b	11.7 b	0 a	0 a
先锋 372	商业品系	128.2 c	130.8 b	89.9 a	1.7 a	0 a	0 a
先锋 390	商业品系	112.8 bc	93.8 b	85.7 a	6.7ab	1.7 a	0 a

a 数量的百分率、产量的百分率和水分的百分率均以试验的平均值表示。

表 5: 1995 年在安大略 Breslau 种植的所有转基因玉米品系和非转基因玉米品系农艺特征的总结

品系	类型	% 数量 ^a	% 产量 ^a	% 水分 ^a	茎倒伏	病害	根倒伏
H 25B.2	T25-转化体	87.5 a	97.9 b	116.3 d	1.7 a	0 a	0 a
B.2 近等基因系 (T25)	非转基因	92.7 ab	111.8 bc	100.7 c	5.0 a	0 a	0 a
先锋 372	商业品系	121.4 c	126.7c	92.8 b	0 a	0 a	0 a
先锋 390	商业品系	112.3 bc	94.1 b	88.9 a	1.7 a	1.7 a	0 a

a 数量的百分率、产量的百分率和水分的百分率均以试验的平均值表示。

1995 年田间种植季节收集的数据清楚地表明 (表 4 和表 5)，测定的所有参数中，除了籽粒的含水量之外，其余参数在重组植株 T25 和非转基因的近等基因系植株之间没有显著差异。Breslau 这一地点的转基因籽粒的含水量高于非转基因的近等基因系植株籽粒。T25 的调查结果表明，*pat* 基因的整合和表达没有使受体植物比常规玉米更具有选择优势。

3.2.2 传播方式和传播能力；

玉米在自然界是一种主要依靠风作媒介的异花授粉的植物，具有雄蕊先成熟的花序。然而，经过几十年的传统选择与培育，许多雌蕊先成熟的玉米品种被选育出来。雄花生于植株的顶端，为圆锥花序；雌花生于植株中部的叶腋内，为肉穗花序。农艺性状数据的比较结果表明 T25 玉米与非转基因对照玉米之间不存在显著差异，*pat* 基因的整合和表达没有使受体植物比常规玉米更具有繁殖优势，只是比常规玉米抗除草剂草铵膦，同样地，繁殖能力不受影响。

3.2.3 休眠期；

T25 中抗除草剂草铵膦性状的导入未改变种子萌发能力 (测定休眠的关键参数) 和萌发能力的进化，其种子与非转基因玉米没有差异。

3.2.4 适应性；

T25 玉米和非转基因玉米间未观察到显著差异。根据 1995 年在安大略两个田间试验点的试验结果，抗除草剂草铵膦玉米 T25 在数量、产量、茎倒伏、根倒伏和病害等农艺性状上，与常规玉米之间无显著性差别，所以其适应性与非转基因玉米相当。

3.2.5 生存竞争能力；

玉米是一种高度驯化的作物，需要人类的干预才有可能实现高产，它本身不能作为杂草而存活。在特定的生长环境下，玉米可以越冬并在春季萌发，然而任何自生苗都能够很容易地通过机械或化学方法去除。自生苗不可能转变成杂草，与杂草不同，没有人类干预的玉米种子不太可能被散布。

根据田间试验结果，T25 的农艺性状与非转基因对照无明显差别。所以其生存竞争能力与常规玉米相同。

2003 年山东省农业科学院在栽培地、荒地和拓荒地条件下播种转基因玉米

及其亲本对照，其出苗率、长势、株型、生育期、株高等方面均无显著差异，在栽培地条件下两者之间产量差异不显著，与杂草的竞争力方面也无显著差异，后代种子发芽率无明显差异，玉米在山东省济南市能够越冬，但明春出苗率较低，越冬性较差，表明抗草铵膦玉米 T25 并未因为 *pat* 基因的引入而增强受体本来的生存竞争能力。

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；

玉米是一种高度驯化的农作物，需要人为干预方能实现高产。玉米花粉无法漂移很远距离，玉米种子很重，无法凭借风力传播。因此，在玉米种植区以外的地方很少能找到玉米自生苗。

玉米基因漂移到墨西哥类蜀黍等野生近缘种的问题在美国不显著，因为非栽培物种在地理上是受限制的，它们只存在于墨西哥和中美地区。墨西哥类蜀黍在这些地区与栽培玉米品种共存了数千年，但它们依然保持着自身独特的基因，只有为数极少的基因渐渗现象出现。虽然墨西哥类蜀黍的隔离种群过去曾出现在美国的佛罗里达和德克萨斯州，但到目前为止未见到有关它们的报道。墨西哥类蜀黍也被种植在植物园里，但它们极不可能出现花粉漂移现象。

在栽培 T25 玉米的国家，玉米的遗传物质可能通过异花授粉与其他玉米品种进行交换。在这种情况下，遗传物质可能会转移至杂交品种，种植这种杂交品种的目的是用做食品或饲料，而不是用于种子生产。因此遗传物质不会转移至下一代。

为了验证并检测转基因玉米 T25 外源基因流散的生态风险，山东省农业科学院植物保护研究所于 2003 年 6 月-12 月在济南对此进行了研究。结果表明：转基因玉米在花期株高明显低于普通受粉玉米，所以传播频率较低；转基因玉米通过划分向其他玉米风传的漂移距离一般不超过 150 m，玉米花粉的离体存活时间最大为 3 d，蜜蜂传播的距离比较远，所以转基因玉米试验要远离蜜蜂养殖区；根据相关文献，山东省未发现玉米田及周边杂草能够和玉米进行杂交的记载，并且没有能够与玉米杂交的其他作物或物种种植，所以存在物中间基因漂移的可能性很小。

3.2.7 转变成杂草的可能性；

玉米在美国没有被列在主要杂草名录内，也没有被联邦政府视为有害杂草。玉米在全世界各地都有种植，至今还未有报道为有害杂草。由于长时间的驯化，玉米已经失去了在野外生存的能力，没有人类的干预不能散布其种子。虽然玉米种子偶尔能在土壤中存活过冬，第二年在田中再生，但不靠栽培它无法持续繁殖，并且他们很容易通过机械和化学的方法去除。

如前所述，在墨西哥和瓜地马拉发现了玉米的野生亲缘种，除栽培以外玉米自身是不能持续繁殖，因此 T25 玉米在中国转变成杂草的可能性极小，加之进口玉米只用做加工原料，T25 玉米转变成杂草的可能性就更小了。

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

T25 产生 PAT/*pat* 蛋白，PAT/*pat* 蛋白的表达使植物对除草剂有效成分草铵膦具有抗性。就 PAT/*pat* 蛋白而言，没有安全性方面的问题。

对 T25 的农艺学特性和对病害敏感性的研究表明 T25 与常规玉米的安全性相当，没有转变为有害生物或杂草化的潜在威胁。

中国农业科学院植物保护研究所于 2003 年对生物多样性的研究结果表明：转基因玉米 T25 对田间节肢动物多样性，在物种生态优势度、天敌总量、小花蝽、蜘蛛和蓟马等捕食性天敌种群动态以及非靶标害虫玉米蚜的种群动态上，同非转基因对照相比没有显著影响，说明 T25 对玉米田节肢动物多样性没有显著影响。由于 T25 本身不具有抗虫基因，对主要鳞翅目害虫是感虫品种，亚洲玉米螟在 T25 及其对照品种上存活数量和为害程度基本一致。从对玉米主要病害的影响看，并没有因为转基因本身而导致病害发生严重。

以上结果均说明 T25 不会对环境带来任何不利影响。

3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用。

T25 玉米没有出现竞争能力增强或杂草化能力增强的影响，没有证据表明这一抗草铵膦的玉米品系会对环境产生不良影响，但它所具有的抗除草剂性状使低残留苗后除草剂可以施用，从而对农业和生态环境均有益。

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：

3.3.1 毒性；

拜耳作物科学公司对外源蛋白进行了详细的毒性分析，包括：外源蛋白的安全应用历史，与已知毒素同源性比对，小鼠急性经口毒性研究。在小鼠急性经口试验中所用蛋白为细菌表达的蛋白，原因是植物表达的外源蛋白的表达量不足以用于急性经口试验。因此，在急性经口毒性试验分析之前，对微生物表达的PAT/*pat* 蛋白与转基因玉米T25表达的PAT/*pat*蛋白进行了结构和功能方面的等同性分析。

I. 安全应用历史

膦丝菌素乙酰基转移酶（PAT）蛋白是由20世纪80年代中叶从绿棕褐链霉菌中分离出的*pat*基因编码的。绿棕褐链霉菌是世界各地都有的一种常见腐生细菌。土壤是这些微生物的主要栖息地，但从水中也能分离出这种细菌。可以预料的是，人类通过食用植物根和其他新鲜蔬菜会直接摄入这些微生物和化合物。据知，这些微生物不属于植物、人类或其他动物的致病菌。

绿棕褐链霉菌在1916年被首次描述。绿棕褐链霉菌属于革兰氏阳性产孢土壤微生物，常被称为放线菌。绿棕褐链霉菌可产生各种有用的抗菌（比如雷帕霉素和潮霉素B）和除草物质（L-PPT和Bialaphos，草铵膦的衍生物）。链霉菌属是被报道能够合成L-草铵膦（L-PPT；另一个是北里孢菌属）—氨基酸草铵膦的L-异构体—的两个属之一。

据报道，许多土壤细菌属都具有乙酰基转移酶活性和草铵膦耐受性。这种耐受性被认为已经演变成为一种竞争机制，目的是保护这些微生物免受它们自身以

及其他竞争性微生物产生的抗菌剂影响。它们之所以对草铵膦有耐受性，是因为 L-草铵膦（L-PPT，草铵膦的活性异构体）发生了乙酰化反应。

通过用重组DNA技术引入*pat*基因，人类已开发出一系列能够表达PAT酶的商用转基因作物。这些作物包括棉花、玉米、油菜、水稻和大豆。通过表达PAT蛋白，这些作物能除去L-草铵膦（L-PPT）的毒性，能对出苗后喷施的含有草铵膦有效成分的除草剂产生耐受性。

对表达新型蛋白质的转基因作物进行的安全评估，考虑了蛋白质的来源、蛋白质的活性和内在特性、以及蛋白质的潜在致敏性和毒性。绿棕褐链霉菌不属于植物、人类或其他动物的致病菌，而PAT蛋白像其他乙酰基转移酶一样，已知没有任何致敏性或毒性，拥有经过鉴定的活性和底物专一性。根据国际公认的方法和标准进行的一系列实验证明，PAT蛋白的结构和功能与已知的有毒蛋白质或过敏原没有相似性；它与已知过敏原和毒素没有序列同源性，它没有N-糖基化位点，在模拟的消化液环境中可以迅速降解。

II. 蛋白等同性分析

实验用表达 *pat* 基因的大肠杆菌产生的高纯度 PAT/*pat* 蛋白，评估 PAT/*pat* 蛋白与食物过敏源和毒素有关的特性。这些实验的结果表明，T25 玉米产生的 PAT/*pat* 蛋白质是安全的。

结构、生化和功能特性的比较证明如下几方面的内容：1) 用 Edman 降解法证明两种蛋白质相同；2) 根据 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）电泳中的蛋白质迁移率，确定两种蛋白质的分子质量没有区别；3) Western 印迹分析发现两种蛋白质的免疫活性相当；4) 糖蛋白 SDS-PAGE 染色表明，两种蛋白质的糖基化情况相同；5) 两种蛋白质都与相同的底物反应，证明它们有相同的生物活性。因此，获得的在大肠杆菌中产生的 PAT/*pat* 蛋白质安全性数据，可以用于证明在 T25 玉米中产生的 PAT/*pat* 蛋白安全性，在大肠杆菌中产生的 PAT/*pat* 蛋白能代表在 T25 玉米中产生的 PAT/*pat* 蛋白。

III. 与已知毒素的同源性检索

利用计算机模拟方法，评价了PAT/*pat*蛋白与已知毒素可能存在的氨基酸序列相似性。应用FASTA运算法则、BLOSUM50得分矩阵进行了氨基酸序列一致性检索。应用了如下两个方法：

- 与以下大型公共参比数据库中的所有蛋白质序列进行了总的一致性检索：Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PDB, DAD和GenPept。
- 与拜耳内部毒素数据库进行全氨基酸序列一致性检索。在文献中进一步查阅具有匹配序列的蛋白质的潜在毒性记录，以评价其生物学意义。

与预期的结果一样，对PAT/*pat*蛋白进行的总的同源性检索结果表明，该蛋白只与来源于不同细菌的其他乙酰基转移酶具有主要的相似性。另外，与拜耳毒素数据库中的毒性蛋白的比对结果显示并无显著相似性。因此，PAT/*pat*蛋白不具备成为潜在毒素的特征。

IV. 急性毒性研究

拜耳作物科学公司为了评估 PAT/*pat* 蛋白对于雄鼠和雌鼠 C57BL/6J 的急性口服毒性，按照 2000 mg/kg 体重的极限剂量标准，对包含 10 只雄鼠和 10 只雌

鼠（C57BL/6J）的一组小鼠饲喂PAT/pat蛋白。同时，设置了饲喂同等剂量的仅含溶剂的对照组。每日观察所有动物的临床症状，连续观察15d；每周测定一次小鼠体重和摄食量。试验结束时，将动物进行尸体解剖，包括进行肉眼观察。并保存小鼠组织，以供后期可能的病理切片显微观察。

急性经口饲喂2000 mg/kg体重的PAT/pat蛋白后，小鼠没有出现死亡或者与摄入该蛋白有关的临床症状，体重和摄食量未受影响，在尸检过程中不存在大体变化。

综上所述，经口饲喂2000 mg/kg体重的PAT/pat蛋白后，对雄/雌C57BL/6J小鼠不会产生任何全身中毒症状。

V. 90天大鼠喂养试验

2003年10月-2004年2月，由天津市卫生防病中心将拜耳作物科学公司的转基因玉米T25掺入饲料（掺入比例为50%），饲喂大鼠90天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因玉米T25对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察均未发现生物学意义的改变。

3.3.2 过敏性；

I. 与已知过敏原氨基酸序列同源性检索

应用几种计算机模拟的方法，评价了PAT/pat蛋白与已知过敏原之间可能存在的氨基酸序列的相似性。

- 进行了抗原表位检索，以鉴定可能代表分开的、但共同构成潜在过敏原表位的短氨基酸短链。这一抗原表位检索将PAT/pat蛋白的氨基酸序列与过敏原公共数据库中存在的所有已知过敏原的氨基酸序列进行比较。
- 应用FASTA运算法则进行了总的氨基酸序列一致性检索，将PAT/pat蛋白的整个氨基酸序列与过敏原公共数据库中存在的所有蛋白质序列进行比较。抗原表位同源性检索结果表明，检索蛋白与已知过敏蛋白的抗原表位没有一致性。此外，总的氨基酸一致性检索表明，PAT/pat蛋白与过敏原公共数据库中的已知过敏原没有相关的序列相似性。

在PAT/pat蛋白的氨基酸序列中未发现潜在N-糖基化位点。

总之，由于PAT/pat蛋白的氨基酸序列与已知过敏原之间不存在显著的同源性，这就支持该蛋白不可能具有过敏性这一结论。

II. 热稳定性分析

测试了PAT/pat蛋白（由pat基因编码）于60、75和90℃下加热10、30、60 min后的稳定性。通过考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE对蛋白质进行了检测。

由pat基因编码的PAT/pat蛋白条带（SDS-PAGE检测）在90℃加热60 min后蛋白发生了轻微的降解。

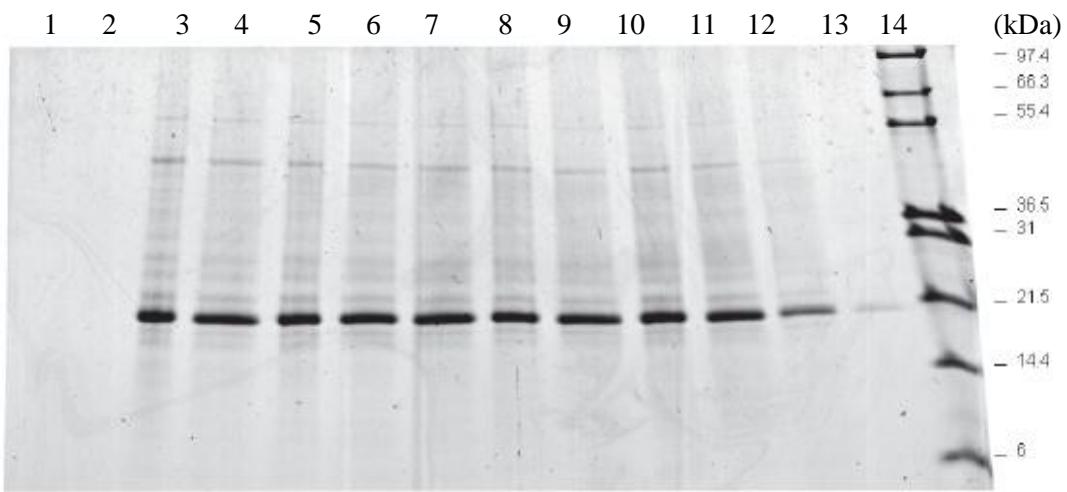


图 9: SDS—PAGE 检测 PAT/pat 蛋白热稳定性

- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| 泳道1: 60℃孵育缓冲液60 min | 泳道8: 75℃孵育PAT/pat蛋白30 min |
| 泳道2: 90℃孵育缓冲液60 min | 泳道9: 75℃孵育PAT/pat蛋白60 min |
| 泳道3: 4℃孵育PAT/pat蛋白0 min | 泳道10: 90℃孵育PAT/pat蛋白10 min |
| 泳道4: 60℃孵育PAT/pat蛋白10 min | 泳道11: 90℃孵育PAT/pat蛋白30 min |
| 泳道5: 60℃孵育PAT/pat蛋白30 min | 泳道12: 90℃孵育PAT/pat蛋白60 min |
| 泳道6: 60℃孵育PAT/pat蛋白60 min | 泳道13: 4℃孵育稀释10倍PAT/pat蛋白0 min |
| 泳道7: 75℃孵育PAT/pat蛋白10 min | 泳道14: 分子量标记 |

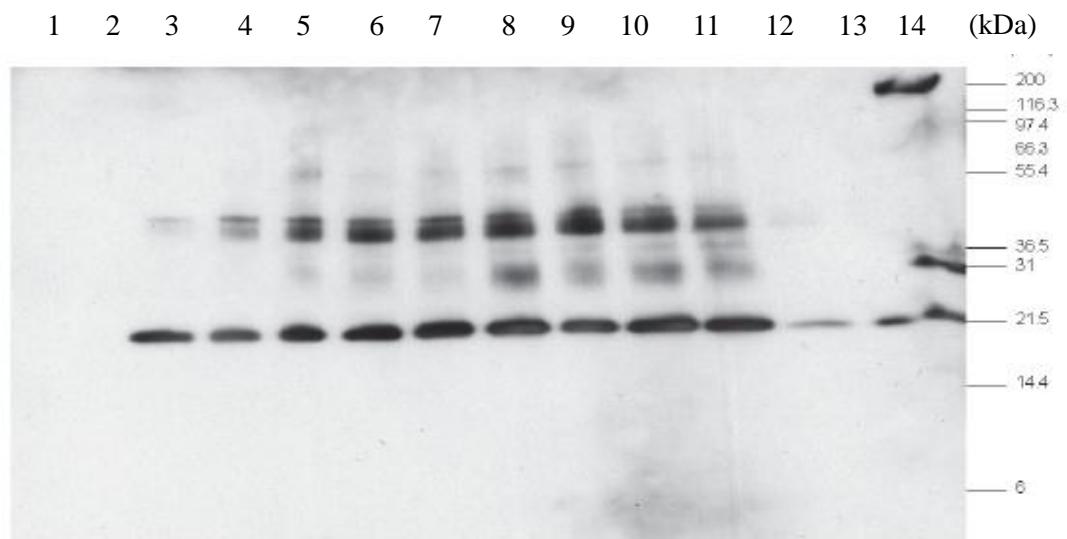


图 10: Western 杂交检测 PAT 蛋白热稳定性

- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| 泳道1: 60℃孵育缓冲液60 min | 泳道8: 75℃孵育PAT/pat蛋白30 min |
| 泳道2: 90℃孵育缓冲液60 min | 泳道9: 75℃孵育PAT/pat蛋白60 min |
| 泳道3: 4℃孵育PAT/pat蛋白0 min | 泳道10: 90℃孵育PAT/pat蛋白10 min |
| 泳道4: 60℃孵育PAT/pat蛋白10 min | 泳道11: 90℃孵育PAT/pat蛋白30 min |
| 泳道5: 60℃孵育PAT/pat蛋白30 min | 泳道12: 90℃孵育PAT/pat蛋白60 min |
| 泳道6: 60℃孵育PAT/pat蛋白60 min | 泳道13: 4℃孵育稀释10倍PAT/pat蛋白0 min |
| 泳道7: 75℃孵育PAT/pat蛋白10 min | 泳道14: 分子量标记 |

III. 体外模拟胃液消化

在 pH1.2、含有胃蛋白酶的模拟人体胃液 (SGF) 中培养 0.5-60 min 后, 测试了 PAT/*pat* 蛋白 (由 *pat* 基因编码, 大肠杆菌表达) 的可消化性。

在 37°C 左右的条件下, 将测试蛋白或参比蛋白溶液在模拟的人体胃液 (pH 1.2 的胃蛋白酶溶液) 中孵育, 取等分样品分别在 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 和 60 min 这几个时间点进行分析。用考马斯亮蓝染色的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) (图 11) 和 Western (图 12) 印迹杂交, 分析样品中是否存在测试蛋白, 或可能的稳定性蛋白质片段。应用抗 PAT/*pat* 蛋白的多克隆抗体进行免疫测定。相应的对照包括: pH 1.2 无胃蛋白酶存在的测试蛋白 (0 和 60 min 两个时间点)、模拟的人体胃液 (0 和 60 min 两个时间点)、10% 的测试蛋白上样对照。同时平行测定了已知可被快速消化的参比蛋白辣根过氧化物酶 (HRP) (图 13) 和已知可被缓慢消化的参比蛋白卵清蛋白 (OVA) (图 14)。

在 pH 1.2、胃蛋白酶存在时, 在模拟的胃液中孵育不到 0.5 min, PAT/*pat* 蛋白迅速地被降解。

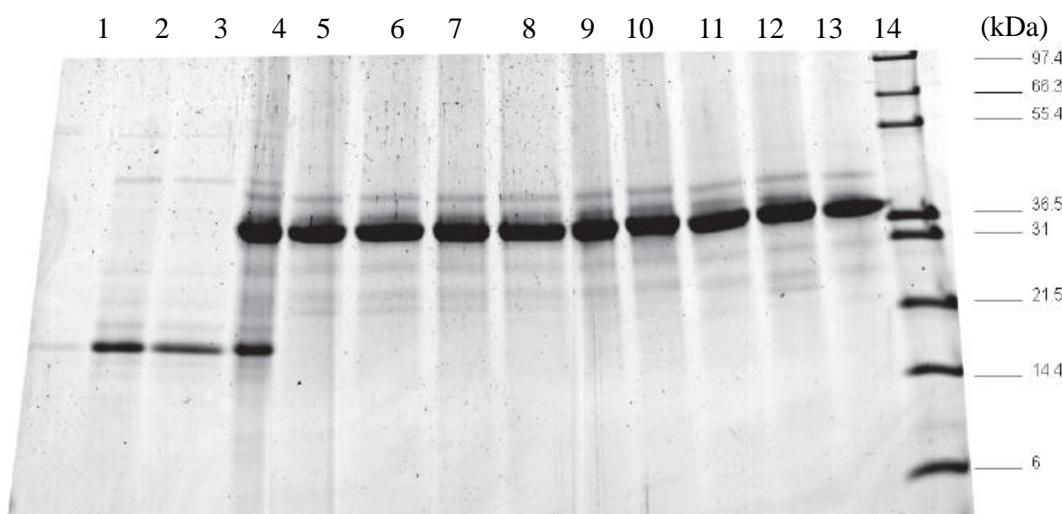


图 11: PAT/*pat* 蛋白在模拟人体胃液中消化后的考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE

- | | |
|--|--|
| 泳道1: 稀释10倍的PAT/ <i>pat</i> 蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道8: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化10 min |
| 泳道2: PAT/ <i>pat</i> 蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道9: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化20 min |
| 泳道3: PAT/ <i>pat</i> 蛋白无胃蛋白酶条件下消化60 min | 泳道10: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化30 min |
| 泳道4: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道11: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化60 min |
| 泳道5: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化0.5 min | 泳道12: 仅有模拟胃液消化0 min |
| 泳道6: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化2 min | 泳道13: 仅有模拟胃液消化10 min |
| 泳道7: PAT/ <i>pat</i> 蛋白有胃蛋白酶条件下消化5 min | 泳道14: 分子量标记 |

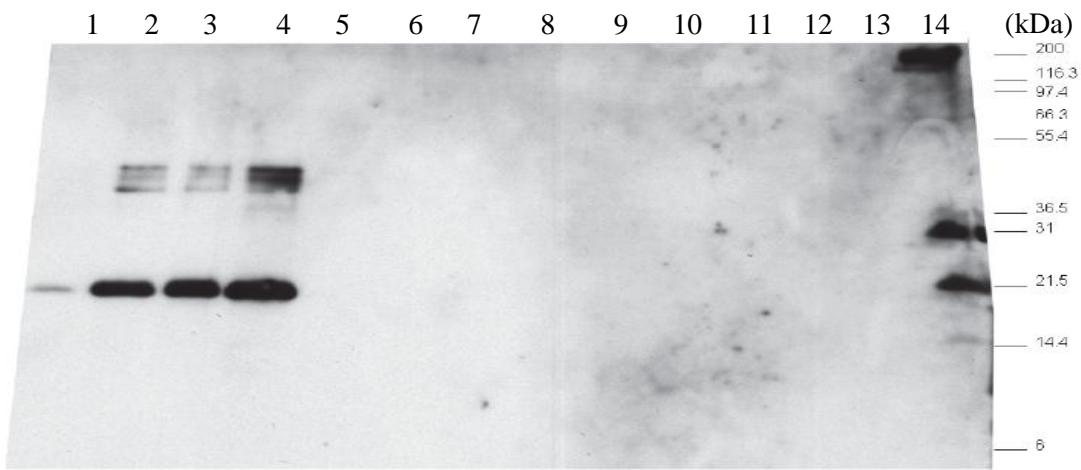


图 12: PAT 蛋白在模拟人体胃液中消化后的 Western 杂交

泳道1: 稀释10倍的PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下
消化0 min 泳道8: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化10 min

泳道2: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min

泳道3: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化60 min

泳道4: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0 min

泳道5: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0.5 min

泳道6: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化2 min

泳道7: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化5 min

泳道9: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化20 min

泳道10: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化30 min

泳道11: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化60 min

泳道12: 仅有模拟胃液消化0 min

泳道13: 仅有模拟胃液消化10 min

泳道14: 分子量标记

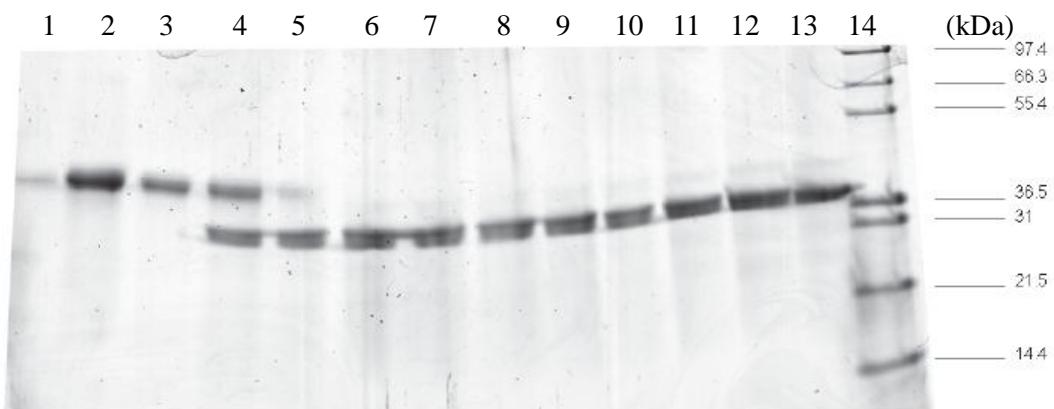


图 13: 辣根过氧化物酶 (HRP) 蛋白在模拟人体胃液中消化后的考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE

泳道1: 稀释10倍的PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下
消化0 min 泳道8: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化10 min

泳道2: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min

泳道3: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化60 min

泳道4: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0 min

泳道5: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0.5 min

泳道6: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化2 min

泳道7: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化5 min

泳道9: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化20 min

泳道10: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化30 min

泳道11: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化60 min

泳道12: 仅有模拟胃液消化0 min

泳道13: 仅有模拟胃液消化10 min

泳道14: 分子量标记

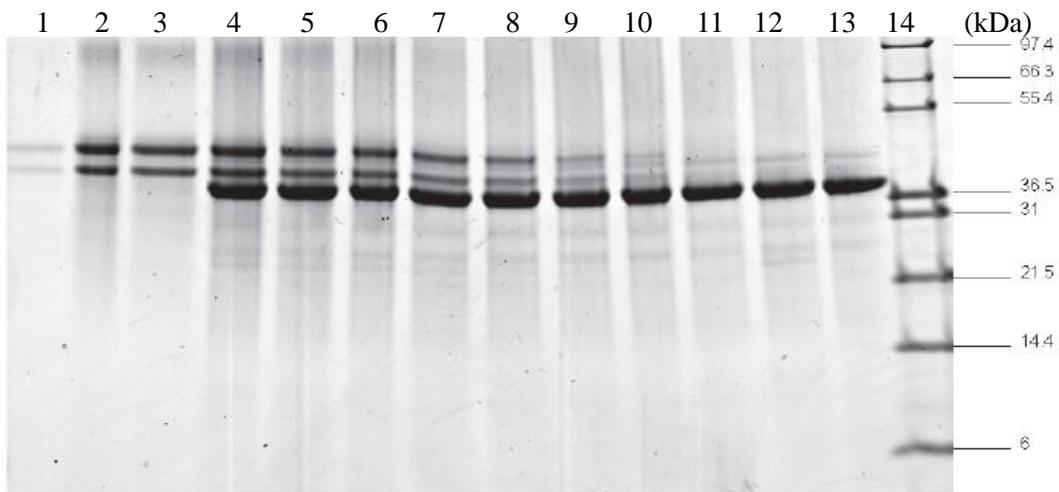


图 14: 蛋白卵清蛋白 (OVA) 在模拟人体胃液中消化后的考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 泳道1: 稀释10倍的PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道8: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化10 min |
| 泳道2: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道9: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化20 min |
| 泳道3: PAT/pat蛋白无胃蛋白酶条件下消化60 min | 泳道10: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化30 min |
| 泳道4: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0 min | 泳道11: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化60 min |
| 泳道5: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化0.5 min | 泳道12: 仅有模拟胃液消化0 min |
| 泳道6: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化2 min | 泳道13: 仅有模拟胃液消化10 min |
| 泳道7: PAT/pat蛋白有胃蛋白酶条件下消化5 min | 泳道14: 分子量标记 |

3.3.3 抗营养因子;

2004年,由天津市卫生防病中心对拜耳作物科学公司的转基因玉米T25和其本对照进行了胰蛋白酶抑制剂和植酸含量的检测,检测依据的方法是AACC方法71-10和GB/T17406-1998。检测结果表明植酸含量在标准值(市售玉米)的范围内(表6)。

表6: 抗营养因子检测结果

检测项目	检测结果	
	转基因玉米T25	亲本对照
胰蛋白酶抑制剂TIU/g	228	245
植酸mg/100 g	627	578

3.3.4 营养成份;

拜耳作物科学公司用两年时间对15个试验地点采集的转基因玉米T25、亲本对照玉米和普通杂交玉米进行成分分析和营养分析。每个试验均包括亲本对照玉米、没有喷施草铵膦的转基因玉米T25和喷施草铵膦的转基因玉米T25。

成分分析和营养分析的成分包括玉米的重要基本营养成分,即常规成分、微量元素(如维生素和矿物质)、肌醇六磷酸、氨基酸和脂肪酸。

确定了非转基因组以及两个转基因处理组样品的所有基本成分、钠、所有总氨基酸、游离半胱氨酸、大多数总脂肪酸和游离脂肪酸具有实质等同性。对于一些成分，可在各试验点的每一比较中确定实质等同性。

基于表7-表12的数据，虽然在转基因玉米T25与非转基因对照玉米在营养组分中存在一些差异，所有谷粒的营养值都在报道的谷粒营养值范围之内。总膳食纤维、矿物质、维生素、游离氨基酸和二十烯酸以及游离亚麻酸在统计学上有显著差异，但这些统计学上的差异对T25玉米的营养价值没有影响。在每个试验地点的三个对比组中，没有发现某一化合物超过或低于20%的生物等价范围，一些物质统计学上的差异并不影响转基因玉米T25的营养价值，所有分析的化合物在目前市售玉米的营养范围内。

总之，转基因玉米T25的谷粒与传统的非转基因玉米在组成成分和营养价值上是等价的，转基因途径培育的T25玉米不会对玉米的营养价值产生影响。

表7：转基因玉米T25、非转基因玉米和市售玉米谷粒中成分含量

组分	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂	标准值范围(市售玉米)
水分%fw (鲜重中百分比)	27.41±9.27	27.47±9.23	27.14±8.99	7-23
脂肪%dm (干重中百分比)	4.91±0.53	4.99±0.51	4.97±0.51	3.1-5.8
蛋白质%dm (干重中百分比)	9.28±1.12	9.27±0.96	9.30±1.29	6-12.7
总膳食纤维%dm (干重中百分比)	10.77±1.32	10.93±1.36	11.30±1.40	10.5-11.1
灰分%dm (干重中百分比)	1.51±0.21	1.48±0.19	1.47±0.18	1.1-3.9
总碳水化合物%dm (干重中百分比)	84.30±1.57	84.27±1.39	84.17±1.60	82.2-86.15
可得碳水化合物%dm (干重中百分比)	73.52±2.18	73.34±2.25	72.87±2.62	66.5-78.7

a 总碳水化合物按100%计算 (蛋白质%dm+脂肪%dm+灰分%dm)

b 可得碳水化合物按100%计算 (蛋白质%dm+脂肪%dm+灰分%dm)

表8: T25玉米、非转基因玉米和市售玉米谷粒中矿物质、维生素和植酸成分含量

参数	在干物质基础上			
	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂	标准值范围(市售玉米)
钙 mg/kg	45.6±19.3	43.4±12.7	44.9±12.7	30-1000
磷 mg/kg	2783±523	2769±467	2992±547	2340-7500
钾 mg/kg	3428±446	3492±498	3679±547	3200-7200
镁 mg/kg	989±150	991±147	1056±166	820-10000
钠 mg/kg	<100	<100	<100	0-1500
铁 mg/kg	22.9±7.1	22.6±6.5	25.3±6.4	1-100
锰 mg/kg	4.8±1.3	4.7±1.0	5.1±1.5	1.71-9.14
铜 mg/kg	1.5±0.5	1.8±0.6	2.0±0.7	0.8-10
锌 mg/kg	16.9±4.2	17.2±4.5	18.5±5.8	12-30
氯 g/100g	0.04±0.02	0.04±0.02	0.03±0.02	0.014-0.05
维生素B1 mg/100g	0.31±0.08	0.32±0.07	0.33±0.07	0.23-0.86
维生素B2 mg/100g	0.17±0.03	0.16±0.03	0.17±0.03	0.025-0.56
烟酸 mg/100g	2.21±0.37	2.25±0.43	2.21±0.45	0.93-7.0
泛酸 mg/100g	0.79±0.18	0.80±0.21	0.78±0.18	0.47-0.8
叶酸 μg/100g	49±13	48±13	48±12	17-46
α-生育酚 mg/100g	0.63±0.41	0.60±0.39	0.59±0.40	0.10-2.55
β-生育酚 mg/100g	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0-1.58
γ-生育酚 mg/100g	4.63±1.36	4.66±1.54	4.58±1.54	1.19-11.0
δ-生育酚 mg/100g	0.16±0.11	0.18±0.14	0.17±0.12	0.10-0.334
α-Tocotrieonol mg/100g	0.65±0.18	0.62±0.17	0.60±0.16	0-1.06
活性维生素E mg/100g	1.96±0.44	1.93±0.42	1.90±0.42	0.3-6.63
植酸 mg/100g	477±160	517±142	532±99	450-1260

表9: T25玉米、非转基因玉米和市售玉米谷粒中总氨基酸含量

参数	g/kg 干物质			
	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂	标准值范围(市售玉米)
丙氨酸	6.90±0.97	6.90±0.85	6.98±0.79	5.6-10.4
精氨酸	3.95±0.44	3.94±0.40	3.99±0.41	2.2-6.4
天冬氨酸+天冬酰胺	6.20±0.85	6.23±0.86	6.30±0.76	4.8-8.5
胱氨酸	1.77±0.30	1.80±0.15	1.83±0.19	0.8-3.2
谷氨酸+谷氨酰胺	17.05±2.74	17.08±2.33	17.24±2.27	12.5-25.8
甘氨酸	3.41±0.31	3.39±0.29	3.43±0.27	2.6-5.0
组氨酸	2.26±0.28	2.26±0.28	2.28±0.27	1.5-3.8
异亮氨酸	2.94±0.43	2.96±0.38	2.96±0.36	2.2-7.1
亮氨酸	11.11±1.84	11.18±1.58	11.24±1.52	7.9-24.1
赖氨酸	2.77±0.23	2.73±0.31	2.81±0.20	0.5-5.5
蛋氨酸	1.70±0.28	1.76±0.18	1.79±0.21	1.0-4.6
苯丙氨酸	4.50±0.67	4.49±0.56	4.51±0.56	2.9-6.4
脯氨酸	7.79±1.01	7.79±0.89	7.76±0.73	6.3-13.6
丝氨酸	4.50±0.62	4.52±0.55	4.56±0.52	3.5-9.1
苏氨酸	3.38±0.38	3.38±0.37	3.41±0.34	2.7-5.8
色氨酸	0.81±0.06	0.81±0.07	0.82±0.09	0.4-1.3
酪氨酸	2.79±0.43	2.82±0.39	2.86±0.37	1.2-7.9
缬氨酸	4.10±0.52	4.11±0.48	4.12±0.43	2.1-8.5

表10: T25玉米、非转基因玉米和市售玉米谷粒中游离氨基酸含量

参数	g/kg 干物质		
	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂
丙氨酸	0.221±0.166	0.221±0.166	0.232±0.187
精氨酸	0.167±0.093	0.171±0.112	0.173±0.113
天冬氨酸	0.364±0.234	0.373±0.265	0.379±0.258
天冬酰胺	0.447±0.291	0.456±0.338	0.455±0.309
胱氨酸	<0.001	<0.001	<0.001
谷氨酸	0.175±0.158	0.156±0.132	0.155±0.126
谷氨酰胺	0.139±0.129	0.143±0.156	0.148±0.158
甘氨酸	0.048±0.020	0.050±0.024	0.049±0.024
组氨酸	0.050±0.020	0.048±0.023	0.049±0.024
异亮氨酸	0.041±0.030	0.041±0.035	0.042±0.035
亮氨酸	0.079±0.055	0.083±0.068	0.083±0.064
赖氨酸	0.170±0.107	0.169±0.109	0.172±0.112
蛋氨酸	0.026±0.013	0.027±0.017	0.026±0.016
苯丙氨酸	0.061±0.046	0.062±0.054	0.062±0.053
脯氨酸	0.658±0.198	0.670±0.136	0.675±0.143
丝氨酸	0.115±0.090	0.118±0.102	0.121±0.106
苏氨酸	0.067±0.040	0.069±0.048	0.068±0.046
色氨酸	0.021±0.008	0.022±0.009	0.021±0.009
酪氨酸	0.074±0.036	0.075±0.040	0.075±0.041
缬氨酸	0.063±0.035	0.065±0.044	0.066±0.044
合计	2.87±1.19	2.90±1.37	2.93±1.40

表11：T25玉米、非转基因玉米和市售玉米谷粒中总脂肪酸含量

总脂肪酸	g/kg 干物质			
	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂	标准值范围
饱和的				
豆蔻酸C14:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.05-0.3
棕榈酸C16:0	12.69±0.81	12.53±0.85	12.51±0.89	8.6-17.7
十七烷酸C17:0	<0.10-0.10	<0.10-0.10	<0.10	<0.05-0.1
十八烷酸C18:0	1.71±0.21	1.69±0.22	1.70±0.23	<0.05-3.3
二十烷酸C20:0	0.37±0.05	0.37±0.04	0.37±0.05	0.3-2.04
二十二烷酸C22:0	<0.1-0.17	<0.1-0.14	<0.1-0.24	<0.05-0.5
二十四烷酸C24:0	<0.1-0.19	<0.1-0.19	<0.1-0.20	<0.05-0.5
总饱和的	14.77	14.59	14.58	-
单不饱和的				
棕榈油酸C16:1	0.17±0.08	0.16±0.04	0.16±0.05	<0.05-1.02
油酸C18:1	26.31±2.34	26.53±2.53	26.40±2.62	20.0-42.2
二十烯酸C20:1	0.28±0.05	0.28±0.04	0.27±0.04	0.2-0.6
总单不饱和的	26.76	26.97	26.83	-
多不饱和的				
亚油酸C18:2	57.08±2.23	57.06±2.53	57.22±2.57	34.0-65.6
亚麻酸C18:3	1.36±0.14	1.33±0.14	1.32±0.14	<0.05-2.0
总多不饱和的	58.44	58.39	58.54	-
合计	99.97	99.95	99.95	-

表12：T25玉米、非转基因玉米和市售玉米谷粒中游离脂肪酸含量

总脂肪酸	g/kg 干物质		
	非转基因玉米	转基因玉米未喷除草剂	转基因玉米喷除草剂
豆蔻酸C14:0	<0.1-0.26	<0.1-0.26	<0.1-0.32
棕榈酸C16:0	19.45±3.37	18.95±2.87	19.02±3.74
棕榈油酸C16:1	<0.1-0.64	<0.1-0.32	<0.1-0.33
十七烷酸C17:0	<0.1-0.16	<0.1-0.1	<0.1-0.14
十八烷酸C18:0	1.52±0.19	1.48±0.18	1.48±0.18
油酸C18:1	21.90±2.84	21.94±2.79	21.95±3.09
亚油酸C18:2	54.86±4.20	55.51±3.58	55.44±3.91
亚麻酸C18:3	1.91±0.48	1.86±0.58	1.84±0.55
二十烷酸C20:0	<0.1-2.06	<0.1-2.00	<0.1-1.99
二十烯酸C20:1	<0.1-0.30	<0.1-0.22	<0.1-0.30
二十二烷酸C22:0	<0.1-0.74	<0.1-0.21	<0.1-0.86
二十四烷酸C24:0	<0.1-0.89	<0.1-0.69	<0.1-0.54

3.3.5 抗生素抗性；

在产生转化质粒pUC/Ac的过程中, *ampR(bla基因)*作为选择性标记基因使用。*bla*基因编码TEM-β-lactamase, 通过断开β-乳糖酶环TEM-β-lactamase使β-乳糖酶抗生素如青霉素和头孢霉菌素失活。*bla*基因是大肠杆菌转座子TnA3的一部分, TnA3在各种质粒/R因子中广泛存在。*ampR(bla基因)*在T25中被切断成片段, 这些片段不能转录或翻译成活性蛋白。

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响。

自20世纪80年代后期玉米转化植株T25被开发以来, 没有发现因种植、生产、消费T25玉米原料而对人类健康和食品安全产生不利影响。1996年以来, T25玉米已在北美种植, 在北美和的其他国家批准可使用经这种玉米加工成的食品和饲料, 没有关于它对人类健康或食品安全有不利影响的报道。

3.4 根据上述评价, 参照本办法第十三条有关标准划分转基因植物的安全等级。

转基因玉米T25是利用安全等级为I的受体, 并利用安全等级为I的类型2的转化方法转化后获得的。大量的研究表明 T25 转化事件对人类和动物健康以及对生态环境的安全性的影响与常规非转基因玉米是一致的。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十三条的规定, 转基因玉米T25应该属于安全等级I。

4 转基因植物产品的安全性评价

4.1 生产、加工活动对转基因植物安全性的影响。

比较 T25 玉米和常规玉米的重要营养组成,发现两者没有实质区别, T25 中的转基因不会编码任何影响加工的性状。因此,既然已知 T25 玉米的组成和转基因的性质,没有理由相信加工会引起 T25 玉米和常规玉米在安全性上的差异。T25 玉米的加工方式与常规玉米一样。

4.2 转基因植物产品的稳定性。

分子特性分析表明, T25 中的插入片段在转化体 T25 及其后代中稳定存在, T25 中表达的 PAT/pat 蛋白在模拟消化液中能够迅速降解,热处理条件下其活性也会显著降低。

4.3 转基因植物产品与转基因植物在环境安全性方面的差异。

转基因植物与转基因植物产品在环境安全性方面没有差异,它们对环境均没有不利影响。PAT/pat 蛋白的特性已了解得非常清楚,它具有非常特异的功能,不具有毒性或过敏性。插入 pat 基因并不改变植物的一般性质,例如农艺性状、包括营养和天然抗营养因子在内的种子的总组成。因此比较经常规玉米加工的产品,经转基因 T25 玉米加工的产品没有差异。

4.4 转基因植物产品与转基因植物在对人类健康影响方面的差异。

已经证实 T25 玉米与常规玉米的组成实质上没有差异,两者的加工方式相同。尽管 T25 玉米含 PAT/pat (PAT/pat 在常规玉米中不存在),但从营养角度看 PAT/pat 的水平对营养不重要。PAT/pat 不引起毒性或过敏性,它对热和酸不稳定,与原产品相比它在加工产品中的量很小,甚至检测不出来。

因此认为,与非转基因玉米相比转基因植物及其产品在对人类健康的影响方面没有任何差异,在消费 T25 玉米国家未见有关关注它对人类健康影响的报道。

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。

综上所述,玉米所采用的生产加工方法不会影响玉米产品的安全性,因此,根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十四条的规定,玉米转化事件 T25 安全等级为 I 级。

六、相关附件资料

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

pat 基因大小为 552 bp, 核苷酸序列

涉及商业保密资料, 在本公开版本中已删除

PAT/*pat* 蛋白有 183 个氨基酸, 推导的氨基酸序列

```
1 msperrpvei rpataadmaa vcdinvhyie tstvnfrtep qtpqewiddl erlqdrypwl
 61 vaevegvvag iayagpwkar naydwtvest vyvshrhgrl glgstlythl lksmeaqgfk
121 svvaviglpn dpsvrlheal gytargtlra agykhggwhd vgfqwqrdfel papprpvrpv
181 tqi
```

2. 目的基因与载体构建的图谱

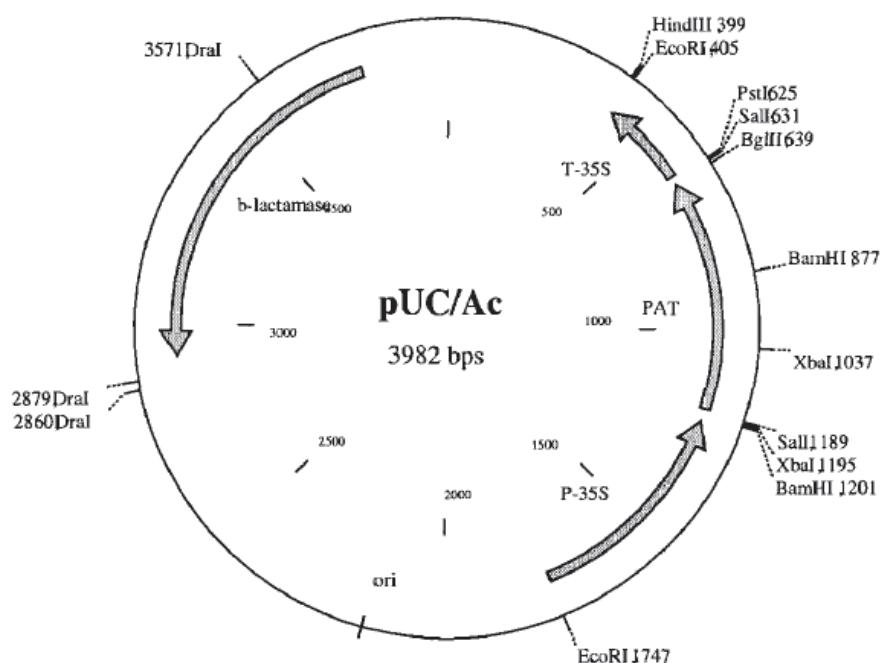


图 6-1¹: T25 转化用质粒 pUC/Ac 图谱

¹ 为了与正文区分图表编码。在本章节图表编号为 6-1, 6-2...

表 6-1: pUC/Ac 的组成描述

核苷酸的位置	说明及文献
412-618	35S 终止子, 来自载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), pp. 5857-5868)
619-636	合成的多接头序列
637-1188	合成的 <i>pat</i> 基因 (来自绿棕褐链酶菌的氨基酸序列) (Strauch et al. (1993) European patent 275957 B1))
1189-1216	合成的多接头序列
1217-1746	35S 启动子来自载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), pp. 5857-5868)
1747-411	载体 pUC18 的序列, 包括 β -内酰胺酶基因 (第 2922-3782 位) 和第 2163 位的复制起点 (Yanisch-Perron et al., (1985), Gene 33, pp. 103-119)

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 T25 外源插入序列及其相邻基因组侧翼序列的 PCR 分析;

3.2 T25 插入拷贝数分析;

3.3 T25 外源蛋白表达量检测;

3.4 T25 插入序列的世代稳定性的 Southern 杂交分析。

3.1 T25 外源插入序列及其相邻基因组侧翼序列的 PCR 分析

玉米转化事件 T25 的 *pat* 基因以单拷贝插入, 作为 P35S-*pat*-T35S 表达盒的一部分而存在。在 pUC/Ac 中组成 *pat* 基因表达的 DNA 序列组件的 35S 启动子和终止子来源于花椰菜花叶病毒, 选择性标记基因 *ampR(bla)* 基因被切断并且不表达。插入序列扩增片段示意图见图 6-2。插入序列的侧翼基因组 DNA 序列见图 6-3。

涉及商业保密资料, 在本公开版本中已删除

图 6-2: T25 插入序列扩增片段示意图

T25 中插入序列及基因组侧翼序列见图 6-3。

涉及商业保密资料, 在本公开版本中已删除

图 6-3: T25 插入序列及侧翼序列

3.2 T25 插入拷贝数分析

提取转基因玉米T25及其非转基因玉米(品种B73)的基因组DNA, 利用P35S探针和转化质粒(pUC/Ac)探针对一系列酶切片段进行Southern印记杂交分析(图6-4和图6-5)。将基因组DNA进行限制性酶切得到的DNA片段用琼脂糖凝胶电泳分离后转化到膜上, 将印迹与P35S探针进行杂交, 来证实P35S的拷贝数; 用完整的T-DNA探针进行杂交, 证实DNA样品的性质。

P35S 探针 (见图 6-4) 杂交结果:

玉米T25基因组DNA用*Nco* I酶切消化, 并与P35S探针进行杂交, 结果发现8000 bp左右大小的整合片段和4600 bp左右大小的整合片段(见图6-4, 第4泳道)。

玉米T25基因组DNA用*Eco*R V酶切消化, 并与P35S探针进行杂交, 结果发现约11 kb的3'端整合片段。预期的190 bp的内部片段因太小而无法看到(图6-4, 第5泳道)。P35S探针与5'端*Eco*R V整合片段不具有任何同源性。

玉米T25基因组DNA用*Eco*R I酶切消化, 并与P35S探针进行杂交, 结果发现预期大小的1342 bp的内部片段和3'端整合片段(大于14 kb)(图6-4, 第8泳道)。P35S探针与5'端*Eco*RI整合片段不具有任何同源性。

玉米T25基因组DNA用*Dra* I酶切消化, 并与P35S探针进行杂交, 发现2400 bp左右大小和5200 bp左右大小的两个整合片段(图6-4, 第9泳道)。

用P35S探针所得到的T25 Southern印迹杂交结果与T25插入序列的结构一致。未检测到另外的杂交片段。这些结果证实在转基因玉米T25中存在两个P35S启动子片段。

转化质粒探针 (见图 6-5) 杂交结果:

玉米T25基因组DNA用*Nco* I酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现8000 bp左右大小的整合片段和4600 bp左右大小的整合片段(见图6-5, 第4泳道), 这两个片段也能与P35S启动子探针杂交。

玉米T25基因组DNA用*Eco*R V酶切消化, 并与转化质粒pUC/Ac进行杂交, 结果发现两个预期大小的整合片段。3800 bp左右大小的整合片段表示5'端整合片段, 约11 kb左右的片段表示3'端整合片段(图6-5, 第5泳道)。这一个11 kb的片段也能与P35S启动子探针杂交。

玉米T25基因组DNA用*Eco*R I酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现1342 bp的内部片段, 一个8 kb左右的5'端整合片段和大于14 kb的3'端整合片段(图6-5, 第8泳道)。内部片段和3'端整合片段也能与P35S启动子探针杂交。

玉米T25基因组DNA用*Dra* I酶切消化, 并与转化质粒进行杂交, 结果发现一个692 bp的内部片段, 以及2400左右大小和5200 bp左右大小的两个整合片段(图6-5, 第9泳道)。这两个整合片段也能与P35S启动子探针杂交。

用转化质粒作探针进行杂交, 结果所有片段的数量和大小都与预期相符。这一观察结果证实所制备的T25基因组DNA的性质。

综上,用P35S探针进行杂交的结果与T25插入序列的结构相一致,没有检测到另外的杂交片段,证实了转基因玉米T25中存在两个P35S启动子片段。

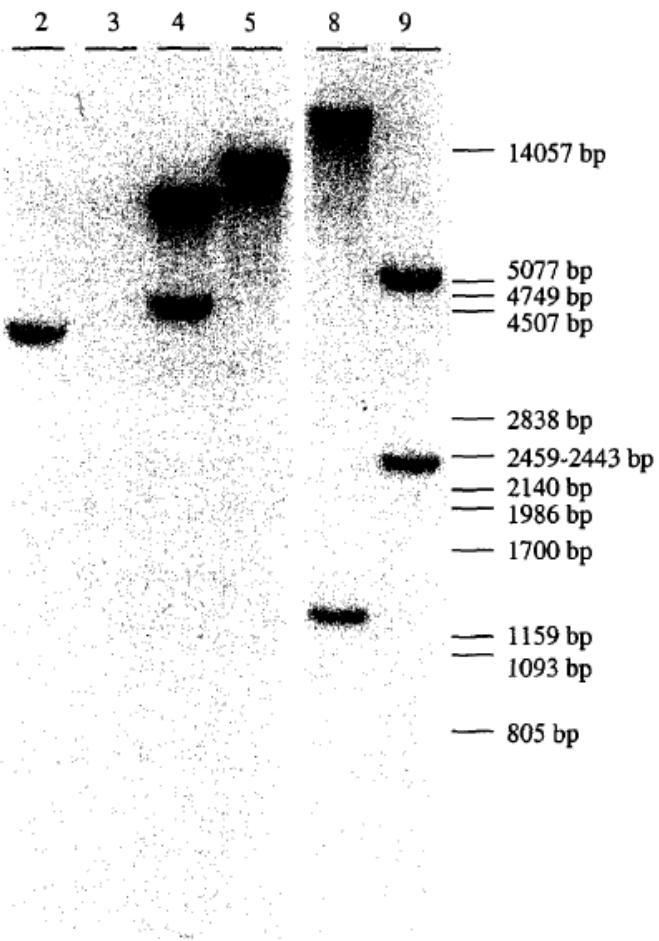


图 6-4: 转基因玉米 T25 的 Southern 杂交—探针: P35S 探针

凝胶上样顺序:

- 泳道 1: 噬菌体λDNA: *Pst* I 单酶切消化
- 泳道 2: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化+1 个拷贝的 pUC/Ac-*Hind* III 消化
- 泳道 3: 野生型玉米 B73- *Nco* I 消化
- 泳道 4: 转基因玉米 T25- *Nco* I 消化
- 泳道 5: 转基因玉米 T25- *Eco*R V 消化
- 泳道 8: 转基因玉米 T25- *Eco*R I 消化
- 泳道 9: 转基因玉米 T25- *Dra* I 消化

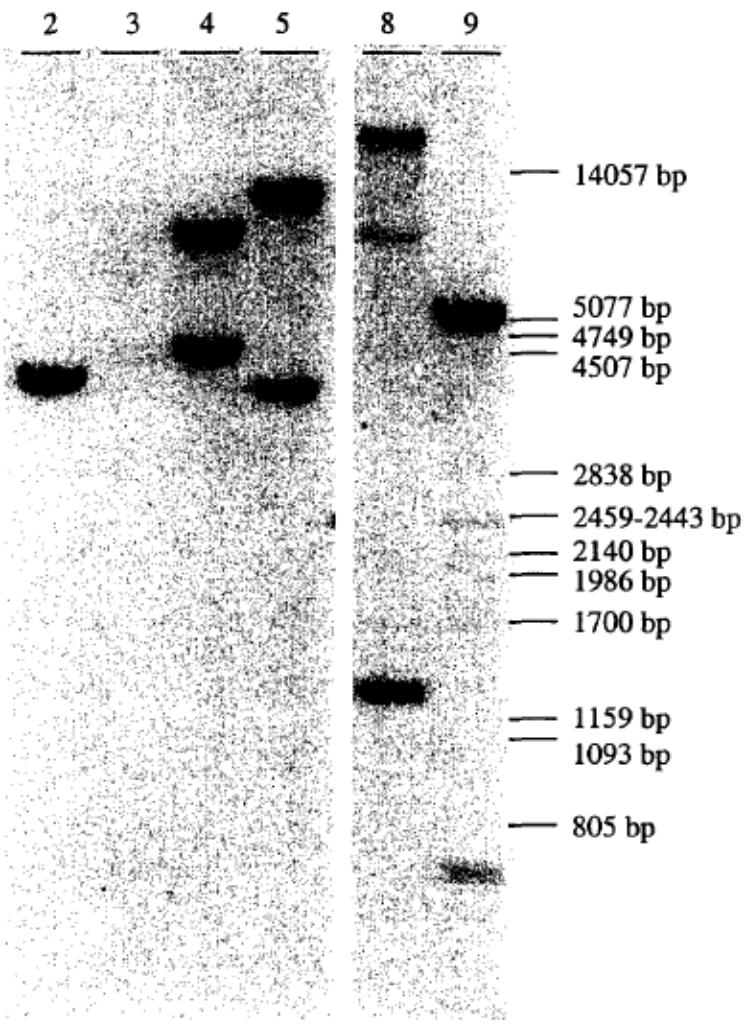


图 6-5：转基因玉米 T25 的 Southern 杂交—探针：pUC/Ac 探针

凝胶上样顺序：

- 泳道 1：噬菌体λDNA: *Pst* I 单酶切消化
- 泳道 2：野生型玉米 B73- *Nco* I 消化+1 个拷贝的 pUC/Ac – *Hind* III 消化
- 泳道 3：野生型玉米 B73- *Nco* I 消化
- 泳道 4：转基因玉米 T25- *Nco* I 消化
- 泳道 5：转基因玉米 T25- *Eco*R V 消化
- 泳道 8：转基因玉米 T25- *Eco*R I 消化
- 泳道 9：转基因玉米 T25- *Dra* I 消化

3.3 T25 外源蛋白表达量检测

在拜耳作物科学公司（比利时Astene）温室条件下播种玉米，在2-3叶期，对玉米T25喷施除草剂草铵膦（0.5% Liberty和150 ml/m²）。采用酶联免疫分析（ELISA）对处于两个不同生长阶段（V5-6和成熟期）的T25和未喷施除草剂的非转基因、不耐受除草剂的野生型玉米样品的叶片、茎和根的样品进行评价。

玉米组织蛋白的提取

从采集的每个组织材料中随机选取 5 个独立样本，在液氮中将每种组织磨碎。

用优化的提取缓冲液（标准提取缓冲液+ PIC 和 DTT）提取总的可提取蛋白。优化的提取缓冲液含有 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 5% 甘油, 1 mM 盐酸苯甲脒, 5 mM ϵ -氨基-n-己酸, 1 μ g/mL 抗蛋白酶, 1 μ g/mL 亮抑蛋白肽酶, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7.5。

确定总的可提取蛋白含量

将提取缓冲液加到 5 份不同的已预冷的磨碎组织样品中，在 4°C 的条件下，以 250 rpm 的速度摇荡试管 30 min 后，再用 12000 g 的离心力离心 20 min。为了确定 PAT/pat 蛋白的 ELISA 检测限，在 V5-6 生长期，收集每种非转基因玉米组织的样本，制备 5 份蛋白质提取物。将上清液分成两份分别收集在深孔管中。

提取蛋白质后，用 Bradford 蛋白质定量方法测定总的可提取蛋白（TEP）的含量，用牛血清白蛋白作为标准蛋白质，测定 595 nm 波长处的光密度。

ELISA 分析结果

在所有生长阶段和被分析的组织中，所有转基因玉米样品中都能检测到 PAT/pat 蛋白。在玉米的不同生长阶段，转基因玉米叶片和茎中的 PAT/pat 蛋白含量不断增多。但转基因玉米根中的平均 PAT/pat 蛋白含量在 V5-V6 生长期和成熟期维持不变。在 V5-V6 生长期，转基因玉米叶片中的 PAT/pat 蛋白含量高于转基因玉米根和茎中的蛋白含量，后面二者的 PAT/pat 蛋白含量相当。在玉米成熟期，转基因玉米叶片中的 PAT/pat 蛋白含量高于转基因玉米根和茎中的蛋白含量，后面二者的 PAT/pat 蛋白含量相当（图 6-6）。

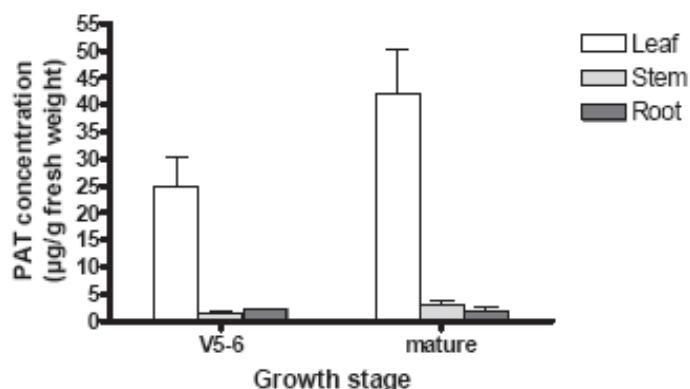


图 6-6：在 T25 玉米的两个生长阶段不同组织中的 PAT/pat 蛋白含量

转基因玉米组织中总的可提取蛋白（TEP）含量，即从细胞中提取的水溶性蛋白含量的研究结果表明：成熟转基因玉米中测得的 TEP 含量比幼嫩玉米叶片和茎中的低，根中的 TEP 含量在 V5-6 和成熟期基本维持不变。

PAT/pat 蛋白以占 TEP（可提取总蛋白）百分比表示。在所测定的生长阶段中，玉米叶片和茎中，PAT/pat 蛋白含量不断下降，根中的 PAT/pat 蛋白含量（占 TEP 百分比）基本维持不变。叶片中 PAT/pat 蛋白含量范围是 3.33-1.58%，茎中是 0.52-0.277%，根中是 0.672-0.56%。

3.4 插入序列的世代稳定性 Southern 杂交分析

为评价玉米 T25 的遗传稳定性特征，提取最初转化体叶片、回交 3 次的后代

B73 × [B73 × (B73 × 转化体 T25)] 个体、HE89 非转基因再生植株、自交系 B73 的 DNA，纯化后（各 15 μg）用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 消化之后，与 *Eco*R I 消化的 35S-*pat* 嵌合基因片段一起进行琼脂糖凝胶电泳，并转移到尼龙膜上并进行固定。用 *Pst* I 酶切的 λ-DNA 作为 DNA 分子量标准，通过 Southern 杂交检测 *pat* 基因。将分离的 pUC 35S-*pat* 基因的 *Sal* I 消化片段（由 552 个碱基组成）进行放射性标记，用作探针。

结果表明：只有最初的转化体及其后代可产生与 *pat* 基因杂交的 DNA 片段。转化体 T25 中含有完整的 *pat* 嵌合基因（1.3 kb 处的片段）（图 6-7-A）。与 *Eco*R I 消化的 35S-*pat* 嵌合基因片段（5 pg DNA）的杂交信号比较后，可推测只有 1 个拷贝的 *pat* 基因被整合到了玉米基因组中。

在转化体 T25 及其后代中，用 *Bam*H I 消化的 DNA 在玉米基因组中有一个整合位点（图 6-7-B）。*Bam*H I 在 35S-*pat* 嵌合基因中有 2 处酶切位点，即乙酰基转移酶基因（*pat*）的 877 bp 处以及 35S 启动子序列的 1201 bp 处。在图 6-7-B 的底部可见 324 bp 的 *Bam*H I 消化片段。在 1.5 kb 处可见一条强的杂交条带（第 2-5 泳道）。由于 pUC/Ac 载体不再具有另一个 *Bam*H I 限制性酶切位点，因此对应的第 3 个 *Bam*H I 限制性位点应当来自于与 *pat* 基因整合位点相邻的植物基因组。由于这个原因，在不同转化体中或具有不同 *pat* 基因插入序列的转化体中这一条带的大小会不同。

在 1.5 kb 条带上的弱带（约 2.5 kb）可能是由于 *Bam*H I 限制性酶的不完全切割（部分消化）而引起的。

在转化体 T25 中只见到一条清晰的条带，这一事实与转化体 T25 只含有一个 *pat* 基因的推测相符。后代的杂交模式表明，插入到植物基因组中的插入位点是稳定的。

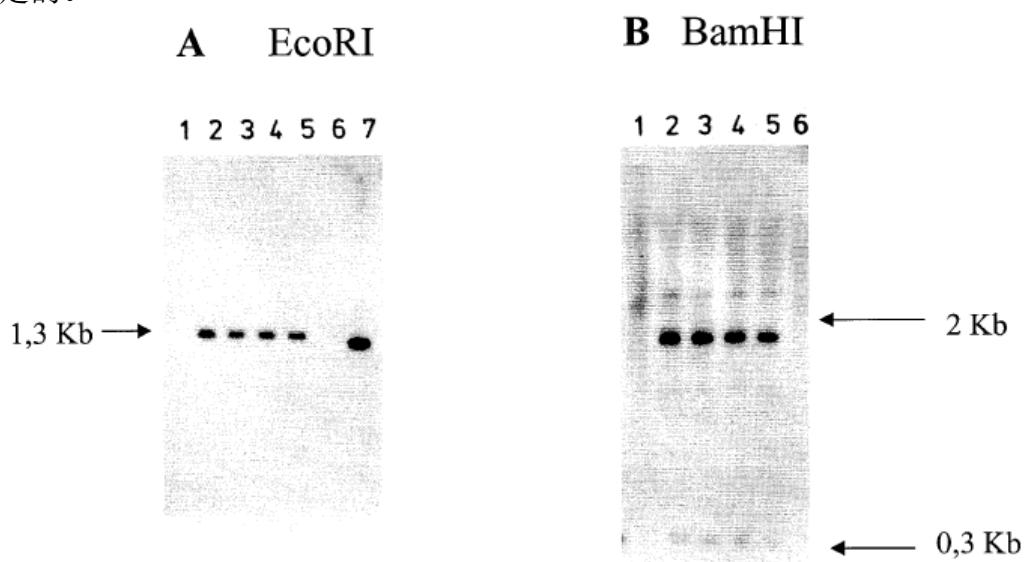


图 6-7：转基因玉米 T25 的 Southern 杂交图

凝胶上样顺序：

- 泳道 1：HE89 非转基因再生植株
- 泳道 2：最初转化体的叶片
- 泳道 3-5：回交 3 次的后代 B73 × [B73 × (B73 × 转化体 T25)] 个体
- 泳道 6：自交系 B73

4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术

商业保密信息，在公开版本已删除

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

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

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告

转基因玉米 T25 对生态环境安全性综合评价报告是根据拜耳作物科学公司在国外进行的环境安全评价数据和国内进行的安全评价检测撰写的，报告请见下页《转 *pat* 基因抗草铵膦除草剂玉米 T25 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

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

转基因玉米 T25 食用安全性综合评价报告是根据拜耳作物科学公司在国外进行的食用安全评价数据和国内进行的食用安全评价检测撰写的，报告请见下页《转 *pat* 基因抗草铵膦除草剂玉米 T25 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

转 *pat* 基因抗草铵膦除草剂玉米 T25 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告

一、摘要

拜耳作物科学公司通过聚乙二醇原生质体直接转化技术将 *pat* 基因转化到玉米品种 HE89 中，并进一步根据农艺性状筛选获得了转化株系 T25，该转基因玉米可以稳定地表达 PAT/*pat* 蛋白。转基因玉米 T25 中的 *pat* 基因是从绿棕褐链霉菌 (*Streptomyces viridomogenes*) 分离出来，但是根据植物偏好性对 DNA 序列进行了优化，优化后的 *pat* 基因编译的 PAT/*pat* 蛋白与绿棕褐链霉菌中的 PAT/*pat* 蛋白是一样的。表达 PAT/*pat* 的转基因玉米 T25 可以抗草铵膦类除草剂。

食用安全及环境安全检测的目的是申请进口用作加工原料的安全证书，试验年限为 2003 年 4 月至 2004 年 3 月。

山东省农业科学院植物保护研究所、中国农业科学院植物保护研究所和吉林省农业科学院等三个环境安全检测单位承担了转基因抗草铵膦玉米 T25 的生态风险评估工作，根据农业部相关标准于 2003 年 4 月至 2003 年 12 月实施了试验。

环境安全评估结果表明：转基因玉米 T25 及其亲本对照的出苗率、长势、株型、生育期、株高等在栽培地、荒地和拓荒地条件方面均无显著差异，在栽培地条件下产量、与杂草的竞争力和与后代种子的发芽率之间均无显著差异。转基因玉米 T25 对田间节肢动物多样性、物种生态优势度、天敌总量、捕食性天敌种群动态以及非靶标害虫玉米蚜的种群动态上，均无显著影响。转基因并未导致玉米主要病害发生严重。

受农业部委托，天津市卫生防病中心承担食品安全的检测，包括 90 天大鼠喂养试验和抗营养成分的检测，试验时间是 2003 年 10 月至 2004 年 2 月。结果表明未发现转基因玉米 T25 对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察有生物学意义的改变；抗营养因子检测结果表明植酸含量在标准值（市售玉米）的范围内。

二、背景介绍

拜耳作物科学公司培育的抗除草剂草铵膦玉米 T25 是通过聚乙二醇原生质体直接转化法将 *pat* 基因转化到玉米品种 HE89 中而获得的。该转基因玉米可以稳定地表达使玉米具有抗草铵膦能力的 PAT/*pat* 蛋白，并减少农药施用造成的农业成本增加和环境污染。自 1995 年美国首次批准 T25 玉米和由 T25 玉米加工的食品在市场上应用之后，随后加拿大（1997）、日本（1997）、欧洲（1998）、阿根廷（1998）、南非（2001）、新西兰（2002）等国也相继批准了该产品的种植和/或食用、饲用。

三、受体生物学特性

受体植物为常见的农作物玉米。玉米在分类学上属于禾本科、玉米属、玉米种。玉米是世界三大粮食作物之一，一般认为起源于 8000 对年前的墨西哥，是遍布全世界的栽培作物。现在世界各地几乎都种植玉米。饲喂动物是玉米的最大用途，只有 17%-30% 的玉米被人类直接消费，因此玉米作为人类食物和动物饲料已经有很长的安全食用史。

我国玉米分布很广，从海拔 3000 米以上的西藏到东海之滨，从黑龙江到海

南岛都有种植。但主要产区集中在东北到西南的斜长弧形带上。我国玉米产区依据分布范围、自然条件和种植制度，分六个区：1. 北方春玉米区；2. 黄淮平原春、夏播玉米区；3. 西南山地丘陵玉米区；4. 南方丘陵玉米区；5. 西北灌溉玉米区；6. 青藏高原玉米区。

目前认为玉米不会对人类、家畜和野生动植物有毒害作用，并且尚未发现玉米对人类健康有不良影响。玉米对真菌病还很敏感，这些真菌病害能使生产或贮存于不利条件下的玉米感染真菌，产生毒素。如果给动物饲喂含有毒素的玉米，就会出现中毒症状。不过玉米中的真菌毒素易于分析，这样可以防止那些污染程度高于可接受水平的玉米进口或使用。

四、基因操作

T25玉米是通过聚乙二醇（PEG）原生质体直接转化技术将3982 bp的质粒pUC/Ac转入玉米而获得的。合成型*pat*基因包含在质粒pUC/Ac中，由35S启动子和终止子组成*pat*基因盒，编码PAT/*pat*蛋白，使玉米转化植株T25具有抗除草剂草铵膦特性。*pat*基因为552 bp，编码183个氨基酸。

bla（ β -内酰胺酶）基因是载体pUC/Ac的标记基因。*bla*基因是从大肠杆菌的一个质粒pBR322上分离得到的，编码 β -内酰胺酶。这个基因在细菌中表达，被用作筛选标记。经southern杂交检测，在T25玉米中，并不是完整的*bla*基因插入到了玉米基因组中，只有*bla*基因的3'末端和5'末端插入到基因组DNA中。经Northern杂交检测，表明*bla*基因在转基因玉米T25中不表达。

五、遗传稳定性

采用酶联免疫法测定T25玉米的V5-6期和成熟期两个生长期测定PAT/*pat*蛋白的含量。叶片、茎和根中PAT/*pat*蛋白含量的上限分别是42 $\mu\text{g/g}$ 鲜重、2.85 $\mu\text{g/g}$ 鲜重和2.06 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。PAT/*pat*蛋白含量以占TEP百分比表示，叶片中是3.33-1.58%，茎中是0.52-0.277%，根中是0.672-0.56%。

对最初转化体、回交3次的3个后代个体、受体非转基因玉米HE89和自交系B73的southern杂交结果表明，只有最初的转化体及其后代可产生与*pat*基因杂交的DNA片段，只有1个拷贝的*pat*基因被整合到了玉米基因组中；同时后代的杂交模式表明，插入到植物基因组中的插入位点是稳定的。

六、环境安全评价

1、生存竞争能力：玉米是一种高度驯化的作物，需要人类的干预才有可能实现高产，它本身不能作为杂草而存活。在特定的生长环境下，玉米可以越冬并在春季萌发，然而任何自生苗都能够很容易地通过机械或化学方法去除。自生苗不可能转变成杂草，与杂草不同，没有人类的干预玉米的种子不太可能被散布。

在安大略的两个试验点进行的田间试验结果表明，T25与非转基因对照的数量、出汗量、茎倒伏、根倒伏和病害等农艺性状均无显著差异，转基因玉米T25没有显示出竞争优势。

山东省农业科学院植物保护研究所于2003年6月-12月进行的生存竞争能力检测结果表明：转基因玉米及其亲本对照在栽培地、荒地和拓荒地条件下，其出苗率、长势、株型、生育期、株高等方面均无显著差异，在栽培地条件下二者之间产量差异不显著，与杂草的竞争力方面也无显著差异，后代种子发芽率也无明

显差异，玉米在山东省济南市能够越冬，但明春出苗率较低，越冬性较差。试验过程中没有发现转基因对试验区内及周围植物种类有影响作用。

吉林省农业科学院生物技术研究中心的生存竞争能力研究表明：转基因玉米品种 T25 与其非转基因品种在荒地和杂草的生存竞争中及在栽培地株高、产量和发芽率等方面的表现均没有显著差异，表明抗除草剂基因的转入并没有增强受体原来的生存竞争能力，不会增加其杂草化趋势。

2、基因飘移：玉米的繁殖方式是有性繁殖，可异花授粉或自花授粉。玉米是风媒传粉。在自然条件下，玉米可发生种内杂交。玉米品系间的杂交率与近缘种的生物学感受能力、是否存在物理屏障、风向和风速及与污染源的距离等因素有关。在发展近交系的过程中，为了确保近交系与其它品系之间不发生杂交污染，在它们之间保持约 200 米的隔离距离。尽管栽培玉米与二倍体或三倍体的野生玉米杂交可产生可育的 F1 杂交种，但与野生玉米不发生渐渗杂交，原因在于地理区域不同，且种间存在大量形态和发育上的差异。

影响异交率的因素很多。如品种基因型，试验设计（包括田块大小，花粉受体与供体的空间排列及比率），当地地形地貌与环境条件等。即使是相同的隔离距离，受体材料不一样所测结果往往相差很大。

具有生物活性的基因和蛋白通常是食物和饲料的组成成分。在消化后，在动物和人的肠胃内可检测到短的DNA片段或者肽段。迄今为止，大量的家畜实验证明了来源于转基因植物的重组DNA或者蛋白质片段在仔鸡、小牛、猪和鹌鹑的组织，液体或者可食用的部分检测不到。

*pat*基因来源于土壤微生物绿棕褐链霉菌。链霉菌科在土壤中具有典型的生活史。细菌间的DNA交换是非常普遍的，用于转化玉米的*pat*基因并不是新的，它在环境中也存在。

山东省农业科学院植物保护研究所于2003年6月-12月在济南进行了外源基因流散的生态风险检测，结果表明：1.玉米花粉传播的距离和频率受玉米的株高、花粉量以及气候因子（风向、降雨、湿度、温度）的影响，在试验中转基因玉米在花期株高明显低于普通授粉玉米（鲁玉10号），所以传播频率较低，在8、9月份山东以西南风为主，所以东北方向漂移率大于其他方向。转基因玉米通过花粉向其他玉米风传的距离一般不超过150 m，玉米花粉的离体存活时间最大为3 d，蜜蜂传播的距离较远，所以转基因玉米试验要远离蜜蜂养殖区。根据相关文献，山东省未发现玉米田及周边杂草能够与玉米进行杂交的记载，并且没有能够与玉米杂交的其他作物或物种种植，所以存在物种间基因漂移的可能性很小。

3、对靶标生物和非靶标生物的影响：玉米转化体T25对植株的抗病能力没有进行改变。在美国安大略2个地点的田间试验中，非转基因玉米及转基因玉米T25在病害的敏感性方面没有差别。

2003年6月-10月中国农业科学院植物保护研究所在河北省廊坊市中国农业科学院试验基地开展的T25转基因作物环境安全检测—生物多样性检测结果表明：抗除草剂转基因玉米T25对田间节肢动物多样性、物种生态优势度、天敌总量、小花蝽、蜘蛛和蓟马等捕食性天敌种群动态以及非靶标害虫玉米蚜的种群动态上，同其非转基因对照相比，没有显著的著影响，说明T25对玉米田节肢动物多样性没有显著的影响。虽然在这些指标上，T25及其对照玉米与当地非转基因

对照玉米农大108有一定的差异，但这种差异是品种间造成的，与转基因本身无关。由于T25本身不具有抗虫基因，对主要鳞翅目害虫是感虫品种，亚洲玉米螟在T25及其对照品种上存活数量和为害程度基本一致，但受棉铃虫和桃蛀螟的为害程度存在显著差异，这种差异是否是因为外源基因的导入所致，还是其他环境原因的影响有待进一步验证。从对主要玉米病害的影响来看，并没有因为转基因本身而导致病害发生严重。

七、食用安全评价

1、营养学评价：拜耳作物科学公司用两年时间对15个试验地点的转基因玉米T25、亲本对照玉米和普通杂交玉米进行成分分析和营养分析。成分分析和营养分析的成分包括玉米的重要基本营养成分，即常规成分、微量元素（如维生素和矿物质）、氨基酸和脂肪酸。

研究表明：非转基因组以及两个转基因处理组（喷施草铵膦和未喷施草铵膦的T25）样品的所有基本成分、钠、所有总氨基酸、游离半胱氨酸、大多数总脂肪酸和游离脂肪酸具有实质等同性。对于一些成分，可在各试验点的每一比较中确定实质等同性。虽然在转基因玉米T25与非转基因对照玉米在一些营养组分中存在一些差异，所有谷粒的营养值都在报道的谷粒营养值范围之内。总膳食纤维、矿物质、维生素、游离氨基酸和二十烯酸以及游离亚麻酸在统计学上有显著差异，但这些统计学上的差异对T25玉米的营养价值没有影响。在每个试验地点的三个对比组中，没有发现某一化合物超过或低于20%的生物等价范围，一些物质统计学上的差异并不影响转基因玉米T25的营养价值，所有分析的化合物在目前市售玉米的营养范围内。总之，转基因玉米T25的谷粒与传统的非转基因玉米在组成成分和营养价值上是等价的，转基因途径培育的T25玉米不会对玉米的营养价值产生影响。

2004年由天津市卫生防病中心对T25和亲本对照的胰蛋白酶抑制剂和植酸进行检测，结果为：胰蛋白酶抑制剂含量T25和亲本对照分别为228 TIU/g和245 TIU/g；植酸含量T25和亲本对照分别为627 mg/100 g 和578 mg/100 g，植酸含量在标准值（市售玉米）的范围内。

2、毒理学：PAT是一种乙酰基转移酶。自然界中到处都存在乙酰基转移酶且含量丰富，它存在于微生物、植物和动物中。它们具有将乙酰基从乙酰辅酶A转移到底物中去的共同功能。乙酰基转移酶因底物的不同及他们所作用的代谢途径的不同而不同，虽然它们不是普遍认为的食物，但是乙酰基转移酶作为食物的成分而被食用。

结构、生化和功能特性的比较证明如下几方面的内容：1) 用Edman降解法证明两种蛋白质相同；2) 根据SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）电泳中的蛋白质迁移率，确定两种蛋白质的分子质量没有区别；3) Western印迹分析发现两种蛋白质的免疫活性相当；4) SDS-PAGE特异性染色表明，两种蛋白质的糖基化情况相同；5) 两种蛋白质都与相同的底物反应，证明它们有相同的生物活性。因此，在大肠杆菌中产生的PAT/pat蛋白安全性数据，可以用于证明在T25玉米中产生的PAT/pat蛋白安全性，在大肠杆菌中产生的PAT/pat蛋白能代表在T25玉米中产生的PAT/pat蛋白。

将PAT/pat蛋白与以下的大数据库Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, DAD和GenPept中的蛋白序列进行了比较，结果表明PAT/pat蛋白与数据库中毒素和

过敏蛋白序列没有同源性，只与其它生物来源的乙酰基转移酶具有同源性。

对PAT/*pat*蛋白进行体外检测来确定食用后是否易于分解。研究表明它易于被模拟的家畜和人类胃液中的酶和酸分解或变性。在含有胃蛋白酶的模拟胃液里(pH 2.0)，*pat*基因编码的PAT/*pat*蛋白在30秒内迅速降解。

除了以上信息以外，拜耳作物科学公司进行了毒性研究，提供了另外的证据证明PAT/*pat*蛋白不具有毒性。在这项研究中，按照2000 mg/kg体重的极限剂量标准，对包含10只雄鼠和10只雌鼠(C57BL/6J)的一组小鼠饲喂PAT/*pat*蛋白，历时15天。急性经口饲喂2000 mg/kg体重的PAT/*pat*蛋白后，小鼠没有出现死亡或者与摄入该蛋白有关的临床症状，体重和摄食量未受影响，在尸检过程中不存在大体变化。经口饲喂2000 mg/kg体重的PAT/*pat*蛋白后，对雄/雌C57BL/6J小鼠不会产生任何全身中毒症状。

2004年由天津市卫生防病中心对T25和亲本对照天津市卫生防病中心将拜耳作物科学公司的转基因玉米T25掺入饲料(掺入比例为50%)，饲喂大鼠90天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因玉米T25对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标(白细胞计数及分类、血红蛋白、红细胞计数、血小板计数、网织红细胞计数)、生化指标(丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、尿素氮、胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白、肌酐、碱性磷酸酶)、脏器系数(心脏、肝脏、肾脏、脾脏、睾丸)和病理组织学(心脏、肝脏、肾脏、脾脏、睾丸、卵巢、胃及十二指肠)均未见不良影响。

3、致敏性：PAT/*pat*蛋白的分子量大约22 kD，与许多作为过敏原的蛋白一样，该分子量位于标准的过敏原分子量的变化范围之内。然而PAT/*pat*蛋白不具有过敏原蛋白的其它特征。

- PAT/*pat*是热不稳定的，90°C加热60 min后蛋白发生了轻微的降解。
- PAT/*pat*蛋白在模拟的人胃肠液中能被迅速地降解和变性。在模拟的人胃液(pH 1.2)中，有胃蛋白酶存在时，纯化的PAT/*pat*蛋白在不到30秒内迅速被降解。
- 为了验证PAT/*pat*蛋白的氨基酸序列是否为致敏抗原的可能性，与所有已知的过敏原在一个大的参考数据库中进行同源性分析。分析表明合成的*pat*基因编码的PAT/*pat*蛋白没有潜在的过敏性。

4、抗生素抗性：在构建转化质粒pUC/Ac过程中，*bla*基因用作一种选择标记。*bla*基因编码TEM-1 β-内酰胺酶。β-内酰胺酶能够断开β-乳糖分解酵素抗生素环，使这些抗生素如青霉素和头孢菌素失活。*bla*基因是转座因子*E. coli* TnA3的组成部分。该基因在转化植株T25中是被切断的。这个片段不足以用来转录或者翻译成活性蛋白。

八、非预期效应

所进行的大量环境安全和食用安全评价中，结果如预期的一样，是安全的，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

拜耳作物科学利用聚乙二醇原生质体直接转化法将质粒pUC/Ac中的*pat*

基因转入到玉米基因组 DNA 中。*pat* 基因编码 PAT/*pat* 蛋白（膦丝菌素乙酰基转移酶），它是一种使草铵膦乙酰化的修饰酶。PAT/*pat* 将除草剂活性成分草铵膦的游离铵基乙酰化，阻止生物体自体中毒，使植物对高剂量的 PPT、双丙铵磷或草铵膦具有完全抗性。T25 玉米为农民提供灵活、简便和经济的玉米生产方式，因此可以给农民和玉米产业带来更多的经济效益；同时草铵膦除草剂对环境和生物健康影响较小，有利于农业的可持续发展。

目前 T25 于 1995 年在美国获得了 FDA 和 USDA 的批准，随后在加拿大（1997）、日本（1997）、欧盟（1998）、阿根廷（1998）、南非（2001）、新西兰（2002）等国家也随后获得批准。同时正在向中国、韩国等许多国家和地区申请进口批准。作为 T25 的研发商，拜耳作物科学公司会要求贸易商严格采取措施，遵守相关法律法规，包装运输要可靠，标识要清楚，运输各环节严格操作，必要时向贸易商提供技术指导和支持，以保证的贸易符合农业部颁发的安全证书的要求。

十、总结

大量的研究结果表明，T25 对人类健康和环境安全没有负面影响，与受体和常规玉米品种实质等同。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况

抗草铵膦除草剂玉米 T25 是由拜耳作物科学公司开发的。T25 及其衍生品种的问世可以为农民提供灵活、简便和经济的杂草防除方法，带来更多的经济效益。拜耳作物科学公司在中国申请 T25 玉米转基因安全证书的目的是进口用作加工原料。中国是世界上的玉米主要种植国家，也是玉米消费主要国家。

10. 田间监控方案，包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等

由于本申请的目的是进口用作加工原料，并不会在境内种植，因此，田间监控方案，监控技术和抗性治理措施并不适用于本申请。但是作为产品的开发商有义务在以后贸易商的进口过程中实施监管，因此，我公司会对贸易商在进口过程中实施的进口安全管理措施提出具体要求。

11. 审查所需的其它相关资料

技术报告：商业保密资料

国内检测报告

附件 1：转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告（生存竞争能力检测）—山东省农业科学院植物保护研究所

附件 2：转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告（外源基因流散的生态风险检测）—山东省农业科学院植物保护研究所

附件 3：转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告（生物多样性检测）—中国农业科学院植物保护研究所

附件 4：转基因玉米品种 T25 环境安全检测报告（生存竞争能力检测）—吉林省农业科学院生物技术研究中心

附件 5：转基因玉米 T25 大鼠 90 天喂养试验报告—天津市卫生防病中心

附件 6：转基因玉米 T25 抗营养因子检测—天津市卫生防病中心

拜耳作物科学公司研究报告

附件 7：转基因玉米 T25 中 P35S 启动子拷贝数检测

附件 8：玉米转化事件 T25 的基因组特征

附件 9：耐草铵膦转基因玉米 T25 与常规玉米栽培品种的农艺性状比较

附件 10：在抗草铵膦玉米 T25 的整个生命周期中叶片、茎和根中的 PAT/pat 蛋白含量

附件 11：大肠杆菌表达的 PAT/pat 蛋白与玉米 T25 表达的 PAT/pat 蛋白结构和功

能的实质等同分析

附件 12: PAT/*pat* 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索

附件 13: PAT/*pat* 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 14: PAT/*pat* 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 15: *pat* 基因的产物 PAT/*pat* 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: *pat* 基因的产物 PAT/*pat* 蛋白的热稳定性试验

附件 17: 耐除草剂草铵膦的玉米转化事件 T25 的营养成分

12. 转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件

12.1 美国食品与药品管理局 (FDA) 批准文件

12.2 美国农业部动植物卫生检疫局 (USDA) 批准文件

12.3 加拿大卫生部批准文件

12.4 加拿大农业部批准文件

美国食品与药物管理局 (FDA)
食品安全与应用营养中心
上市前审批办公室*
1995 年 12 月 14 日

* 上市前审批办公室于 2001 年 6 月 18 日变更为食品添加剂安全办公室。

**生物技术咨询代理处复函
BNF No. 000029**

Sally Van Wert 博士
法规事务经理—生物技术部
AgrEvo (美国) 公司
Little Falls Centre One
2711 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

尊敬的 Van Wert 博士：

这是 AgrEvo 就其遗传改良玉米转化事件 T14 和 T25 而向食品和药物管理局 (FDA) (兽药中心和食品安全与应用营养中心) 咨询的回复。根据 AgrEvo 公司提交的资料, 转基因玉米品系 T14 和 T25 表达一个修饰的合成的 *pat* 基因, 此 *pat* 基因与绿棕褐链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 中分离的 *pat* 相似。已报道编码膦丝菌素乙酰基转移酶蛋白的 *pat* 基因具有耐除草剂草铵膦的特性。

根据 FDA 的要求, AgrEvo 于 1994 年 8 月对将提交的转基因玉米 T14 和 T25 的安全性和营养评价进行了讨论。作为结束这些产品公示的部分程序, AgrEvo 于 1995 年 8 月 29 日提交了一份关于 T14 和 T25 安全性和营养评价的简介, 并于 1995 年 10 月 28 日提交了修正版简介。

这种交流通知 FDA 关于 AgrEvo 公司为确保这些产品按照 FDA 权限范围的法律法规要求所采取的步骤。根据 AgrEvo 公司进行的安全性和营养评价, 我们认为 AgrEvo 公司已经得出结论认为, 来源于玉米新品种的玉米籽粒、饲料和青贮饲料在成分、安全性或其他所有相关参数上与当前市场上的玉米籽粒、饲料和青贮饲料没有实质上的不同, 因此认为遗传改良玉米不需要 FDA 再进行其他上市前审批和批准。与本通知有关的全部材料均已被放置在编号为 BNF0029 的文件中, 保存在上市前审批办公室。

根据 AgrEvo 提供的资料, 目前我们已经没有关于 T14 和 T25 转基因玉米的籽粒、饲料和青贮饲料的其他问题。然而, 如您所知, AgrEvo 公司仍有责任确保此产品在市场上是安全、卫生和遵守所有适用的法律法规要求。

您诚挚的
/s/
Alan M. Rulis 博士
主任
上市前审批办公室
食品安全和应用营养中心



CFSAN/Office of Premarket Approval

December 14, 1995

(Effective June 18, 2001, Office of Premarket Approval is now Office of Food Additive Safety. See [updated contact information](#).)

Biotechnology Consultation Agency Response Letter BNF No. 000029

Dr. Sally Van Wert, Ph.D.
Manager, Regulatory Affairs-Biotechnology
AgrEvo USA Company
Little Falls Center One
2711 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

Dear Dr. Van Wert:

This is in regard to AgrEvo'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 events T14 and T25. According to AgrEvo, transformation events T14 and T25 are modified to express a synthetic version of the *pat* gene, similar to the *pat* gene isolated from *Streptomyces viridochromogenes*. The *pat* gene encodes the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein, which reportedly confers tolerance to the herbicide glufosinate ammonium.

In August 1994, AgrEvo met with FDA to discuss their proposed safety and nutritional assessment of corn containing transformation events T14 and T25. As part of bringing AgrEvo's consultation regarding these products to closure, AgrEvo submitted a summary assessment of corn containing transformation events T14 and T25 on August 29, 1995, and an amendment dated October 28, 1995.

These communications informed FDA of the steps taken by AgrEvo 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 AgrEvo has concluded that corn grain (kernels), fodder, and silage derived from the new varieties, 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 BNF0029. This file will be

maintained in the Office of Premarket Approval.

Based on the information AgrEvo has presented, we have no further questions concerning grain, fodder, and silage from events T14 and T25 corn at this time. However, as you are aware, it is AgrEvo'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 yours,
/s/
Alan M. Rulis, Ph.D.
Director
Office of Premarket Approval
Center for Food Safety
and Applied Nutrition

[Biotechnology](#) | [Products: Completed Consultations](#)

[CFSAN Home](#) | [CFSAN Search/Subject Index](#) | [CFSAN Disclaimers & Privacy Policy](#) | [CFSAN Accessibility/Help](#)
[FDA Home Page](#) | [Search FDA Site](#) | [FDA A-Z Index](#) | [Contact FDA](#)

FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition
Hypertext updated by [jmfl/pmg/rxm](#) March 24, 2004

公告

联邦登记

Vol. 60, No.134

1995 年 7 月 13 日, 星期四

美国农业部

动植物卫生检疫局

[Docket No. 95-011-2]

转基因玉米非监管状态的决定

机构: 动植物卫生检疫局, USDA

目的: 公告

摘要: 我们在此告知公众关于 AgrEvo (美国) 公司研发的抗草铵膦转基因玉米 T14 和 T25 的审查决定: T14 和 T25 不再受引入特定遗传改良生物的管理法规监管。该决定依据以下几方面: 对 AgrEvo (美国) 公司提交的数据和解除监管状态的申请的评价; 对已有科学数据进行的分析和收到的针对我们此前公布的 AgrEvo (美国) 非监管状态请求、相关环境评价和未发现重大影响的公众意见。本公告还公布了我们的书面决定、环境评价以及未发现重大影响的文件。

生效日期: 1995 年 6 月 22 日

地址: 本公告提及的环境评价和未发现重大影响的决定文件、申请书和我们收到的公众意见可以在我们的阅览室进行查阅, 阅览室地址是: 华盛顿西南独立大街 14 街南楼 1141 室, 阅览室开放时间周一至周五, 上午 8:00 至下午 4:30, 节假日除外。请提前致电 (202) 690-2817。

联系方式: 欲知更多信息请联系 David Heron 博士, 生物技术员, 生物技术认证员, BBEP, APHIS, 4700 River Road Unit 147, Riverdale, MD20737-1237; (301) 734-7612。如果需要本公告中的参考文件, 请联系 Kay Peterson 女士, 电话 (301) 734-7612。

补充信息:

背景

1994 年 12 月 23 日, 动植物卫生检疫局 (APHIS) 收到特拉华州威尔明顿的 AgrEvo 美国公司 (AgrEvo) 提交的申请 (APHIS 第 94-357-01p 号申请), 后者请求 APHIS 作出决定: 通过基因工程转化能够耐受除草剂草铵膦、被命名为转基因抗草铵膦玉米 (GRC) 的玉米 T14 和 T25 (GRC 玉米 T14 和 T25), 不存在植物有害生物风险, 因此, 不受 APHIS 在 7 CFR 第 340 条中的规定管制。

1995 年 2 月 27 日, APHIS 在《联邦公报》(60 FR 10537-10538, 95-011-1 号备忘录) 上发布通告, 声明 AgrEvo 的申请已收到, 可进行公众评审。该通告还探讨了 APHIS、环保署和食品药品管理局在管制所述玉米及用所述玉米制造的食品中所承担的职责。在通告中, APHIS 请求公众就所述玉米是否存在植物有害生物风险提出书面意见。这些意见应在 1995 年 4 月 28 日 (含) 之前提交给 APHIS。

APHIS 共收到 9 条针对 AgrEvo 申请的意见。这些意见来自于协会、高校、

种子企业和美国农业部。所有意见提供者均支持 AgrEvo 请求放开对所述玉米的管制的申请。

分析

GRC 玉米 T14 和 T25 含有一个可编码膦丝菌素-N-乙酰基转移酶 (PAT) 的基因。该 PAT 酶可促使 L-膦丝菌素 (草铵膦中的活性成分) 转化成失活形式, 从而使玉米能够耐受草铵膦类除草剂。GRC 玉米 T14 和 T25 中的 *pat* 基因是从绿棕褐链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 中分离出的相应基因的合成产物。*pat* 基因的表达由从植物病原体花椰菜花叶病毒中获得的 35S 启动子和 35S 终止子控制。所述玉米一直被视为受 APHIS 在 7 CFR 第 340 条中的规定管制的原因是, 它含有从植物病原体中获得的某些基因序列。然而, 评估通过 1992 年以来在 APHIS 许可或通知下对所述玉米开展的田间实验获得的田间数据报告得知, 该玉米被释放到环境中, 没有对植物、非靶标生物或环境造成有害影响。

决定

根据对 AgrEvo 提交的数据的分析以及对其他科学数据、公众提交的意见和所述玉米田间实验的审查, APHIS 认为 GRC 玉米 T14 和 T25: (1) 不具有植物病原性; (2) 不会比通过传统育种技术培育出的玉米更有可能变成杂草; (3) 不可能增加能与它们杂交的任何其他栽培或野生物种的杂草性; (4) 不会危害蜜蜂等对农业有益的其他生物; (5) 不会对加工农产品造成损害。APHIS 还得出结论: 没有理由认为, 通过 GRC 玉米 T14 和 T25 获得的后代玉米, 会具有新的植物有害生物特性, 即实质上不同于所观察到的已经过田间测试的 GRC 玉米 T14 和 T25 的特性、或者所观察到的采用传统育种技术获得的玉米的特性。

该决定的结果是, 名为 GRC 玉米 T14 和 T25 的玉米不再受 APHIS 在 7 CFR 第 340 条中规定管制。因此, 与受这些规定管制的物品有关的许可和通告要求, 不再适用于 GRC 玉米 T14 和 T25 及它们后代的田间测试、进口或州际流动。然而, 进口所述玉米或能够繁殖的种子, 仍然要服从 APHIS 在 7 CFR 第 319 条中的外国检疫纪要中的限制。

国家环境政策法

环境评估 (EA) 报告已编制, 目的是调查与该决定有关的潜在环境影响。EA 报告是根据以下法规编制的: (1) 1969 年的国家环境政策法 (NEPA) (42 U.S.C. 4321 et seq.); (2) 欧盟理事会有关实施 NEPA 的程序条款的环境质量规定 (40 CFR 第 1500-1508 条); (3) 美国农业部的 NEPA 实施规定 (7 CFR 第 1b 条); (4) APHIS 的 NEPA 实施规定 (7 CFR 第 372 条)。根据该环境评估, 关于 GRC 玉米 T14 和 T25 及它们的后代不再受 7 CFR 第 340 条中的规定管制的决定, APHIS 评估出的结果是无显著影响 (FONSI)。如有需要, EA 及 FONSI 的副本可通过在“如欲了解更多信息, 请联系”部分所列的相应方式获取。

1995 年 7 月 6 日在华盛顿特区完成。

Terry L. Medley

动植物卫生检疫局代理主管

Notices

Federal Register

Vol. 60, No. 134

Thursday, July 13, 1995

This section of the **FEDERAL REGISTER** contains documents other than rules or proposed rules that are applicable to the public. Notices of hearings and investigations, committee meetings, agency decisions and rulings, delegations of authority, filing of petitions and applications and agency statements of organization and functions are examples of documents appearing in this section.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE

Animal and Plant Health Inspection Service

[Docket No. 95-011-2]

Availability of Determination of Nonregulated Status for Genetically Engineered Corn

AGENCY: Animal and Plant Health Inspection Service, USDA.

ACTION: Notice.

SUMMARY: We are advising the public of our determination that corn developed by AgriEvo USA Company designated as Glufosinate Resistant Corn Transformation Events T14 and T25 that has been genetically engineered for tolerance to the herbicide glufosinate is no longer considered a regulated article under our regulations governing the introduction of certain genetically engineered organisms. Our determination is based on our evaluation of data submitted by AgriEvo USA Company in its petition for a determination of nonregulated status, an analysis of other scientific data, and our review of comments received from the public in response to a previous notice announcing our receipt of the AgriEvo USA Company petition. This notice also announces the availability of our written determination document and its associated environmental assessment and finding of no significant impact.

EFFECTIVE DATE: June 22, 1995.

ADDRESSES: The determination, an environmental assessment and finding of no significant impact, the petition, and all written comments received regarding the petition may be inspected at USDA, room 1141, South Building, 14th Street and Independence Avenue SW., Washington, DC, between 8 a.m. and 4:30 p.m., Monday through Friday, except holidays. Persons wishing to inspect those documents are asked to

call in advance of visiting at (202) 690-2817.

FOR FURTHER INFORMATION CONTACT: Dr. David Heron, Biotechnologist, Biotechnology Permits, BBEP, APHIS, 4700 River Road Unit 147, Riverdale, MD 20737-1237; (301) 734-7612. To obtain a copy of the determination or the environmental assessment and finding of no significant impact, contact Ms. Kay Peterson at (301) 734-7612.

SUPPLEMENTARY INFORMATION:

Background

On December 23, 1994, the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) received a petition (APHIS Petition No. 94-357-01p) from AgriEvo USA Company (AgriEvo) of Wilmington, DE, seeking a determination that corn designated as Glufosinate Resistant Corn (GRC) Transformation Events T14 and T25 (GRC Events T14 and T25) that has been genetically engineered for tolerance to the herbicide glufosinate does not present a plant pest risk and, therefore, is not a regulated article under APHIS' regulations in 7 CFR part 340.

On February 27, 1995, APHIS published a notice in the **Federal Register** (60 FR 10537-10538, Docket No. 95-011-1) announcing that the AgriEvo petition had been received and was available for public review. The notice also discussed the role of APHIS, the Environmental Protection Agency, and the Food and Drug Administration in regulating the subject corn and food products derived from it. In the notice, APHIS solicited written comments from the public as to whether the subject corn posed a plant pest risk. The comments were to have been received by APHIS on or before April 28, 1995.

APHIS received nine comments on the AgriEvo petition. Comments were received from associations, universities, seed companies, and State department of agriculture. All the commenters supported the AgriEvo petition for nonregulated status for the subject corn.

Analysis

GRC Events T14 and T25 contain a gene that encodes the enzyme phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT). The PAT enzyme catalyzes the conversion of L-phosphinothricin, the active ingredient in glufosinate-ammonium, to an inactive form, thereby conferring resistance to herbicides in

the phosphinothricin class. The *pat* gene in GRC Events T14 and T25 is a synthetic version of the gene isolated from the bacterium *Streptomyces viridochromogenes*. Expression of the *pat* gene is regulated by the 35S promoter and the 35S terminator derived from the plant pathogen cauliflower mosaic virus. The subject corn has been considered a regulated article under APHIS' regulations in 7 CFR part 340 because it contains certain gene sequences derived from a plant pathogen. However, evaluation of field data reports from field tests of the subject corn conducted under APHIS permits or notifications since 1992 indicate that there were no deleterious effects on plants, nontarget organisms, or the environment as a result of the subject corn plants' release into the environment.

Determination

Based on its analysis of the data submitted by AgriEvo and a review of other scientific data, comments received from the public, and field tests of the subject corn, APHIS has determined that GRC Events T14 and T25: (1) Exhibit no plant pathogenic properties; (2) are no more likely to become weeds than other corn developed by traditional breeding techniques; (3) are unlikely to increase the weediness potential for any other cultivated or wild species with which they can interbreed; (4) will not harm other organisms, such as bees, that are beneficial to agriculture; and (5) should not cause damage to processed agricultural commodities. APHIS has also concluded that there is no reason to believe that new progeny corn varieties derived from GRC Events T14 and T25 will exhibit new plant pest properties, i.e., properties substantially different from any observed for the GRC Events T14 and T25 already field tested or those observed for corn in traditional breeding programs.

The effect of this determination is that corn designated as GRC Events T14 and T25 is no longer considered a regulated article under APHIS' regulations in 7 CFR part 340. Therefore, the permit and notification requirements pertaining to regulated articles under those regulations no longer apply to the field testing, importation; or interstate movement of GRC Events T14 and T25 or their progeny. However, the importation of the subject corn or seeds

capable of propagation is still subject to the restrictions found in APHIS' foreign quarantine notices in 7 CFR part 319.

National Environmental Policy Act

An environmental assessment (EA) has been prepared to examine the potential environmental impacts associated with this determination. The EA was prepared in accordance with: (1) The National Environmental Policy Act of 1969 (NEPA) (42 U.S.C. 4321 *et seq.*), (2) Regulations of the Council on Environmental Quality for Implementing the Procedural Provisions of NEPA (40 CFR parts 1500–1508), (3) USDA Regulations implementing NEPA (7 CFR part 1b), and (4) APHIS' NEPA Implementing Procedures (7 CFR part 372). Based on that EA, APHIS has reached a finding of no significant impact (FONSI) with regard to its determination that GRC Events T14 and T25 and lines developed from them are no longer regulated articles under its regulations in 7 CFR part 340. Copies of the EA and the FONSI are available upon request from the individual listed under **FOR FURTHER INFORMATION CONTACT**.

Done in Washington, DC, this 6th day of July 1995.

Terry L. Medley,
Acting Administrator, Animal and Plant Health Inspection Service.

[FR Doc. 95-17078 Filed 7-13-95; 8:45 am]
BILLING CODE 3410-34-P

加拿大卫生部
健康保护分部

Denise Dewar 小姐

法规事务协调员
AgrEvo 加拿大公司
#213-1600 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
K1B 5N4

尊敬的 Dewar 小姐：

本函与抗草铵膦玉米 (*Zea mays*) 转化事件 T14 和 T25 作为新型食品的申请有关。健康保护分部的官员审阅了 AgrEvo 加拿大公司提供的在加拿大销售供人食用的 T14 和 T25 的可行性评估。

根据提交的申请信息，转化事件 T14 和 T25 导入了来源于绿棕褐链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 的 *pat* 基因。另外，也包含用于细菌筛选的具有氨苄抗性的 *amp^r* 基因。转基因的结果是使玉米转化事件 T14 和 T25 含有下列新成分：

- (1) *pat* 基因；
- (2) *pat* 基因编码的膦丝菌素乙酰基转移酶
- (3) *amp^r* 基因，由细菌启动子调控，在 T14 和 T25 及其衍生品系中无功能。

上述转基因的结果是表达除草剂草铵膦抗性的膦丝菌素乙酰基转移酶。

根据对提交资料的评估，我们不反对在加拿大销售供人食用的 T14 和 T25 玉米品系。

应提请注意，本意见只适用于供人食用的 T14 和 T25 玉米品系的销售。AgrEvo 加拿大公司有责任保证其产品符合全部法规的要求。

请注意我们将向加拿大食品检验局 (CFIA) 的同事提供关于本部门有责任遵守品种登记、动物饲养、环境释放和标签事宜的信函的复印件。我们还将向害虫防治管理署 (PMRA) 的同事提供一份复印件。

您诚挚的

George M. Paterson博士
主任
食品/理事

抄送：A. MacKenzie 博士， CFIA
C. Franklin 博士， PMRA



Health
Canada

Santé
Canada

Health Protection
Branch

Direction générale de la
protection de la santé

C 0 1 7 4 0 1 1(2)

Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0L2

April 3, 1997

RECEIVED
AGRICULTURE DIV.

APR 09 1997

AgroEvo OTTAWA

Ms. Denise Dewar
Regulatory Affairs Coordinator
AgroEvo Canada Inc.
#213 - 1600 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
K1B 5N4

Please cc: MG
RS
BF

Dear Ms. Dewar:

This will refer to the Novel Food Submission concerning transgenic corn (*Zea mays*) lines, derived from transformation events designated T14 and T25, which are tolerant to glufosinate ammonium herbicide. Officers of the Health Protection Branch have reviewed the information that AgroEvo Canada Inc. provided for assessment of the acceptability of such corn lines for sale as human food in Canada.

According to the submitted information, the procedure used in developing the subject corn transformation events T14 and T25 involved the introduction of a *pat* gene derived from *Streptomyces viridochromogenes*. In addition, the *amp^r* gene, conferring resistance to ampicillin is included for bacterial selection. As a result of this genetic modification, the corn lines derived from transformation events T14 and T25 contain the following novel constituents:

- (1) the *pat* gene;
- (2) the enzyme phosphinothrin acetyl transferase which is encoded by the *pat* gene; and,

.../2

Canada

C017401

- 2 - (2)

- (3) the *amp^r* gene, which is under the control of a bacterial promoter and therefore is non-functional in T14 and T25 derived corn plants.

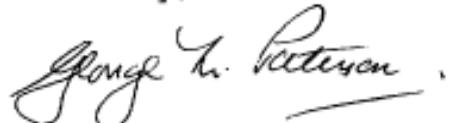
The result of this genetic modification is the expression of the phosphinothricin acetyl transferase which confers tolerance to glufosinate ammonium herbicides.

Based on our evaluation of the submitted data, we have no objection to the sale of grain from the transgenic corn lines, derived from the transformation events T14 and T25, 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 grain from corn lines derived from the transformation events T14 and T25. It is the continuing responsibility of AgrEvo Canada Inc. to ensure that its products are in compliance with all applicable statutory and regulatory requirements.

Please note that we are providing our colleagues in Canadian Food Inspection Agency (CFIA) 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,



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

c.c. Dr. A. MacKenzie, CFIA
Dr. C. Franklin, PMRA

加拿大农业与农业食品部
食品检验局和植物产品分部
59, Camelot Drive
Nepean, Ontario
K1A 0Y9
电话: (613) 952-8000
传真: (613) 992-5219

1996 年 5 月 6 日

Denise Dewar

法规事务协调员
AgrEvo 加拿大 公司
#213 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
K1B 5N4

尊敬的 Dewar 小姐:

我们已经审查了 AgrEvo (加拿大) 公司提交的关于玉米 (*Zea mays*) 转化事件 (即 T14 和 T25) 无条件田间释放的申请。这一品系导入的基因具有草铵膦抗性, 即 Liberty®除草剂的活性成分。

根据您提供给我们的信息, T14 和 T25 与常规品种实质等同。因此, 加拿大官方授权, 无需担心 T14 和 T25 的无条件释放会带来环境安全的问题。

在以下情况下, 这份授权仅限于玉米 T14 和 T25 以及其他任何衍生玉米品系: 没有进行种间杂交、使用的目的是相似的、这些植物不表达任何额外的新性状。

任何时候 AgrEvo (加拿大) 公司获知任何关于 T14 和 T25 或其衍生品系的释放造成环境风险的新资料, 要求 AgrEvo (加拿大) 公司立即给加拿大食品检验局和植物产品分部提供信息。

请注意, 决定 T14 和 T25 或其衍生品系商品化时的重要步骤是确保新性状的环境安全, 仍然需要包括加拿大健康部门的食品安全评价和加拿大农业和农业食品部门的饲用安全的确认。

我们将公开解释授权T14和T25决定原因的决议文件。如果您需要对本授权的进一步说明, 请致电Simon Barber, 分机号4390。

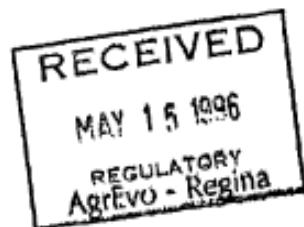
您诚挚的
Glenn Hansen
主任

抄送: 省级机构联系人; EC; HC (食品生物技术, 生物局), 种子计划官员; 品种处; 饲料处; PBO; 主任, 植物保护部门。

 Agriculture and Agri-Food Canada
Food Production and Inspection Branch

Food Inspection Directorate
Plant Products Division
59, Camelot Drive
Nepean, Ontario
K1A 0Y9
Phone (613) 952-8000
Fax (613) 992-5219

Agriculture et Agroalimentaire Canada
Direction générale de la production et de l'inspection des aliments



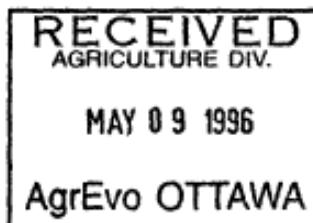
1(1)

C 0 1 7 4 0 0

3625-6-9H1

May 6, 1996

Denise Dewar
Regulatory Affairs Co-ordinator
AgEvo Canada Inc.
#213 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
K1B 5N4



cc : DMS

Dear Ms. Dewar:

We have reviewed your application for unconfined field release of the corn (*Zea mays*) transformant lines T14 and T25. These plants have been transformed with genes that confer tolerance to glufosinate ammonium, the active ingredient of Liberty® herbicide.

On the basis of the information provided to us, T14 and T25 were found to be substantially equivalent to traditional varieties. Therefore, unconfined release should not pose any concern to environmental safety, and is hereby authorized in Canada.

The present authorization relates to T14 and T25, and to all their descendants, provided no inter-specific crosses are performed, provided the intended use is similar, and provided these plants do not display any additional novel traits.

If at any time, your company becomes aware of any information regarding risk to the environment, that could result from this release, you must immediately provide such information to this office.

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 still need to be addressed, including a food safety assessment by Health Canada, and livestock feed safety by Agriculture and Agri-Food Canada.

A Decision Document explaining the rationale behind our decision will be made publicly available and we will inform provincial agencies of this decision. Should you require any clarification about this authorization, please call Simon Barber at extension 4390.

Yours sincerely,



Glenn Hansen
Director

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

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

加拿大农业与农业食品部

食品检验局

植物产品分部

59 Camelot Drive

Nepean, Ontario K1A 0Y9

电话: (613) 225-2342

传真: (613) 228-6629

1997年3月27日

Denise Dewar 小姐

法规事务协调员

AgrEvo 加拿大公司

213-1600 James Naismith Drive

Gloucester, 安大略

K1B 5N4

传真 (613) 748-5728

尊敬的 Dewar 小姐:

我们已经审查了您提交的关于耐草铵膦玉米转化事件T14和T25 (*Zea mays*) 用于家畜饲料的申请。这些植物中转入了具有草铵膦抗性的基因, 即Liberty[®]除草剂的活性成分。

目前, 在饲料法规目录IV中列出了玉米粉和一些其他副产品, 因此, 被核准可在加拿大用于家畜饲料。由于耐草铵膦玉米已经通过评价, 在安全性和营养品质方面与常规玉米品种是实质等同的, 因而认为该转化事件及其产品满足当前原料定义的要求, 特批准可在加拿大用于家畜饲料。

该授权适用于T14和T25品系。如果没有进行种间杂交、使用的目的相似, 并且这些材料没有表现任何其他新性状或改变目标基因的表达, 那么任何由T14和T25相同转化事件衍生的玉米品系和姊妹系均被释放, T14和T25后代和任何衍生的姊妹系与T14和T25实质等同, 它们作为家畜饲料是安全的。

任何时候贵公司获知饲喂耐草铵膦玉米品系对动物和人类健康或环境安全构成风险, 必须向本办公室提供这些资料。

我们将很快提供解释决定原因的决议文件。如果您需要对本授权的进一步说明, 请致电给Phil Macdonald, 分机号码5327。

您真诚的

Phil Macdonald

生物技术办公室

饲料部

抄送: Catherine Italiano

Simon Barber

Linda Morrison

Glenn Hansen



Agriculture and
Agri-Food Canada

Food Production
and Inspection Branch

Agriculture et
Agroalimentaire Canada

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

Food Inspection Directorate
Plant Products Division
59 Camelot Drive
Nepean, Ontario K1A 0Y9
Tel (613) 225-2342
Fax (613) 228-6629

RECEIVED

APR 07 1997

REGULATORY
AgEvo - Regina

RECEIVED
AGRICULTURE DIV.

APR 03 1997

AgEvo OTTAWA

cc: L. Macdonald
L. Lamont
D. Gammon
B. Tolle
B. Fine
M. Duxbury

March 27, 1997

Denise Dewar
Regulatory Affairs Co-ordinator
AgEvo Canada Inc.
213-1600 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
K1B 5N4
Fax (613) 748-5728

Dear Ms. Dewar:

We have reviewed your application for the livestock feed use of the corn (*Zea mays*) transformant lines T14 and T25. These plants have been transformed with genes that confer tolerance to glufosinate ammonium, the active ingredient of Liberty™ herbicide.

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 glufosinate ammonium-tolerant lines 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 glufosinate ammonium tolerant lines T14 and T25. Any other *Zea mays* lines and intra specific hybrids resulting from the same transformation event, and all of their descendants, may also be released, provided no inter-specific crosses are performed, provided the intended use is similar, and provided it is known following thorough characterization that these plants do not display any additional novel traits and that the resulting lines are substantially equivalent to currently grown corn, in terms of their safety as livestock feed.

2/...

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

2(2)
C 0 1 7 4 0 2

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 the glufosinate ammonium-tolerant corn lines, you must provide such information to this office.

A Decision Document, explaining the rationale behind our deliberations, will be available shortly. Should you require any clarification about this authorization, please call Phil Macdonald at extension 5327.

Yours sincerely,



Phil Macdonald
Biotechnology Officer
Feed Section

cc Catherine Italiano
Simon Barber
Linda Morrison
Glenn Hansen

13. 输出国家或地区经过科学试验证明对人类、动植物和生态环境无害的资料

技术报告（商业保密信息）

拜耳作物科学公司研究报告

附件 7: 转基因玉米 T25 中 P35S 启动子拷贝数检测

附件 8: 玉米转化事件 T25 的基因组特征

附件 9: 耐草铵膦转基因玉米 T25 与常规玉米栽培品种的农艺性状比较

附件 10: 在抗草铵膦玉米 T25 的整个生命周期中叶片、茎和根中的 PAT/pat 蛋白含量

附件 11: 大肠杆菌表达的 PAT/pat 蛋白与玉米 T25 表达的 PAT/pat 蛋白结构和功能的实质等同分析

附件 12: PAT/pat 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索

附件 13: PAT/pat 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 14: PAT/pat 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 15: pat 基因的产物 PAT/pat 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: pat 基因的产物 PAT/pat 蛋白的热稳定性试验

附件 17: 耐除草剂草铵膦的玉米转化事件 T25 的营养成分

14. 转基因生物进口过程中拟采取的安全防范措施

作为转基因玉米 T25 的研发商，拜耳作物科学公司在进口试验材料时，会严格遵守国家的相关法律法规，并按照一下的包装和标识以及运输环节的要求，如有任何问题会积极地向相关部门进行汇报和反馈。获得安全证书后向提供贸易商该产品的进口安全证书复印件的同时会要求贸易商采取下述措施来保证转基因玉米 T25 进口过程中的安全，必要时会提供技术支持：

1. 遵守相关法律法规：在转基因玉米 T25 向中国进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中提出的要求和条件。

2. 包装和标识：包装要牢固，标识要清楚。要与其它相似的非转基因产品明显区分开。

3. 运输环节：

产地国内陆运输：要求使用专门的运输工具用以装载转基因产品。对运输工具在使用前将进行充分地清洗，以避免其他转基因生物的污染。

出口终端：对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其他转基因生物的污染。在确认其出口装船之前，将

接受出口国相关部门的检验。

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

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

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

4. 监测和报告：不定期地访问进口商并对进口产品进行监视。如发现任何违反规定操作和意外事件发生，将立即向当地的农业行政主管部门和农业部报告。

5. 技术指导和支持：在必要时，拜耳作物科学公司会向贸易商提供技术指导和支持。

此外，我公司会与重要贸易商保持电话沟通，反复强调对转基因作物进口安全监管的重要性，及时从贸易商获得反馈，知晓贸易商的做法并及时给出意见，与农业部密切配合，承担监管任务。

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

玉米是人们熟知的栽培作物，几个世纪以来被用于食品和饲料。T25的遗传组分已了解得非常清楚并有详细的文献报道，它们被稳定地整合进植物基因组中。导入的蛋白已经被完整地测定，它具有非常专一的活性并且能稳定地表达。没有证据表明导入的基因产物是有毒的，也没有证据表明经T25玉米加工成的食品和饲料是有毒的。转基因玉米和玉米产品与常规玉米和玉米产品在总的组成上是相似的。在加工产品中检测出导入的蛋白只占总的粗蛋白的一小部分。来源于T25的玉米的影响与常规玉米品种的影响是相似的。

根据以上评估可以推断：经T25玉米加工成的食品和饲料产品与现今商品化的常规玉米实质上是等同的。因为没有证据表明食品或饲料在使用或组成上的明显改变与引入T25玉米相关，因此，同意申请农业转基因生物安全证书（进口）。

拜耳作物科学公司

2004年3月30日

八、本单位审查意见

来源于转化植株 T25 的农业转基因玉米安全等级为 I 级。T25 玉米与常规玉米的唯一区别是原料商品玉米中存在由 *pat* 基因编码的蛋白膦丝菌素乙酰基转移酶 (PAT/*pat*)。在 T25 玉米中表达的 PAT/*pat* 的量只占玉米总蛋白量的一小部分，不是主要的营养成分。对 T25 玉米与常规玉米进行田间比较，发现除了 T25 玉米抗除草剂草铵膦外，两种作物间没有明显区别。对 T25 玉米与常规玉米进行重要营养成分的比较，也发现两者实际上是等同的，不必担心它对营养和人类健康会有不利影响。因此，同意申请农业转基因生物安全证书（进口）。

拜耳作物科学公司

2004 年 3 月 30 日