

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油菜 T45
安全证书（进口）申请

拜耳作物科学公司

填报日期：2004 年 3 月 30 日

中华人民共和国农业部制

项目编号：

项目类别：

农业转基因生物安全评价 申 报 书

项目名称：转 *pat* 基因抗除草剂草铵膦油菜 T45 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；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	I
商业保密资料（CBI）声明	II
公司名称声明.....	III
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	8
六、相关附件资料.....	48
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见.....	85
八、本单位审查意见.....	86
九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见	87

附件目录

(技术报告为商业保密材料)

国内检测报告

- 附件 1: 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告 (生存竞争能力的检测) — 中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 2: 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告 (与油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率的检测) — 中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 3: 转基因油菜 T45 食用安全检测报告 (大鼠喂养) — 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所
- 附件 4: 转基因油菜 T45 油菜籽检验报告 (抗营养因子) — 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

拜耳作物科学公司报告

- 附件 5: 转基因油菜 T45 中插入转基因位点序列的鉴定
- 附件 6: 转基因油菜 T45 的分子特征
- 附件 7: 双元植物转化载体 pHoe/Ac(II) 的描述
- 附件 8: 油菜转化事件 T45 的转基因的表达分析
- 附件 9: 油菜转化事件 T45 的整合稳定性的分子证据
- 附件 10: 油菜 T45 转基因位点的描述
- 附件 11: 大肠杆菌和油菜 T45 中表达的 PAT/*pat* 蛋白的结构和功能的等同性分析
- 附件 12: *pat* 基因产物—膦丝菌素乙酰转移酶 (PAT) 的热稳定性研究
- 附件 13: PAT/*pat* 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索
- 附件 14: PAT/*pat* 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验
- 附件 15: 抗草铵膦油菜 T45 与其非转基因对照的营养成分分析

商业保密资料（CBI）声明

本申报书《转*pat*基因抗除草剂草铵膦油菜T45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油菜T45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CBI 的商业保密资料进行保密。

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。

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>pat</i> 基因抗除草剂草铵膦油菜 T45 安全证书（进口）申请						
	项目来源	拜耳作物科学公司						
转基因生物安全概况	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		T45 油菜					
	受体生物	中文名	油菜(甘蓝型)	学 名	<i>Brassica napus</i> L. Oleifera			
		分类学地位	十字花科芸薹属	品种（品系）名称	AC-Excel	安全等级	I	
	目的基因 1	名 称	<i>bar</i>	供体生物	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
		生物学功能	抗除草剂草铵膦					
		启动子	P35S	终止子	T35S			
	目的基因 2	名 称		供体生物				
		生物学功能						
		启动子		终止子				
	载体 1	pHoe4/Ac		供 体 生 物	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
	载体 2			供 体 生 物				
	* 标记基因 1	名 称	无	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	农杆菌转染法			基因操作类型		2	
	转基因生物品系（株系）名称		T45		转基因生物品系（株系）个数			1
转基因生物安全等级		I		转基因生物产品安全等级			I	
试验概况	中间试验情况	转基因生物名称及编号			可以不填写			
		批准文号			可以不填写			
		试验的时间、地点和规模			可以不填写			
	环境释放情况	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	转基因生物名称及编号			可以不填写				

二、项目内容摘要

抗除草剂草铵膦的转基因油菜T45（原称作HCN28，是T45转化体的衍生品种）是由绿棕褐链霉菌*Streptomyces viridomogenes* Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因的合成基因转化而成的。*pat* 基因编码PAT（膦丝菌素乙酰基转移酶），该酶是乙酰化膦丝菌素的酶，PAT酶通过乙酰化除草剂活性成分膦丝菌素上的游离铵基，防止机体自身中毒。它对高剂量的膦丝菌素、双丙铵膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性，这种基因修饰使草铵膦这种低残留、用于萌后的广谱除草剂可在转基因油菜T45的衍生品种的生产中施用，为油菜种植者提供杂草控制新选择。

转基因油菜T45是通过农杆菌转化介导的转化方法，将载体pHoe4/Ac转入油菜栽培种AC Excel而获得的。来自绿棕褐链霉菌的*pat*基因赋予植物对除草剂草铵膦的抗性。通过密码子优化的方法，合成了植物偏好的*pat*基因核苷酸序列，PAT蛋白的氨基酸的序列保持不变。

用转基因油菜T45进行Southern印迹杂交，获得的结果表明，植物基因组中转入的DNA与pHoe4/Ac(II)质粒载体中的DNA构型一致。验证的区域为pHoe4/Ac(II)质粒中的第5305位碱基至第 6647位碱基（携带*pat*基因盒的EcoR I 片段）。所获得的数据确切地表明，一个拷贝的基因盒整合到了转基因油菜T45基因组中。

从含有T45 T-DNA拷贝的植株中分离基因组DNA。应用高保真PCR系统，扩增出代表转基因油菜T45完整插入序列的两个具有重叠序列的片段。将纯化的片段进行序列测定，并将所获得的共有序列与推断的pHoe4/Ac(II)质粒序列进行比较，未发现序列差异。对转基因油菜T45中插入序列进行测定，证明存在一个拷贝的T-DNA。T45插入序列的DNA序列与相应的转化质粒DNA序列完全一致。

利用Northern印迹杂交来分析转入的基因的表达。分析表明，转基因油菜T45中的*pat*基因在测试的叶片、茎和根等组织中表达。在种子组织中（检测限：12.5 pg基因转录体），我们未测定到任何转基因表达的杂交信号。尽管在收获的成熟种子中未检测到杂交信号，但是由于在收获的种子中可检测到PAT蛋白约200 ng/g，因此预计在发育的种子中检测得到RNA。

通过Southern印迹杂交分析，我们证明了，由于限制性酶对整合的T-DNA以及相邻的植物DNA的切割而产生的转基因油菜T45的上游整合片段和下游整合片段，在测试的3个世代中是相同的。这些结果表明，转基因油菜T45在多个世代中，在基因组水平上保持稳定。

利用计算机模拟方法，评价来源于*pat*基因的PAT蛋白与公共蛋白质数据库中的已知毒素在氨基酸序列上存在的潜在相似性。与预期的一样，进行的总体同源性检索结果表明，该蛋白仅与各种细菌来源的其他乙酰转移酶存在主要的相似性。PAT蛋白与已知过敏原不存在相似性。

在pH 1.2、胃蛋白酶存在时，PAT/*pat*蛋白在模拟的胃液中培养0.5 min内被极快速地降解。将PAT/*pat*蛋白在60、75和90℃条件下分别孵育10、30和60分钟，测试它的热稳定性，实验的结果用考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE进行检测。除了在90℃孵育60分钟时，除主带的量似乎有所减少之外，在所有的孵育温度（60、75和90℃）和孵育时间（10-60分钟），PAT蛋白主带没有可见的变化，与未处理的样品相近。

除草剂Liberty处理的油菜T45植株以及未用除草剂Liberty处理的油菜T45植株所获得的种子中，其不同营养物和抗营养物的含量与对应的非转基因油菜A的植株所获得的种子中的含量十分一致。

此外，受农业部的委托，指定的检测机构分别对T45的食用和环境安全性进行了检测。

2003年，由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所开展了T45油菜大鼠90天喂养试验。在该试验中，非转基因油菜受体和常规油菜作为对照。将转基因油菜T45掺入饲料（比例为5%），饲喂大鼠90天，动物活动、生长未见异常，被毛浓密光泽，转基因油菜籽T45和非转基因油菜受体和常规油菜对照比较，未发现转基因油菜对试验大鼠的体重、食物利用率，血液学指标、血生化指标、脏体比以及组织病理学观察有生物学意义的异常变化。

2003年，由农业科学院油料所对转基因油菜T45进行了环境安全的检测。结果表明，油菜T45在竞争性、杂草化能力、入侵性等方面没有显著差异，在所有试验点都没有增加种群的丰富度；T45对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著区别，这表明抗草铵膦油菜T45与捕食者或者有益的非靶标生物的互作上没有改变。

综上所述，所有转基因油菜T45的安全性评价数据均支持该油菜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

草铵膦是一种非选择性除草剂，对许多阔叶类和禾本科杂草具有有效的萌后控制。草铵膦通过抑制谷氨酰胺合成酶而导致植物体内氨的植物毒性水平累积，最终达到控制杂草的目的。谷氨酰胺合成酶催化谷氨酸和氨合成谷氨酰胺，该酶是植物体内唯一的、可以对在光呼吸、硝酸盐还原作用和氨基酸降解过程产生的氨进行解毒作用。

抗除草剂草铵膦的转基因油菜 T45（原称作 HCN28，是 T45 转化体的衍生品种）是由绿棕褐链霉菌 *Streptomyces viridomogenes* Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因的合成基因转化而成的。*pat* 基因编码 PAT（膦丝菌素乙酰基转移酶），该酶是乙酰化膦丝菌素的酶，PAT 酶通过乙酰化除草剂活性成分膦丝菌素上的游离氨基，防止机体自身中毒。它对高剂量的膦丝菌素、双丙胺膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性。

抗草铵膦转基因油菜将为油菜种植者提供一种新的杂草管理工具。草铵膦目前已经作为一种非选择性除草剂在加拿大和美国登记，可在农作物或非农作物上施用。草铵膦可进行高度生物降解，无残留活性并对人体和野生动物具有极低的毒性。

抗草铵膦油菜品种的使用使得种植者转向高效的农业生产耕作，包括减少广谱除草剂的总施用剂量，减少了用于杂草防治的耕作，同时草铵膦代表了一种独特的作用方式，为种植者提供了一种新型的交替防治杂草的选择，以减少抗性杂草的发生率。

在加拿大及美国主要种植区农民们将会种植 T45 的衍生油菜品种。在生产区收获的农产品或种子将作为原材料在国内或出口到国外进行加工。菜籽油和菜籽粕是其主要的产品，加工后可以分别用于人类食品和动物饲料。这些油菜品种是“双低”品种，由此生产的菜籽油中的芥酸含量和加工菜籽粕中硫苷含量均低，从而提高了品质。由于国际农产品贸易的进行，在不久的将来中国也会用到经 T45 原料加工得到的食品和饲料。

四、国内外研究的相关背景材料

油菜是我国食用油和饲料蛋白最重要的来源，也是全世界仅次于大豆排名第二位的油料作物。特别是上世纪六七十年代双低油菜种植面积不断增大，成为首要的食用油料作物之一。油菜属于十字花科芸薹属，起源于非常有限的地理区域内的芜菁和甘蓝在自然条件下发生的种间杂交，是目前转基因植物中研究最多的植物之一。

杂草是影响油菜产量的一个重要因素，因此使得杂草控制对于油菜生产相当重要。抗除草剂油菜的出现为农户的耕种提供了巨大的便利。种植抗除草剂转基因油菜后，可以直接在油菜生长期喷施合适的除草剂来控制杂草，因此无需耕地就可以直接播种，有利于水土保持。

目前，抗除草剂基因至少有三类：第一类能改变植物酶对除草剂的敏感性；第二类能解除除草剂对植物酶的抑制；第三类能补偿被除草剂破坏的植物酶。目前，抗除草剂转基因油菜研究主要集中在三个方面：一是抗草甘膦油菜；二是将从吸水链霉菌中分离、克隆出的抗草铵膦基因 (*bar*) 导入油菜，*bar* 基因编码膦丝菌素乙酰转移酶 (Makaroff CA *et al.*, 1989)；三是抗溴苯腈的 *Bxn* 基因 (Bonhomme S *et al.*, 1992)。

油菜的转基因方法主要有以下几种：转化法、电激法、显微注射法、基因枪法、激光微束穿刺法、PEG 法，其中采用最多的是农杆菌介导的转化法，因为其具有以下优点：不需要专门仪器；宿主范围广，包括大多数双子叶植物和少数单子叶植物；插入外源基因的片段较大，可达 50 kb 以上；转化率明显高于其他直接转化法；外源基因整合到植物基因组上的拷贝数较少，多为单拷贝；整合的外源基因变异小，后代的分离规律也遵循孟德尔遗传规律。

自 1986 年 Mathew 等首先将 *NPT-II* 基因利用农杆菌介导法转入芥菜型油菜以来，转基因油菜的研究与开发在世界范围内取得了举世瞩目的进展。中国在抗除草剂转基因油菜研究上也有了一定的进展。中国科学院微生物研究所 1997 年报道，以油菜的下胚轴和子叶为转化受体，建立了油菜的高效转化系统。在此基础上将抗除草剂溴苯腈基因 *bxn* 导入油菜，获得了抗溴苯腈转基因油菜。1998 年又报道从细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 染色体 DNA 中克隆了 *barnase* 抑制剂 *barstar* 的基因，构建了带有 TA-29 基因 5' 调控区 (-1300—+3) 与 *barstar* 基因编码区、CaMV35S 启动子与除草剂抗性基因 *bar* 两个表达框架的植物表达质粒 pBBS。以“双低”油菜“5-4”的子叶柄为外植体，通过农杆菌介导的遗传转化，获得了含有 10 mg/L 卡那霉素和 20mg/L PPT 的筛选培养基上再生的转基因植株。

从 1990 年开始，已经在加拿大对抗草铵膦油菜品系 T45 进行了田间实验，对其农艺性状、产量、性状稳定性和对草铵膦的抗性等方面进行了评估。田间实验结果证明 T45 油菜对草铵膦的具有抗性，并且 T45 的农艺性状与传统油菜相似。

1995 年加拿大首次批准以 T45 油菜品系为基础的油菜杂交系统上市，随后

也在美国获得了全部的批准，日本也批准了它们的进口。

参考文献:

Markaroff C A, Apel I J, Palmer J D. The atp 6 coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic malesterile redish [J]. Journal Biology Chemistry, 1989, 264: 706-713

Bonhomme, S., F. Budar, et al. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in Brassica cybrids [J]. Mol Gen Genet, 1992, 235(2-3): 340-348

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；

学名： *Brassica napus L. oleifera*,

常用名：油菜

1.1.2 分类学地位；

科：十字花科

属：芸薹属

种： *napus*

亚种： *olifera*

常用名：油菜

1.1.3 试验用受体植物品种（或品系）名称；

试验用受体品种名称是 AC-Excel。

1.1.4 是野生种还是栽培种；

AC-Excel 是栽培种。

1.1.5 原产地及引进时间；

在欧洲和亚洲都已经发现野生种油菜，但是准确的发源地（或者是地中海地区，或者是北欧地区）尚不清楚。公元前 2000 年到 1500 年的一些梵语著作直接描述了油菜的形态。古代亚洲和地中海地区的一些居民就有用菜籽油进行照明的记录，后来又被用作食用油。早期的记录显示油菜籽早在 3000 多年前的印度就已有种植。然后又在公元前后被引入中国和日本。

1.1.6 用途；

荷兰早在 16 世纪就有油菜商业化种植的记载。那时，菜籽油主要用作灯油，后来用作蒸汽发动机的润滑剂。

尽管菜籽油在亚洲已经被广泛的用作食用油，但只有通过育种改良油的品质，

并随着加工技术的改进，菜籽油才成为西方国家重要的食用油。

从籽粒中提取的菜籽油是良好的食用油。无芥酸的菜籽油用于制造人造奶油，并可作色拉油、起酥油和调味用油。菜籽油中油酸和亚油酸的含量较高，亚油酸是动物油中所不具有的，只有依赖植物油提供，易为人体消化吸收，并有降低人体内血清胆固醇和甘油三酯、软化血管和阻止血栓的形成，对人体脂肪代谢起着特别重要的作用。高芥酸（芥酸含量为 55-60%）的菜籽油，是重要的工业原料，在铸钢工业中作为润滑油。一般菜籽油在机械、橡胶、化工、塑料、油漆、纺织、制皂和医药等方面都有广泛用途。

榨油后的菜籽饼，其蛋白质含量高达 36-38%，营养价值与大豆饼相近，是良好的精饲料。

油菜还是谷类作物的良好前作，在农作物轮作复种中占有重要地位。油菜根系能分泌有机酸，可溶解土壤中难以溶解的磷素，提高磷的有效性。根、茎、叶、花、果壳等含有丰富的氮、磷、钾，后期阶段大量落花落叶，收获后残根和秸秆还田，能显著提高土壤肥力，并改善土壤结构。

此外，油菜花器多，花期长，具有蜜腺，是良好的蜜源植物。

1.1.7 在国内的应用情况；

在国内，油菜籽油是良好的食用油，营养价值高，含有大量脂肪酸和多种维生素，如维生素 A、维生素 B 和维生素 E 等。

菜籽油在食品工业上应用普遍，还是重要的工业原料，在冶金、机械、橡胶、化工、纺织、油漆、制肥皂、油墨、造纸、皮革、医药等方面都有重要用途。随着工业的发展，菜籽油在加工利用上也在向广度和深度发展，几乎所有工业部门都不同程度地使用脂肪酸制品。

油菜生产提供大量油脂和饼粕，有很高的经济价值。菜籽饼粕含氮 4.6%、磷 2.48%、钾 1.4%，以及其它多种营养元素，是很好的肥料。菜籽饼粕含蛋白质 35%-47%，以及各种氨基酸，还含有粗脂肪、纤维素、矿物质和多种维生素；油菜饼粕除去硫苷后，是家畜的优质饲料。油菜秸秆、角壳也可沤制成有机肥料，供作物吸收利用，对培养地力也有良好的作用。

油菜在作物轮作复种中占有重要地位。油菜地腾茬早、地力肥、土壤理化性好。油菜茬的土壤有效氮、磷养分高，是水稻、棉花、麦类及其它作物的优良前作物。由于油菜适应性强，又是新垦地、休闲地、盐碱地的一种良好的先锋作物。油菜生产过程中还有不少落花、落叶、根茬等，供给土壤大量的有机物和氮、磷、钾等营养元素。油菜的根系能分泌某些有机酸，溶解土壤中的难溶性磷素，供给作物吸收利用。

1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响；

油菜是重要的油料作物。油菜种子含油量占其干重的 35~45%，含有丰富的脂肪酸和维生素，由于食用芥酸含量高的菜籽油会加重心脏负担，诱发心血管疾病，因此菜籽油是随着上世纪七十年代低芥酸和低硫甙的双低油菜品种培育，才开始在食品和饲料中广泛应用，1985 年，菜籽油得到美国 FDA 的安全认证（GRAS）。按照国际标准，芥酸含量指标应低于 2%，硫甙含量低于 30 $\mu\text{mol/g}$ 。高芥酸菜籽油主要用做工业润滑油，主要种于欧洲。

中国是世界上栽培油菜最古老的国家之一。从中国陕西省西安半坡社会文化遗址中就发现有菜籽或白菜籽，距今约有 6000—7000 年。荷兰也早在 16 世纪就有油菜商业种植的记载。

油菜不会对植物、动物或人类产生危害，美国食品和药物管理局在 1985 年 1 月 28 日将油菜归为“普遍安全”的作物。自从菜籽油和菜籽粕加工的产品被使用以来，还没有关于引起不利影响的报道。

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；

油菜有着很长时间的的安全种植历史，且每年加拿大和美国的种植面积都有增长。在加拿大，油菜自生苗很常见，但是也很容易被多种除草剂杀死。为了满足越来越大的市场需求，油菜种植面积越来越多，但这并不会使得油菜演变成有害植物或杂草。

我国有很长的油菜种植历史。从中国陕西省西安半坡社会文化遗址中就发现有菜籽或白菜籽，距今约有 6000—7000 年。长期的油菜栽培实践证明：油菜不会演变成有害植物（如杂草等）。

1.1.10 是否有长期安全应用的记录。

油菜是重要的油料作物。油菜种子含油量占其干重的 35~45%，含有丰富的脂肪酸和维生素，由于食用芥酸含量高的菜籽油会加重心脏负担，诱发心血管疾病，因此菜籽油是随着上世纪七十年代低芥酸和低硫甙的双低油菜品种培育，才开始在食品和饲料中广泛应用，1985 年，菜籽油得到美国 FDA 的安全认证（GRAS）。按照国际标准，芥酸含量指标应低于 2%，硫甙含量低于 30 $\mu\text{mol/g}$ 。

在国内油菜籽油是良好的食用油，营养价值高，含有大量脂肪酸和多种维生素，如维生素 A、维生素 B 和维生素 E 等。

油菜有着很长时间的的安全种植历史，且每年加拿大和美国的种植面积都有增长。

油菜已经有上千年的安全使用历史，迄今未发现关于引起不利影响的报道。

1.2 受体植物的生物学特性：

1.2.1 是一年生还是多年生；

油菜是一年生作物。产油甘蓝型油菜是一种喜凉作物，不十分耐旱。出苗至

开花前，幼苗喜欢较凉爽的温度，开花时高温将加快发育进程，缩短开花至成熟所需的时间。在栽培作物中，芸薹属栽培种对硫的营养需求最高。

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；

20 世纪 70 年代以前，由于籽粒中含有硫苷而限制由油菜加工副产品在动物饲料中的应用，通常认为硫苷本身是无害的，但是其水解产物对动物具有不利影响，其适口性差，并且硫苷有抗甲状腺活性的副作用，由此导致了低硫苷和低芥酸含量的油菜品种（也称为“双低”品种）的开发。

油菜籽中是否存在色素值得注意。因为油菜籽的色素可使得菜籽油具有不好看的颜色，光照可加快油的氧化，并抑制还原反应。由于无叶绿醇的叶绿素具有光毒性，可引起光敏性皮炎，从而可能对营养产生影响。

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；

油菜已经有上千年的安全使用历史，迄今未发现关于引起不利影响的报道，因此认为油菜不含致敏原。

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；

尽管油菜有 5%~30% 的异交率，但在大田条件下，油菜胚珠受精通常是通过自花授粉的结果。油菜花粉重且粘，可通过临近植株间的物理接触及其风和昆虫从一个植株转移至另一个植株。

1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率；

据报道，油菜的异交率为 5%~30%。油菜花粉重且粘，可通过临近植株间的物理接触及其风和昆虫从一个植株转移至另一个植株。油菜田之上或之外的空气中均可检测到油菜花粉。不过随着与花粉源的距离增加，花粉密度迅速下降，风传花粉对油菜远距离的授粉不起作用或只起到微不足道的作用。

传粉昆虫（主要是蜜蜂和大黄蜂）在甘蓝型油菜的传粉中起着重要的作用。蜜蜂引起花粉迁移取决于油菜的花粉量、蜜蜂种群的大小和位置、环境条件和昆虫活动能力。在甘蓝型油菜的试验小区周围种植花期同步的同一物种的其他作物可以减少由昆虫活动引起的试验植株花粉的扩散。

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。油菜的繁殖方式是有性繁殖。据报道，油菜的异交率为5%~30%。油菜花粉重且粘，可通过临近植株间的物理接触及其风和昆虫从一个植株转移至另一个植株。油菜田之上或之外的空气中均可检测到油菜花粉。不过随着与花粉源的距离增加，花粉密度迅速下降，风传花粉对油菜远距离的授粉不起作用或只起到微不足道的作用。

1.2.7 全生育期；

春油菜的生育期从发芽到成熟为 90 天到 110 天不等。

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。

春油菜是一种喜凉作物，不十分耐旱，具有广泛的适应性，只要提供足够的水肥，在各种土壤条件下生长良好，气温和土温影响其生长发育和产量。春油菜生长和发育的最适温度刚好超过 20℃，在 12~30℃下生长最佳。

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；

油菜是我国主要油料作物之一，分布极为广泛，几乎遍及全国各地。北至黑龙江省大兴安岭地区，南迄海南岛，西起新疆维吾尔自治区克孜勒苏柯尔克孜自治州的乌恰县，东抵沿海各省，从平原到海拔 4630m 的西藏高原都有油菜栽培。由于我国幅员辽阔，各地自然条件悬殊，因而分布在全国范围内的油菜播种期和收获期也有很大差别。构成我国油菜品种和栽培制度、栽培技术的多样性、复杂性。从全国范围来说，一年四季都可以看见油菜在田野生长，自 3 月至 10 月均有油菜播种和收获。

我国冬油菜种植面积约占全国油菜面积的 90%，分布在上海、江苏、浙江、安徽、湖北、湖南、江西、福建、广东、广西、河南、山东、云南、贵州等省（市、区），以及四川雅安地区以东，陕西、甘肃、山西、河北等省南部地区，辽宁省东南角，新疆伊犁河套。此外，西藏自治区局部河谷也有种植。以长江流域及其支流、太湖、鄱阳湖、洞庭湖冲积平原以及四周的低山丘陵地区最为集中，其中安徽省种植面积最大，四川省总产量最高。

我国春油菜种植面积约占全国油菜面积的 10%，分布在西藏、青海、四川西部、甘肃六盘山、内蒙古阴山至大、小兴安岭、黑龙江北部以及新疆阿尔泰山地区等高寒山地和寒冷地带。其中以青海省较为集中，其发展速度也较快。

此外，我国还有春种夏收，夏种秋收的春夏复种油菜。春夏复种油菜在我国种植的历史不长，零星分布在冬季温度低，夏季温度较高，热量条件较好，油菜既不能越冬，也不能过夏的中温带，如青海省东部、河西走廊、陇中、河套平原、山西省西北部等山间盆地、河套平原川水地带、辽宁全省、黑龙江省南部以及新疆准噶尔和塔里木盆地四周农区。华北平原及长江中下游江北一带也有少量地区利用早春低温进行春种夏收作为填闲或补灾而栽培。

春播夏收一般于临近解冻时播种生育期短的油菜品种，套种玉米或复种水稻、谷子、糜子、早熟玉米、油用向日葵、蔬菜等作物，全国曾一度达到数百万亩以上。由于油菜生育期短，生产技术条件要求较高，且产地春旱严重，近几年随着农作物布局的调整，种植面积显著缩小，但仍保持着一定面积。

夏种秋收油菜为的是充分利用秋季光、热、水资源，增收一季；或是春、夏复种一年收两季油菜；或是在青稞、小麦后复种。

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；

春油菜是一种喜凉作物，不十分耐旱，具有广泛的适应性，只要提供足够的水肥，在各种土壤条件下生长良好，气温和土温影响其生长发育和产量。春油菜生长和发育的最适温度刚好超过 20℃，在 12~30℃下生长最佳。出苗至开花前，幼苗喜欢较凉爽的温度，开花时高温将加速发育进程，缩短开花至成熟所需时间，在栽培作物中，芸薹属栽培种对硫的营养需求最高。

鉴于对土壤的保护，建议在油菜生产中推行少耕或免耕。不过免耕技术只有与良好的系统的杂草防治计划结合才有助于油菜生长。杂草是油菜生产中重要的限制因素，油菜的十字花科近缘杂草比较难以防控，春油菜在早期生长阶段，因为生长相对于杂草来说有些缓慢，因此，不利于与杂草竞争，因此应当尽早进行杂草防治，以避免杂草竞争减少油菜产量。

虽然多种害虫会危害油菜，但是有针对性的害虫防治措施可以减少不必要的农药使用成本，减少害虫产生抗性的机会，并降低对有益昆虫的影响。

1.3.3 是否为生态环境中的组成部分；

在栽培油菜的农业区域，如中国，油菜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；

鉴于油菜长期的安全种植历史，不认为油菜是对环境和生态有危害的作物。

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。

油菜不具有任何植物的植化相克性或杀虫性，也不是具有环境蔓延性的物种。因此，与油菜能够互作的生物仅限于其将油菜作为寄主的一些微生物和一些将油

菜作为食物的食草动物。迄今未发现环境的某些特定改变可以使得油菜和某些生物的互作发生改变，也没有发现油菜对生态环境和人类健康有任何负面影响。

1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度；

正如上文所述，油菜已经安全种植了很长时间，且是生态环境的一部分，迄今未发现油菜对生态环境存在负面影响或潜在危害。

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

不适用。因为油菜属于主要农作物，在中国已种植多年。

1.4 受体植物的遗传变异：

1.4.1 遗传稳定性；

受体油菜有很长的商业化历史，是一种驯养植物，是通过两个相关联的 *Brassica* 种间杂交获得的。双低油菜作为食用油来源有很高的价值，遗传稳定性表现在种子和衍生产品的成分稳定性上，对油菜质量特征的鉴定由加拿大谷物协会每年进行检测且出具检测报告。

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；

鉴于油菜长期的安全种植和食用历史，不认为油菜是对人类健康和生态环境有危害的作物。

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；

尽管 *B. napus* 种内杂交容易发生，但和相关品种的种间杂交的成功率有很大差异，其很大程度上受杂交方向的影响。即使 *B. napus* 和邻近相关品种之间也存在杂交的可能性，但产生的杂交后代种子活力低或不育，这意味着杂交种和它们的子代将不能在人工的或自然条件下存活。

从 *B. napus* 到其他 *Brassica* 种，比如 *B. juncea* 或 *B. rapa*，基因转移的可能性非常小，其受制于是否存在靶标生物和杂交种育性降低。*B. napus* 能与 *B. rapa* 杂交（在协同培养下可形成 1.3% 杂种种子）并且能产生许多繁殖力降低的杂交种。*B. napus* 也能与 *B. juncea* 低频率的杂交（在大田协同培养下可形成 4.7% 杂交种子），但这些杂交种只能产生少量的种子和可育的后代。

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通常情况下植物基因可转移到细菌中并在细菌中表达。细菌在自然情况下可以转移到许多土壤中，但还是没有发现特定基因发生水平基因转移现象。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，进口转基因产品仅作为加工原料，在自然环境下暴露机率很小。

1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性。

就所有作物而言，收获时散落在土壤里的一些种子会在下一茬作物播种前后萌发，在很多情况下自然落粒生长的植物可能与播种作物产生竞争，引起产量下降，此种情况需要进行化学（除草剂使用）或机械控制，以除去自生苗。通常于次年在种植油菜的田间对再生植物进行监控，然后按常规的杂草管理措施将其杀死。

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，油菜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。

抗除草剂转基因油菜 T45（原称作 HCN28）是由绿棕褐链酶菌 *Streptomyces viridomogenes* Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因的合成基因转化而成的。*pat* 基因编码 PAT（膦丝菌素乙酰基转移酶），该酶是使 PPT 乙酰化的修饰酶，PAT 酶通过乙酰化除草剂活性成分 PPT 上的游离铵基，防止机体自身中毒。它对高剂量的 PPT、双丙铵膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性，这种基因修饰使草铵膦这种低残留、用于萌后的广谱除草剂可用于转基因油菜 T45 衍生品种的生产中。

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：

转基因油菜 T45 是用 pHoe4/Ac(II)质粒、通过农杆菌介导的基因转化方法而获得的。转化的 pHoe4/Ac(II)质粒携带一个嵌合的 *pat* 基因构建体，赋予植物对除草剂草铵膦的抗性。

通过测定转基因油菜 T45 中插入的转基因 DNA 的序列，将所获得的序列信息与推断出的 pHoe4/Ac(II)质粒序列比较，进而确定插入的序列。

转基因油菜 T45 的种子和野生型非转基因对照油菜 Ac Excel 的种子均种植在拜耳生物科技公司的温室里。播种 5 周之后，采收转基因油菜和非转基因对照油菜的叶片组织，之后直接将材料转移和冻存到液氮中。

从转基因和非转基因油菜样品中提取基因组 DNA。利用已开发的差异 PCR 方案（D-PCR），确定转基因和非转基因油菜样品中是否存在转基因油菜 T45。

利用高保真 PCR 系统，扩增出两个重叠片段，它们代表了转基因油菜 T45 完整的插入序列（扩增策略见图 1）。将这些片段交给 Eurogentec 公司（比利时 Seraing），用于序列测定。将获得的共有序列与推断出的 pHoe4/Ac(II)质粒序列比较。

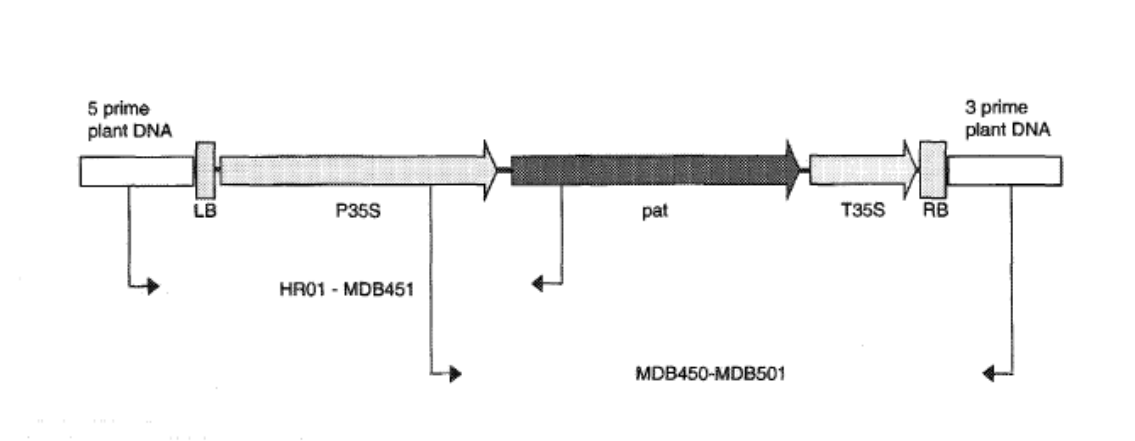
T45 插入序列与推断出的质粒 DNA 序列之间的任何差异，都重新扩增，然后测定 T45 插入序列和转化用质粒相关区域的序列，加以验证。

通过对转基因油菜 T45 中插入序列进行测序，确认存在一个拷贝的 T-DNA。转基因油菜 T45 插入序列的 DNA 序列与相应的转化质粒 DNA 序列完全一致。插入序列长度为 1364 bp（图 2），包括的遗传元件的描述见表 1。

表 1. 转基因油菜 T45 插入序列的描述

核苷酸位置	遗传元件
1→14	来自土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> Ti 质粒 pTiAch5，包含部分左边界重复序列
15→544	载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 35S 启动子
545←572	人工合成的多接头序列
573→1124	人工合成的 <i>pat</i> 基因
1125←1144	人工合成的多接头序列
1145→1349	载体 pDH51 的花椰菜花叶病毒 35S 终止子
1350←1356	人工合成的多接头序列
1357→1364	合成的 DNA，包含土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> Ti 质粒 pTiAch5 右边界的部分序列

图 1. 转基因油菜 T45 插入片段的扩增策略



片段	引物	在 pHoe4/Ac(II)中的位置	扩增片段长度（约）
BPC010-01	HRO1	5'侧翼序列引物	±800 bp
	MDB451	6006→5985	
BPC010-02	MDB450	5754→5773	±1000 bp
	MDB501	3'侧翼序列引物	

图 2. 转基因油菜 T45 插入序列（1364 bp）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

2.2.2 删除区域的大小和功能；

利用从野生型油菜中提取的 DNA 以及 T-DNA 插入位点上游和下游的侧翼 DNA 特异性引物，进行预插入位点序列测定。将测得的序列与 T45 的 5'端和 3'端侧翼序列比对。在野生型油菜的靶标位点存在一个 48 bp 的片段，但在 T-DNA 插入位点没有该片段。该 48 bp 的片段在 T-DNA 被整合到油菜基因组中时被删除，它们即为靶位点删除片段。在 T45 插入位点的 5'端插入了 9 个碱基对。这些碱基对是 3'端侧翼序列的复制品。在 T45 插入位点的 3'端，转化过程中有两个碱基对插入其中（图 3）。

比对 5'端和 3'端侧翼序列和预插入位点序列与已知序列，没有发现任何相关的同源性。

图 3. 油菜 T45 转基因位点与预插入位点的序列比对

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

2.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列；

A. 目的基因核苷酸序列（商业保密资料）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

B. 推导的氨基酸序列（183 个氨基酸）

```
1  msperrpvei rpataadmaa vcdivnhyie tstvnfrtep qtpqewiddl erlqdrypwl
61  vaevegvvag iayagpwkar naydwtvest vyvshrhqrl glgstlythl lksmeaaggfk
121 svvaviglpn dpsvrlheal gytargtlra agykhggwhd vgfwqrdfel papprpvrpv
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；

利用 Southern 杂交和 PCR 方法，证明 *pat* 基因整合到油菜基因组 DNA 中，未整合叶绿体、线粒体或以非整合形式存在。

2.2.5 插入序列的拷贝数。

为了确认插入序列的拷贝数，对转基因油菜 T45 进行了分子特征的鉴定。

油菜 T45 的种子（种子批次 F5）和非转基因对照油菜的种子均种植在拜耳生物科技公司的温室里（比利时 Deinze）。每粒种子分别种在一个花盆中。通过标准的 Liberty-dot 鉴定分析法鉴定出表达 *pat* 基因的油菜。

播种四周之后，采收转基因油菜和非转基因对照油菜的叶片组织。将采收好的组织直接转移和冻存到液氮中。采集两份不同的叶片组织样品。

提取油菜基因组 DNA，用限制性切割酶消化基因组 DNA，根据分子量分离酶切片段，然后将酶切片段转移到薄膜上。用放射性元素标记的探针检测薄膜。清洗薄膜，去除游离的探针，然后进行放射自显影。通过分析转基因油菜 T45 和转化用质粒的各种酶切片段的杂交条带，来鉴定插入序列和确定插入拷贝的数量。

结果与讨论

Southern blot 所用的探针对于转基因油菜 T45 中插入的基因序列是特异的，它们不与非转基因油菜栽培种 AC Excel 中提取的 DNA 进行杂交（图 4、5 和 6，第 4，7 和 10 泳道）。

在 Southern 印迹分析中用了 3 个探针（P35S，*pat* 和 *pat*-T35S），用各探针进行杂交时，DNA 阳性对照产生了预期大小的片段（图 4、5 和 6），说明杂交是在探针可与靶序列杂交的条件下进行的。未经酶切消化的 T45 DNA 与所用的各探针杂交时，观察到一条高分子量的片段，说明转基因序列整合到了油菜基因

组 DNA 中（图 4、5 和 6，第 11 泳道）。

结论

用转基因油菜 T45 进行 Southern 印迹杂交，获得的结果表明，植物基因组中转移的 DNA 与 pHoe4/Ac(II)质粒载体中的 DNA 构型一致。验证的区域为 pHoe4/Ac(II)质粒中的第 5305 位碱基至第 6647 位碱基（携带 *pat* 基因盒的 *EcoR* I 片段）。所获得的数据确切地表明，一个拷贝的基因盒被整合到了转基因油菜 T45 中。

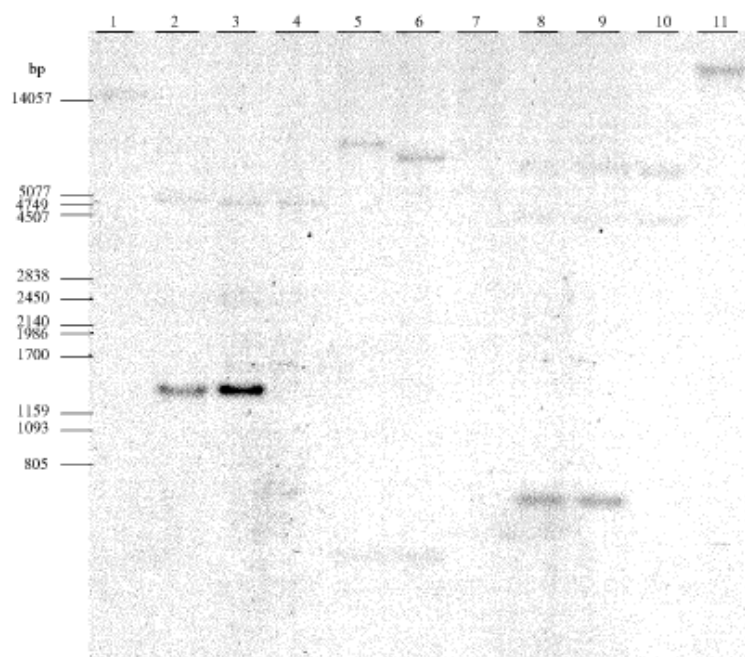


图 4. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-P35S 探针 (blot T45/01)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切
- 泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* I 酶切
- 泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切
- 泳道 5: T45, *BspE* I 酶切
- 泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *BspE* I 酶切
- 泳道 7: AC Excel 野生型, *BspE* I 酶切
- 泳道 8: T45, *Nco* I/*Hpa* I 酶切
- 泳道 9: AC Excel 野生型+ 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Nco* I/*Hpa* I 酶切
- 泳道 10: AC Excel 野生型, *Nco* I/*Hpa* I 酶切
- 泳道 11: T45, 未酶切

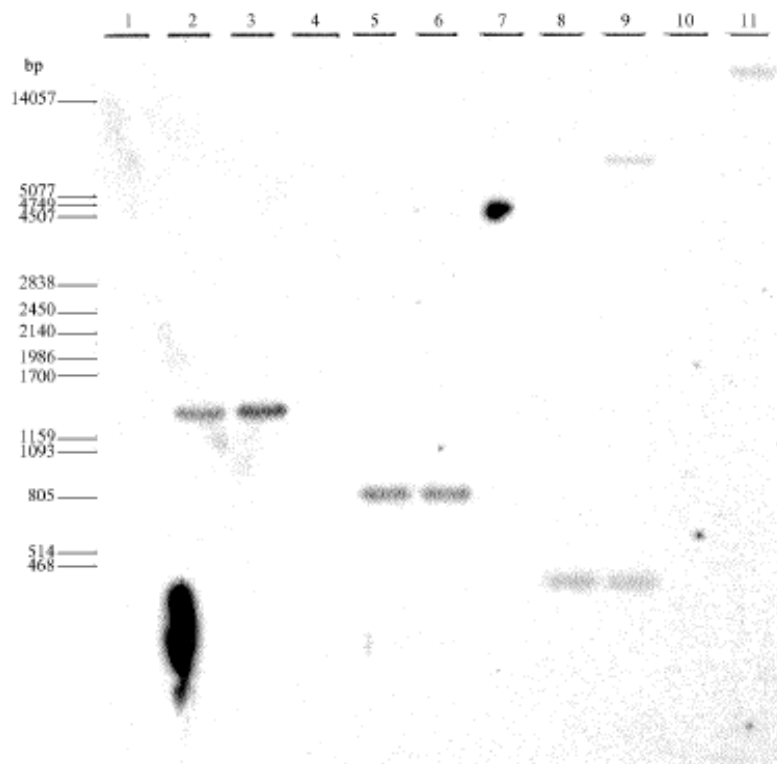


图 5. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-*pat* 探针 (blot T45/02)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切
- 泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac (II), *EcoR* I 酶切
- 泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切
- 泳道 5: T45, *Kpn* I 酶切
- 泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Kpn* I 酶切
- 泳道 7: AC Excel 野生型, *Kpn* I 酶切
- 泳道 8: T45, *Pvu* II 酶切
- 泳道 9: AC Excel 野生型+ 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Pvu*II 酶切
- 泳道 10: AC Excel 野生型, *Pvu* II 酶切
- 泳道 11: T45, 未酶切

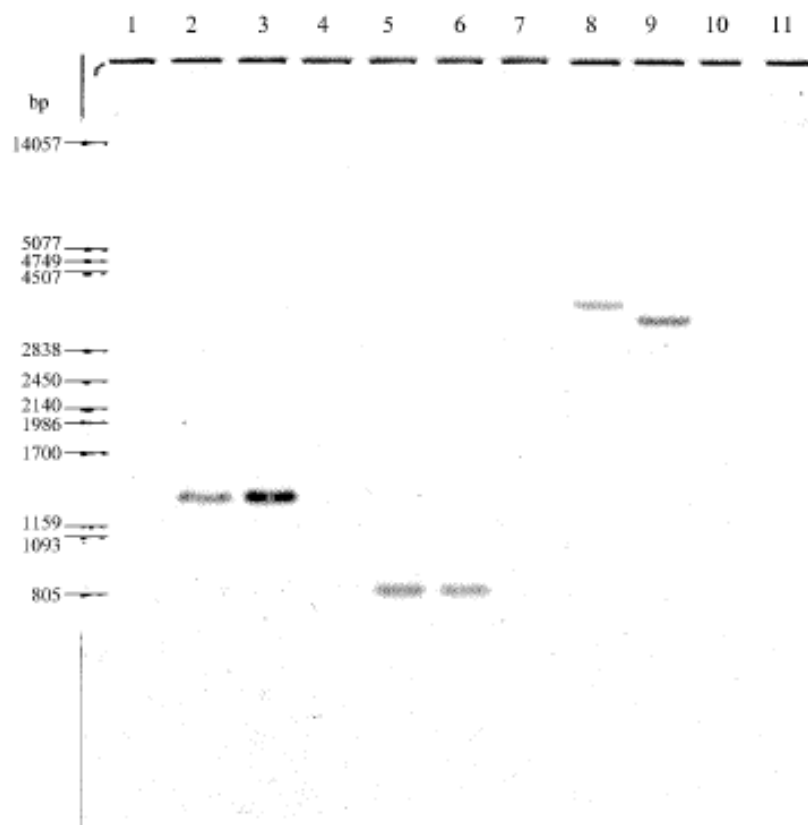


图 6. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-*pat*-T35S 探针 (blot T45/03)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切
- 泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* I 酶切
- 泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切
- 泳道 5: T45, *Kpn* I 酶切
- 泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Kpn* I 酶切
- 泳道 7: AC Excel 野生型, *Kpn* I 酶切
- 泳道 8: T45, *EcoR* V 酶切
- 泳道 9: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* V 酶切
- 泳道 10: AC Excel 野生型, *EcoR* V 酶切
- 泳道 11: T45, 未酶切

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 pHoe4/Ac(II)基本上是通过载体 pPCV002 获得的，它包括以下结构元件：

- 质粒的核心部分：包含来自合成的大肠杆菌载体 PiAN7，使质粒能在大肠杆菌中复制的复制起始点；以及来自载体 RK2 使质粒能在农杆菌中复制的 *oriV* 和 *oriT* 区域。
- 选择标记基因：来自含有链霉素/壮观霉素乙酰转移酶基因（表达抗链霉素和壮观霉素的蛋白）的大肠杆菌质粒 R538-1，可供在大肠杆菌和农杆菌中增殖和筛选质粒。
- 源自 Ti 质粒 pTiT37 的合成右边界序列
- 源自 Ti 质粒 pTiAch5 的合成左边界序列
- T-DNA 边界序列之间的嵌合 *pat* 基因：该嵌合基因由以下几部分组成，即可启动转录的启动子序列、*pat* 基因的编码序列以及含有 3'端非翻译区域(终止子)的片段（提供转录终止和多腺苷酸化信号）。启动子和终止子序列源自于花椰菜花叶病毒的 35S 转录产物。

只有嵌合的 *pat* 基因和多接头序列位于边界序列之间。

载体图谱见图 7，载体的遗传元件描述见表 2。

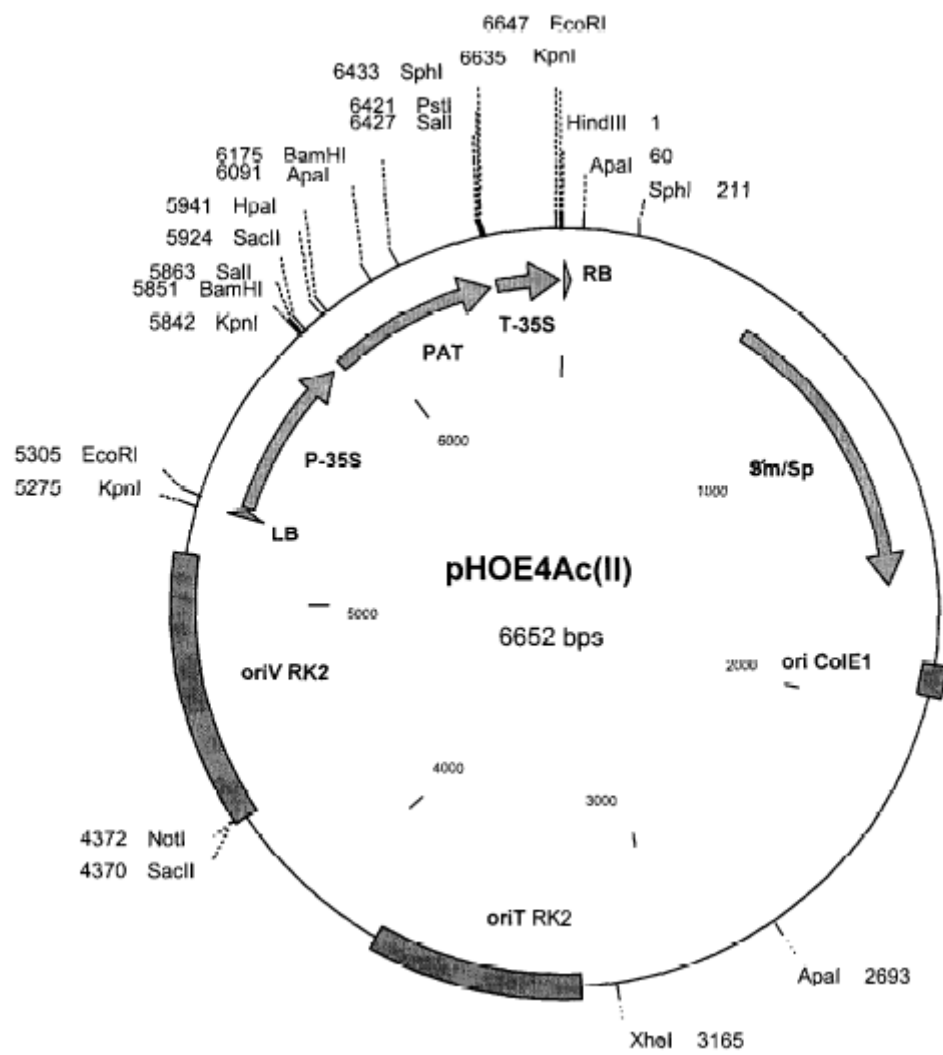


图 7. pHoe4/Ac(II) 载体图谱

表 2. pHoe4/Ac(II) 的遗传元件的描述

核苷酸位置	描述
1—60	含土壤根癌农杆菌 Ti 质粒 pTiT37 右边界重复序列的人工合成 DNA
61—1841	来自含链霉素/壮观霉素腺苷酰转移酶基因的大肠杆菌 <i>E. coli</i> 质粒 R538-1(第 619—1587 位)(Hollingshead and Vapnek, Plasmid 13, 17—30, 1985)
1842—2692	来自包括 ori ColE1 在内的人工合成的大肠杆菌 <i>E. coli</i> 载体 PiAN7(第 1859 位)(Huang <i>et al.</i> , Biotechnology 10, (1988), 第 269—283 页)
2693—3164	来自土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti 质粒 pTiT37 (靠近第 60 位的 Apal 位点)
3165—5274	大肠杆菌 <i>E. coli</i> RK2 质粒的 OriV 和 oriT 区 (Figurski and Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), 第 1648—1652 页)
5275—5310	人工合成的土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti 质粒 pTiAch5 左边界重复序列
5311—5840	pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 启动子(Pietrzak M <i>et al.</i> , Nucleic Acids Res., 14, (1986), 第 5857—5868 页)
5841—5868	人工合成的多接头序列
5869—6420	人工合成的 <i>pat</i> 基因 (绿棕褐链霉菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 的氨基酸序列) (Strauch <i>et al.</i> , 1993, 欧洲专利 275957 B1)
6421—6440	人工合成的多接头序列
6441—6645	pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 终止子(Pietrzak M <i>et al.</i> , Nucleic Acids Res., 14, (1986), 第 5857—5868 页)
6646—6652	人工合成的多接头序列

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;

启动子: 来自 pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 启动子(Pietrzak M *et al.*, 1986), 在载体 pHoe4/Ac(II)上的核苷酸位置为: 5311—5840。

终止子: 来自 pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 终止子(Pietrzak M *et al.*, 1986), 在载体 pHoe4/Ac(II)上的核苷酸位置为: 6441—6645。

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：来自含有链霉素/壮观霉素乙酰转移酶基因（表达抗链霉素和壮观霉素的蛋白）的大肠杆菌质粒 R538-1，可供在大肠杆菌和农杆菌中增殖和筛选质粒。

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）。

表 1 和表 2 分别汇总了转基因油菜 T45 中的插入片段和用于转化的质粒中的遗传元件的名称、来源、功能信息和核苷酸位置。

2.5 转基因方法。

转基因油菜 T45 是通过农杆菌介导的转化方法将质粒 pHoe4/Ac(II)中的 T-DNA 转入油菜受体 AC Excel 中的。通过农杆菌转化植物组织，用含有草铵膦的愈伤组织培养基筛选得到的愈伤组织。最后将筛选出来的愈伤组织转移至不含草铵膦的培养基上以使愈伤组织发育并成苗。将分离的幼苗转移至温室，作进一步鉴定。

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；

为了证明导入的 *pat* 基因在转基因油菜 T45 中的表达，对不同组织进行了 Northern 印迹杂交分析。分析表明，转基因油菜 T45 中存在的 *pat* 序列在测试的叶片、茎和根等组织中表达。所观察到的表达水平对应的 *pat* RNA 水平为 20~40 pg/μg 总叶片和茎 RNA、5~20 pg/μg 根总 RNA。

在种子 RNA 样品中（检测限：5 μg RNA 中 12.5 pg 基因转录体），未测定到任何杂交信号。尽管在收获的成熟种子中未检测到杂交信号，但是由于在收获的种子中可检测到 PAT 蛋白约 200 ng/g，因此预计在发育的种子中可以检测到 RNA。

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法；

利用 Northern 印迹杂交分析，在不同组织中分析了插入序列的表达量。

测试物、对照物质和标准物质

从转基因油菜 T45（F5 代）的叶片、茎、根和籽粒组织中提取的总 RNA，作为测试物。

从非转基因油菜 AC Excel 的叶片、茎、根和籽粒组织中提取的总 RNA，作为对照物。

体外合成的正义 *pat* RNA 转录产物系列稀释液加从野生型油菜叶片中提取

的 RNA，用作证明所转入基因表达水平的标准物质。

Northern 印迹分析

转基因油菜 T45 和非转基因油菜 AC Excel 都种植在拜耳生物科技公司的温室里（比利时 Deinze）。收集油菜的叶片、茎和根组织，将它们直接转移到和冻存在液氮中。根据 Chomczynski 和 Sacchi（1987）提出的改良单步 RNA 提取法分离出总 RNA。

为了分析 *pat* 基因的表达水平，我们扩增了一个特异的 T-DNA 片段，充当体外 RNA 合成所用的 DNA 模板。针对该模板，我们设计两个引物：一个是上游引物（MDB404），它是由与特异 T-DNA 序列相邻的 SP6 启动子（包括存在于转录产物 5'端的 6 个核苷酸 ggg.AgA）组成；另一个是下游引物（MDB403），它是由与特异 T-DNA 序列相邻的 T7 启动子（包括存在于转录产物 5'端的 6 个核苷酸 gAATAC）组成。借助 Expand™高保真 PCR 系统（Boehringer Mannheim），通过 PCR 合成体外 RNA 所用的 DNA 模板。利用 PCR 生成的模板和 Boehringer Mannheim 公司的 SP6/T7 转录工具包，制备高比活单链 RNA 探针。

利用 Ambion 公司（Ambion Inc., Austin, Texas, USA）提供的 Megascript™ SP6 和 T7 试剂盒，通过合成的 PCR 片段进行体外 RNA 分析。通过含有甲醛的变性琼脂糖凝胶电泳，将分子质量不同的 RNA 分离开。完成电泳后，通过毛细管洗脱立即将 RNA 从琼脂糖凝胶转移到尼龙膜（Hybond-N, Amersham）上（Sambrook *et al.*, 1989）。借助旋转瓶架，在杂交箱中实施杂交和清洗步骤。

结果与讨论

体外合成的 *pat* 基因转录体的系列稀释溶液与反义 *pat* 基因探针进行杂交（见图8，第13~18泳道）。这就表明，Northern印迹杂交是在可与靶序列杂交的条件下进行的。

用测试物对应的非转基因样品进行杂交，没有获得杂交信号，表明不存在探针的背景杂交（见图8，第4，7，10和12泳道）。用5 µg叶片总RNA（见图8，第2和3泳道）和茎杆总RNA（见图8，第5和6泳道）杂交，表明在100~200 ng之间存在杂交信号（大小：约900个核苷酸）。这将相当于 *pat* 基因的表达水平为20~40 pg/µg叶片总RNA或茎总RNA。用5 µg根的总RNA（见图8，第8和第9泳道）进行杂交，表明从25~100 pg参比样品获得的杂交信号之间，存在一条杂交信号。这将相当于 *pat* 基因在根中的表达水平为5~20 pg/µg根总RNA。用5 µg T45 的种子总RNA（见图8，第11泳道）进行杂交，没有出现杂交信号。系列稀释浓度中可见的最低量相当于5 µg 叶片总RNA中含12.5 pg *pat* 基因转录体。

尽管在收获的成熟种子中未检测到杂交信号，但是由于在收获的种子中可检测到约200 ng/g的PAT蛋白，因此预计在发育的种子中检测得到RNA。

自显影图如图8所示。

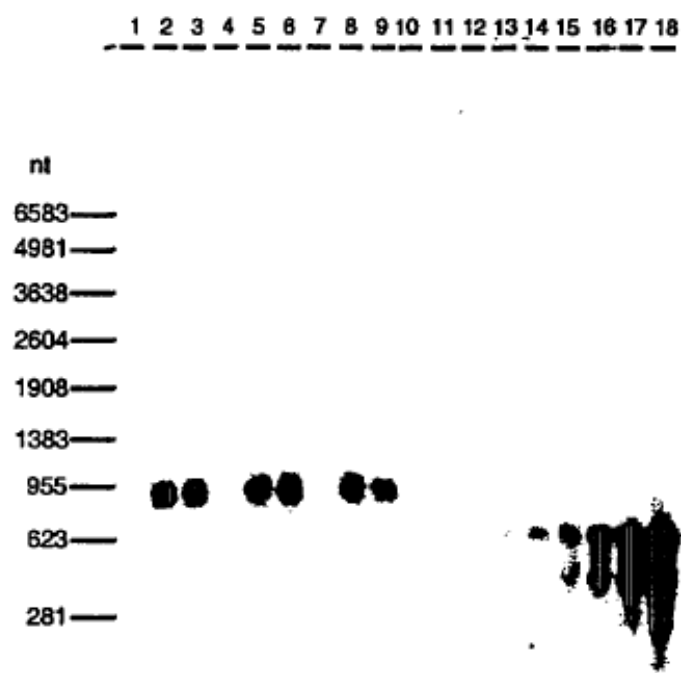


图 8. *pat* 基因在转基因油菜 T45 中的表达分析

从转化事件 T45 植株和非转基因植株 (AC Excel) 中提取总 RNA。每个泳道上样 5 μ g 总 RNA。探针: 反义 *pat* 转录本 (T7 转录)

1. RNA 分子量标准 (G319, Promega)
2. 油菜转化事件 T45 叶片 RNA, 植物 A (RNA-T45-0197)
3. 油菜转化事件 T45 叶片 RNA, 植物 B (RNA-T45-0297)
4. 野生型 AC Excel 叶片 RNA (RNA-T45-0197C)
5. 油菜转化事件 T45 茎 RNA, 植物 A (RNA-T45-0397)
6. 油菜转化事件 T45 茎 RNA, 植物 B (RNA-T45-0497)
7. 野生型 AC Excel 茎 RNA (RNA-T45-0297C)
8. 油菜转化事件 T45 根 RNA, 植物 A (RNA-T45-0597)
9. 油菜转化事件 T45 根 RNA, 植物 B (RNA-T45-0697)
10. 野生型 AC Excel 种子 RNA (RNA-T45-0397C)
11. 油菜转化事件 T45 种子 RNA (RNA-T45-0797)
12. 野生型 AC Excel 种子 RNA (RNA-T45-0397C)
13. 野生型 AC Excel 叶片 RNA (RNA-T45-0197C) +12.5 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
14. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 25 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
15. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 50 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
16. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 100 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
17. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 200 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
18. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 400 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本

2.6.3 插入序列表达的稳定性。

转基因油菜T45是用pHoe4/Ac(II)质粒、通过农杆菌*Agrobacterium*介导的基因转化方法而获得的。pHoe4/Ac(II)转化质粒携带一个嵌合的*pat*基因构建体，赋予植物对除草剂草胺磷的抗性。Southern印迹杂交和整合分析表明，T45中插入了一个拷贝的T-DNA。已经表明，插入序列稳定，且符合标准的孟德尔遗传规律。

在转基因油菜T45的开发阶段进行了复杂交实验，收集了抗草胺磷除草剂的分离数据。没有发现任何新性状（包括表型和基因型）的丢失。一旦整合入不同的遗传背景，整合的基因都按照预测的方式表达。

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。

如上所述，基因操作改变了受体生物表现型，但对健康和环境安全没有不利影响，按照《农业转基因生物安全评价管理办法》对基因操作安全性划分标准，该基因操作安全性为2，即：“不影响受体生物安全性的基因操作”。

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。

为了证明转基因油菜 T45 在多个世代中的稳定性，用含有 *pat* 基因盒的 1342 bp 的 *EcoR* I 酶切片段，进行了 Southern 印迹杂交分析。杂交策略的示意图列于图 9 中。杂交结果列于图 10 中。

我们用从非转基因品种 AC Excel 植株中制备的基因组 DNA 作为 DNA 阴性对照。用阴性对照来证实不存在背景杂交（见图 10，第 5 和 11 泳道）。

我们用从非转基因品种 AC Excel 植株中制备的基因组 DNA 加上大约 1 拷贝的 *EcoR* I 酶切消化的 pHoe4/Ac(II)、以及 1 拷贝的 *EcoR* I-*Hpa* I 双酶切消化的 pHoe4/Ac(II)作为 DNA 阳性对照。观察到预期大小的 1342 bp、704 bp 和 638 bp 的片段。这一对照表明，杂交是在可让探针与靶序列进行杂交的条件下进行的。

将 3 个世代的 T45 油菜用 *Hpa* I 酶切消化。这一限制性酶在转基因 T-DNA 中只有一个限制性识别位点（见图 9）。将 *Hpa* I 酶切消化的 T45 基因组 DNA 与 1342 bp 的 *EcoR* I 酶切消化片段杂交，结果产生大小分别为 5100 bp 和 4500 bp 的两条杂交片段，分别代表的是转基因序列与 T-DNA 插入序列上游植物 DNA 序列之间的接合区，以及转基因序列与 T-DNA 插入序列下游植物 DNA 序列之间的接合区（见图 10）。从不同世代的未经酶切消化的 T45 基因组 DNA 的 3 个泳道中，观察到高分子量的片段。

通过 Southern 印迹杂交分析，我们证明了：限制性酶对整合的 T-DNA 以及相邻的植物 DNA 进行了切割，所产生的转基因油菜 T45 的上游整合片段和下游整合片段，在测试的 3 个世代中是相同的。这些结果表明，转基因油菜 T45 在

多个世代中，在基因组水平上保持稳定。

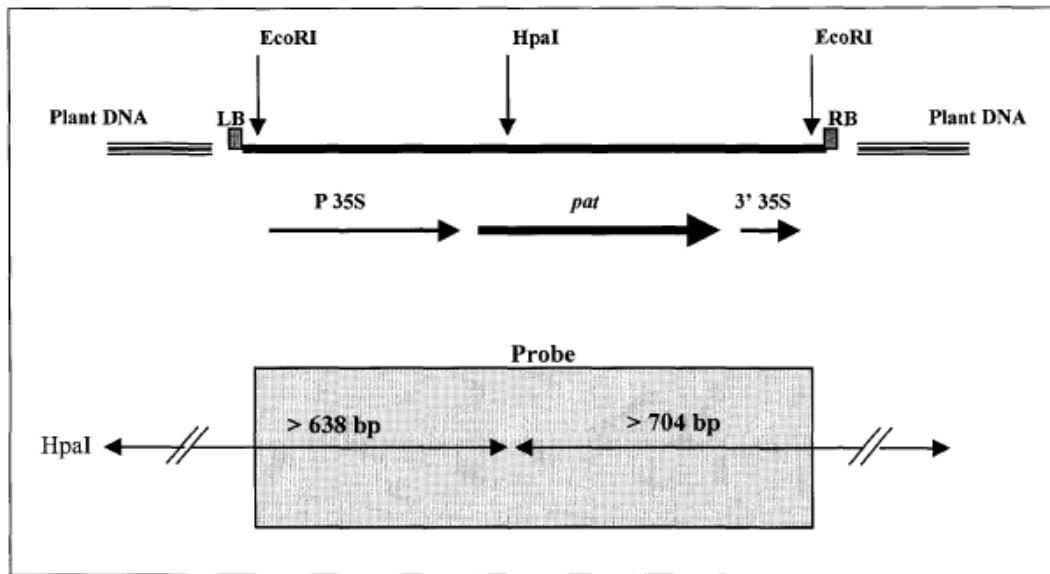


图 9. 油菜 T45 的遗传稳定性分析的策略

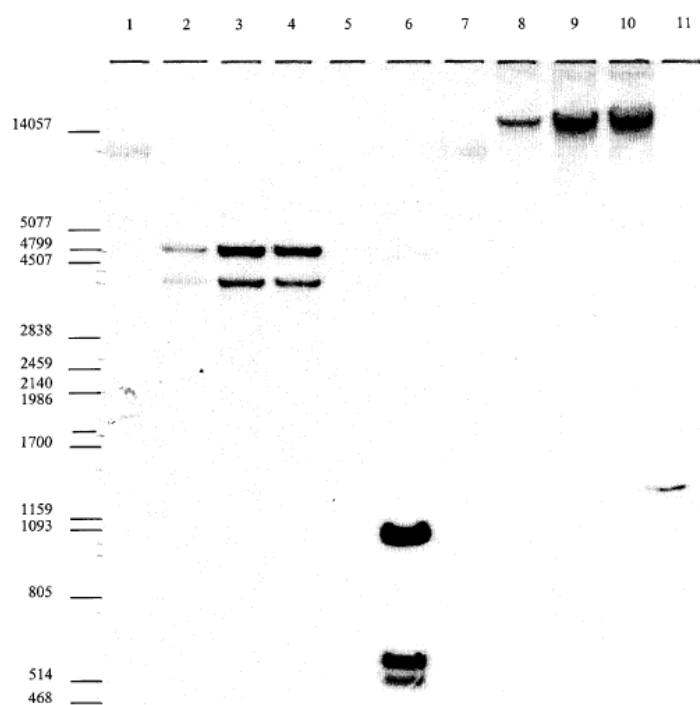


图 10. Southern 杂交分析（探针：1342 bp *EcoR* I 片段）

1. λ DNA, *Pst*I 酶切
2. T45 (F5), pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I 酶切
3. T45 (F7), *Hpa* I 酶切
4. T45 (R2), *Hpa* I 酶切
5. 野生型, *Hpa* I 酶切
6. 野生型, *Hpa* I 酶切 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I- pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I/ *Hpa* I
7. λ DNA, *Pst* I 酶切
8. T45 (F5), 未酶切
9. T45 (F7), 未酶切
10. T45 (R2), 未酶切
11. 野生型, 未酶切

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；

油菜的生殖方式为有性生殖，转基因油菜和非转基因油菜在生殖方式上不存在差异。

在田间条件下胚珠授精主要靠自花授粉，虽有报道说异交率在 5-30%。花粉重且粘度大，可借助风或昆虫在不同的植株间转换。曾经在油菜田间上空及边界

外检测到油菜花粉，但是随着与花粉源距离的增加花粉浓度下降迅速，且远距离授粉不能成功或可忽略不计。

不同播期的生育期调查结果表明：转基因油菜 T45 与其他对照品种相似，在冬油菜区除 6、7 月播种苗期遇到夏季高温天气，死苗严重，难以收获种子外，其他时间播种都能收获种子。不同播期种子收获量差异大，以秋季播种种子产量最高。

3.2.2 传播方式和传播能力；

油菜的传播主要是依靠种子。转基因油菜和非转基因油菜在传播方式上不存在差异。由于油菜 T45 中转入的抗草铵膦性状，不会影响其种子和花粉的特性，所以认为油菜 T45 与常规对照油菜在传播方式和传播能力上不存在任何差异。

3.2.3 休眠期；

通过对转基因油菜 T45 和非转基因对照品种 CH 系列、国内中双 7 号、青油 14 号以及白芥的一年休眠特征检测，冬油菜区和春油菜区各品种的休眠特性差异不显著，春油菜种子在土壤中的深度对种子的休眠特性影响差异显著，深埋种子休眠率高。总的检测结果表明：转基因油菜品种 T45 的休眠性没有显著增强。

表 3. 冬油菜区油菜种子一年休眠期在品种和种子深度二因素试验的方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}
区 组 间	2	2.93	1.47	0.74	3.28
处 理 间	13	26.76	2.06	1.04	1.91
品 种	6	10.26	1.71	0.86	2.23
深 度	1	8.17	8.17	4.11	4.13
品 × 深	6	8.33	1.39	0.698	2.73
误 差	26	51.74	1.99		
总 变 异	41	81.43			

表 4. 春油菜区油菜种子一年休眠期在品种和种子深度二因素试验的方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}
区 组 间	2	6.33	3.17	0.38	3.28
处 理 间	13	332.33	25.56	2.59*	1.91
品 种	6	165.00	27.50	2.79*	2.23
深 度	1	2.66	2.66	0.27	4.13
品 × 深	6	164.67	27.45	2.78*	2.73
误 差	26	256.67	9.87		
总 变 异	41	595.33			

由上表可知，转基因油菜 T45 的适应性高于白芥、低于国内的非转基因中双 7 号对照，这些差异都达到极显著水平。虽然品种间适应性差异大，但都小于 0.3，表明这些品种在自然条件下种群很难扩大。

3.2.4 适应性；

1995 年在美国 2 个试验点的田间试验的结果显示，抗草铵膦油菜 T45 在表型、农艺性状、产量方面，与常规油菜植株没有显著性差别。所以其适应性与常规对照油菜相当。

3.2.5 生存竞争能力；

荒地生存竞争性：

通过将定量的种子撒播在一年的荒地上，让油菜自生自灭，结果表明：转基因油菜 T45 与非转基因油菜品种差异不显著。转基因油菜 T45 的成株率在测试的 15 个品种中处于中间或者偏低水平。

表 5. 荒地油菜成株数与播种量百分率的方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区组间	3	0.8113	0.2704	1.94	2.83	
处理间	14	439.6425	31.4030	225.27**	1.94	2.54
误 差	42	5.8562	0.1394			
总变异	59	446.31				

表 6. 荒地油菜品种间成株数与播种量百分率的新复极差测验

品 种	平均成株率 (%)	差 异 显 著 性	
		5%	1%
白 芥	12.48	a	A
青油 14 号	2.14	b	B
CH03	2.05	b	BC
CH06	2.05	b	BC
CH02	2.00	b	BC
CH07	1.83	bc	C
Ms8Rf3	1.78	cd	CD
OXY235	1.75	cd	D
CH04	1.73	cd	D
中双 7 号	1.60	d	DE
Ms1Rf1	1.60	d	DE
Topas 19/2	1.55	d	DE
T45	1.54	d	DE
Ms1Rf2	1.33	e	EF
CH05	1.15	e	F
CH01	1.10	f	F

农田生存竞争性:

转基因油菜在农田的生存竞争能力评价,是通过正常农田栽培管理,油菜成熟收获后,于下一个生长季节调查田间油菜的自生苗数,用自生苗数与上个季节的油菜成株数的比值作为该品种的适合度,应用该适合度评估每个品种的农田生存竞争能力。

转基因油菜 T45 的适合度介于试验品种的中间。这一结果的趋势与荒地结果类似。从平均适合度来看,试验品种中适合度最高的为 0.105, T45 的适合度为 0.064,从这些数值可以看出,农田条件下的油菜的适合度很低,这样自生油菜的种群数量一般较少。

表 7. 农田转基因与非转基因油菜适合度的方差分析

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区组间	3	0.003049	0.0010163	6.527**	2.83	4.29
处理间	14	0.032940	0.0023529	15.112**	1.94	2.54
误差	42	0.006539	0.0001557			
总变异	59	0.042528				

表 8. 农田转基因和非转基因油菜适合度的新复极差测验

品 种	适合度 (平均)	差 异 显 著 性	
		5%	1%
中双 7 号	0.105	a	A
CH03	0.098	b	B
CH02	0.090	c	C
Ms8Rf3	0.088	d	D
Ms1Rf1	0.088	d	D
CH06	0.088	d	D
青油 14 号	0.083	e	E
CH07	0.083	e	E
OXY235	0.083	e	E
CH04	0.075	f	F
Ms1Rf2	0.068	g	G
CH01	0.065	i	I
T45	0.064	j	J
CH05	0.063	k	K
Topas 19/2	0.055	l	L
白芥	0.0025	m	M

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；

油菜 T45 中的目的基因仅可以通过有性杂交转移到亲和种属中，没有证据表明转基因植物的遗传物质可以向其他生物水平转移。

异交发生的可能

油菜开花时花粉散出，由于重力作用，50%的花粉落在距离单株 3 米以内（Lavigne, 1998），93%的花粉飘落在离散粉花朵 10 米范围内，只有 7%左右的花粉象粉尘一样随风飘散（Staniland, 2002）。油菜花粉的分布呈尖峰型，即随着距离增大，花粉数量急剧减少，最远可达 1.5 公里，以昆虫为媒介可达 4 公里（Thompson *et al.*, 1999; Ramsay *et al.*, 1999）。散出后油菜花粉的活力可以持续一天至一个星期不等（Mesquida 和 Renard, 1982）。

转基因油菜 T45 花粉对普通甘蓝型油菜品种的天然异交率为 3% 以下，通过空间隔离、时间隔离和设置保护行可以显著降低异交的发生，进而基本防止异交的转基因扩散。

向近缘种扩散的可能

根据现有文献记载，甘蓝型油菜最容易杂交的物种为白菜（包括野生白菜）。种间杂交通常结实率很低。目的基因能否从转基因油菜转移到近缘种，与很多因素有关，例如花期是否相遇、花粉能否在受体品种的柱头萌发、花粉管能否伸长、能否受精、受精胚胎能否长大形成种子，种子能否发芽等。对于种间杂交来说，以上每个环节都比普通种间杂交困难的多，任何一个环节通不过，都不能实现种间基因的转移。种间杂交通常是不结实或很少结实。因而，在田间自然授粉条件下，转基因油菜 T45 与其他物种很难杂交。

3.2.7 转变成杂草的可能性；

在农业生态系统中，世界各国都未将甘蓝型油菜列为农田杂草，在我国有关农田杂草的著作中也未将甘蓝型油菜列为十字花科杂草（李扬汉，1998）。

加拿大是目前世界上转基因油菜种植面积最大的国家。转基因油菜已经在加拿大种植多年，目前，没有证据显示转基因抗除草剂油菜更容易杂草化。转基因油菜的生长特性、花粉量、花粉活力、种子产量、种子大小、种子萌发和休眠特性、以及其他农艺性状等与非转基因油菜没有本质上的差异（Canada Food Inspection Agency 1996, APHIS 1999）。转基因油菜的裂荚性、种子大小和重量与非转基因品系没有显著差异，表明转基因油菜种子的扩散能力没有显著改变（Canada Food Inspection Agency 1995, 1996）。

在自然生态系统中，没有研究资料显示油菜是一种入侵性或恶性杂草（Warwick & Small 1999, Beckie *et al.*, 2001, Salisbury 2002c）。抗除草剂转基因油菜没有改变其在自然生境中杂草化的入侵潜能（Canada Food Inspection Agency 1995, Rashe & Gadsby 1997, MacDonald & Kunta 2000）。Crawley 等（1993 和

2001) 在英国进行了为期 10 年的抗除草剂转基因油菜杂草化长期生态研究, 结果显示: 遗传改变的抗除草剂草铵膦油菜杂草化能力没有增强, 转基因和非转基因油菜在所有试验点都没有增强种群的丰富度, 除非不是进行生态试验, 而是使用草铵膦除草剂。

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;

受农业部委托, 农科院油料所在 2003 年开展了转基因油菜 T45 的环境安全检测的试验, 田间观察确认 T45 与受体在表现型、对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著区别, 这表明抗草铵膦油菜 T45 与捕食者或者有益的非靶标生物的互作上没有改变。

王国平、张国安、姜道宏等(2003)检测了抗草铵膦油菜 T45 品种对生物多样性影响, 认为抗草铵膦 T45 品种对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用。

转基因油菜 T45 的 *pat* 基因的供体生物是绿棕褐链霉菌, 是一种土壤中的放线菌, 因此是广泛存在于土壤环境中的。没有任何与这种绿棕褐链霉菌相关的负面报道。大量的安全评价数据也表明 PAT/*pat* 蛋白对人类健康和环境是安全的。

田间测试也表明, 在农艺性状特征、竞争性、杂草性、入侵性、对病害和捕食者的敏感性或产量方面, 转基因油菜 T45 与非转基因油菜的安全性相当。

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;

大肠杆菌与植物表达的 PAT 蛋白的实质等同

大肠杆菌表达的 PAT/*pat* 蛋白用于评价该蛋白在食品、饲料和环境中潜在的毒性和致敏性研究。这些研究结果用于说明在油菜 T45 中表达的 PAT/*pat* 蛋白的安全性。为了使用蛋白的这些安全性数据, 关键是要证明微生物中表达的蛋白可以代表转基因植物中表达的相同的蛋白。因此, 从 5 个方面比较了大肠杆菌和油菜 T45 表达的 PAT/*pat*。分析测试的主要结论为:

- 1) N 端序列分析获得预期的结果, 获得的数据证明了两种来源的蛋白质的身份;
- 2) SDS-PAGE 凝胶电泳中的蛋白质迁移率表明分子量上没有区别, 并且 SDS-PAGE 凝胶显示油菜 T45 中纯化的蛋白纯度很高;
- 3) Western 印迹分析说明, 二者的电泳迁移率和免疫活性相当;
- 4) 对 SDS-PAGE 凝胶进行的糖基化染色结果显示, 非糖基化蛋白标准、大肠杆

菌和油菜 T45 中表达的 PAT/*pat* 都仅有非常微弱的糖基化染色，与预期一致，说明油菜 T45 中的 PAT/*pat* 没有糖基化；

5) 两种蛋白均与相同的底物发生反应，表明具有相同的生物活性、蛋白质的折叠是正确的。

因此，从大肠杆菌表达的 PAT/*pat* 蛋白所获得的安全性数据可用来支持 T45 油菜中表达的 PAT/*pat* 蛋白的安全性。

A. 供体生物的安全性

膦丝菌素乙酰转移酶基因 (*pat*) 的供体生物是绿棕褐链霉菌。该供体生物已知不是毒素的产生者，是一种土壤中的放线菌，因此是广泛存在于土壤环境中的。没有任何与这种绿棕褐链霉菌相关的负面报道。转基因油菜 T45 中的 *pat* 基因经过改造，以优化它在植物中的表达。

B. 蛋白与已知毒素的相似性分析

利用计算机模拟方法，将来源于 *pat* 基因的 PAT 蛋白与公共蛋白质数据库中的已知毒素进行比对，评价它们在氨基酸序列上是否存在潜在相似性。

与预期的一样，用来源于 *pat* 基因的 PAT 蛋白进行的整体同源性检索，结果表明该蛋白仅与各种细菌来源的其他乙酰转移酶存在主要的相似性。

C. 可消化性

大肠杆菌 *E. coli* 中产生的、由 *pat* 基因编码的 PAT/*pat* 蛋白在模拟的人体胃液中培养 0.5~60 min，测试了 PAT 蛋白的消化稳定性。

在约 37°C 下，将测试蛋白溶液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，在 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min 这几个时间点取等分样品进行分析。通过考马斯亮兰染色的 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 印迹杂交，分析样品中是否存在测试蛋白以及可能的稳定性蛋白片段。用抗 PAT/*pat* 蛋白的多克隆抗体进行免疫测定。适合的对照包括了 pH 1.2、无胃蛋白酶的测试蛋白 (0 和 60 min 两个时间点)、只含模拟的人体胃液 (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和已知可被缓慢消化的参比蛋白卵清蛋白。

PAT/*pat* 在模拟胃液中孵育 0.5 min 以及随后的孵育时间内，在 SDS-PAGE 凝胶上看不到 PAT/*pat* 蛋白，也未见分子量更小的条带。在 Western 印迹上看不到 PAT/*pat* 蛋白 (图 11 和图 12)。

因此，在 Western 印迹杂交上观察到的消化模式与考马斯亮兰染色的 SDS-PAGE 相似，在零时间点清晰可见 PAT/*pat* 蛋白，从 0.5 min 起快速降解 (90% 以上)，在只含模拟的人体胃液中看不到条带。总之，在 0.5 min 内，90% 以上的 PAT/*pat* 蛋白降解。

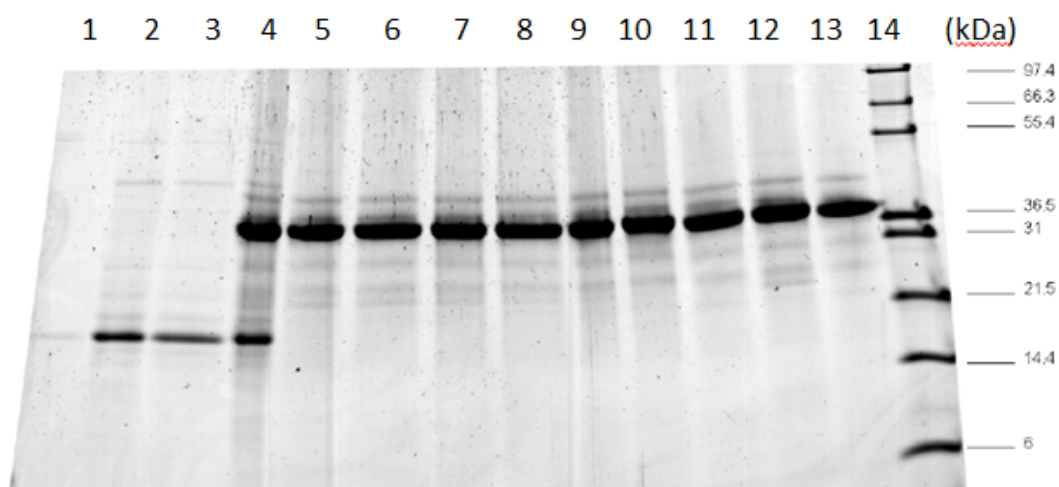


图11. PAT/*pat*蛋白在模拟人体胃液中孵育后的考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE

泳道 1:	1/10 蛋白, 0 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 8:	PAT 蛋白, 10 分钟, 胃蛋白酶
泳道 2:	PAT 蛋白, 0 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 9:	PAT 蛋白, 20 分钟, 胃蛋白酶
泳道 3:	PAT 蛋白, 60 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 10:	PAT 蛋白, 30 分钟, 胃蛋白酶
泳道 4:	PAT 蛋白, 0 分钟, 胃蛋白酶	泳道 11:	PAT 蛋白, 60 分钟, 胃蛋白酶
泳道 5:	PAT 蛋白, 0.5 分钟, 胃蛋白酶	泳道 12:	0 分钟, 胃蛋白酶
泳道 6:	PAT 蛋白, 2 分钟, 胃蛋白酶	泳道 13:	60 分钟, 胃蛋白酶
泳道 7:	PAT 蛋白, 5 分钟, 胃蛋白酶	泳道 14:	分子量标准

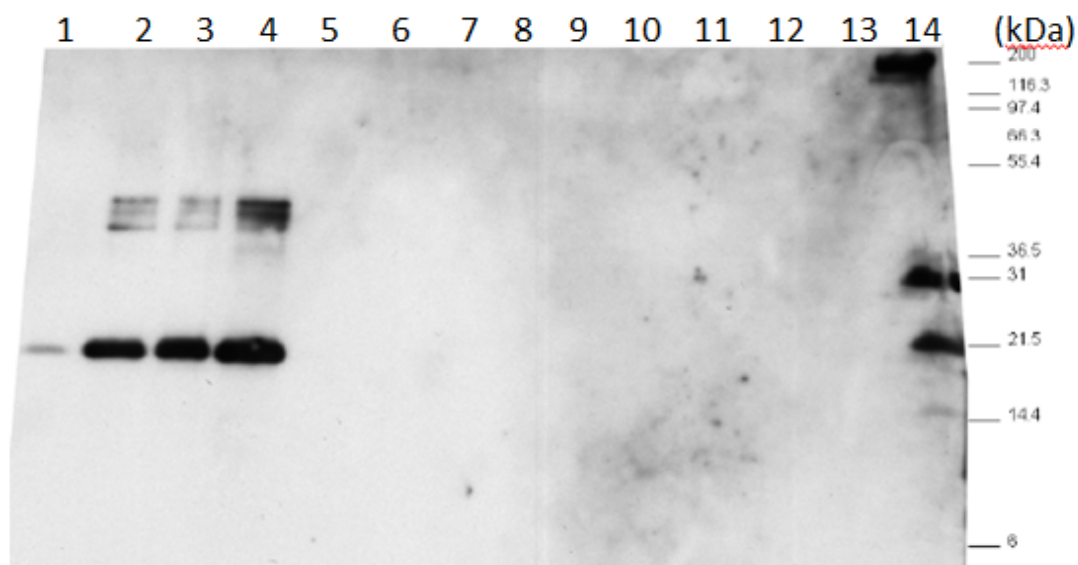


图12. PAT/*pat*蛋白在模拟人体胃液中孵育后的Western blot分析

泳道 1:	1/10 蛋白, 0 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 8:	PAT 蛋白, 10 分钟, 胃蛋白酶
泳道 2:	PAT 蛋白, 0 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 9:	PAT 蛋白, 20 分钟, 胃蛋白酶
泳道 3:	PAT 蛋白, 60 分钟, 无胃蛋白酶	泳道 10:	PAT 蛋白, 30 分钟, 胃蛋白酶
泳道 4:	PAT 蛋白, 0 分钟, 胃蛋白酶	泳道 11:	PAT 蛋白, 60 分钟, 胃蛋白酶
泳道 5:	PAT 蛋白, 0.5 分钟, 胃蛋白酶	泳道 12:	0 分钟, 胃蛋白酶
泳道 6:	PAT 蛋白, 2 分钟, 胃蛋白酶	泳道 13:	60 分钟, 胃蛋白酶
泳道 7:	PAT 蛋白, 5 分钟, 胃蛋白酶	泳道 14:	分子量标准

结论:

在 pH 1.2、存在胃蛋白酶时, PAT/*pat* 蛋白在模拟的胃液中孵育 0.5 min 内被极快速地降解。

D. 蛋白的热稳定性

本实验将 PAT (由 *pat* 基因编码) 在 60、75 和 90°C 条件下分别孵育 10、30 和 60 分钟, 测试它的热稳定性, 实验的结果用考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 进行检测。

在孵育时间为零时, PAT 蛋白 (约 21.5 KDa 处) 在 SDS-PAGE 和 Western blot 上清晰可见。除了在 90°C 孵育 60 分钟时, 除主带的量似乎有所减少之外, 在所有的孵育温度 (60、75 和 90° C) 和孵育时间 (10-60 分钟), PAT 蛋白主带没有可见的变化, 与未处理的样品相近 (图 13 和图 14)。

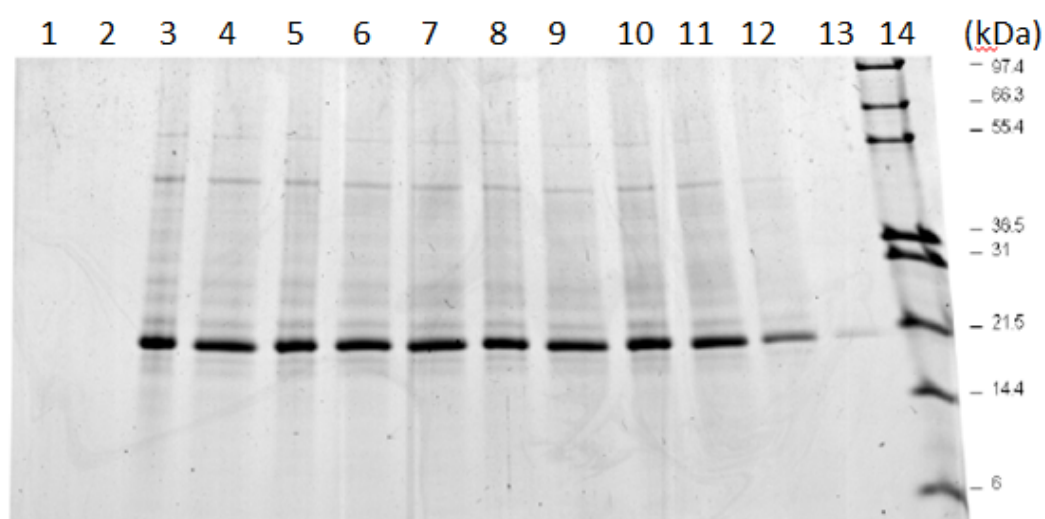


图 13. PAT/*pat* 蛋白热处理后考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE

泳道 1:	缓冲液 60℃加热 60 分钟	泳道 8:	PAT 蛋白 75℃加热 30 分钟
泳道 2:	缓冲液 90℃加热 60 分钟	泳道 9:	PAT 蛋白 75℃加热 60 分钟
泳道 3:	PAT 蛋白 0 分钟 (4℃)	泳道 10:	PAT 蛋白 90℃加热 10 分钟
泳道 4:	PAT 蛋白 60℃加热 10 分钟	泳道 11:	PAT 蛋白 90℃加热 30 分钟
泳道 5:	PAT 蛋白 60℃加热 30 分钟	泳道 12:	PAT 蛋白 90℃加热 60 分钟
泳道 6:	PAT 蛋白 60℃加热 60 分钟	泳道 13:	1/10 PAT 蛋白 0 分钟 (4℃)
泳道 7:	PAT 蛋白 75℃加热 10 分钟	泳道 14:	分子量标准

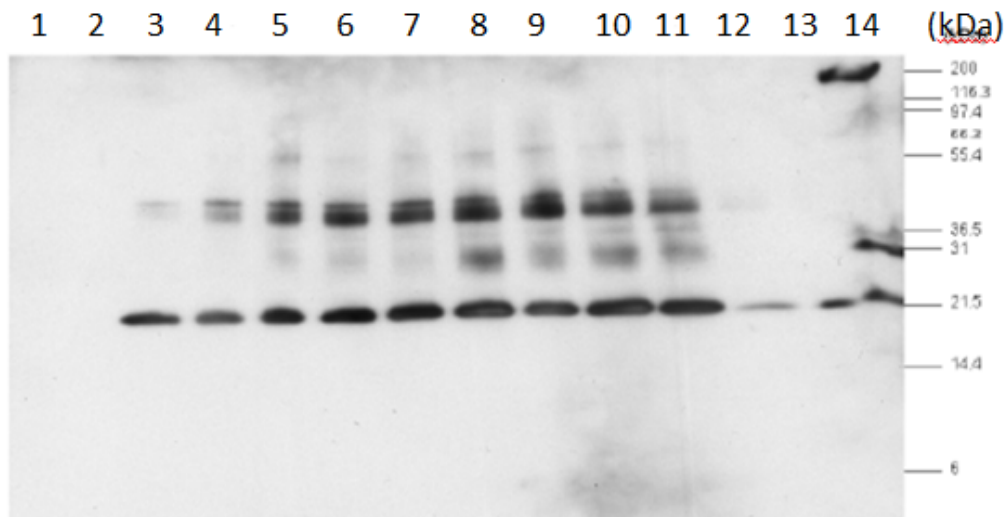


图 14. PAT/*pat* 蛋白热处理后 Western blot 分析

泳道 1: 缓冲液 60°C加热 60 分钟	泳道 8: PAT 蛋白 75°C加热 30 分钟
泳道 2: 缓冲液 90°C加热 60 分钟	泳道 9: PAT 蛋白 75°C加热 60 分钟
泳道 3: PAT 蛋白 0 分钟 (4°C)	泳道 10: PAT 蛋白 90°C加热 10 分钟
泳道 4: PAT 蛋白 60°C加热 10 分钟	泳道 11: PAT 蛋白 90°C加热 30 分钟
泳道 5: PAT 蛋白 60°C加热 30 分钟	泳道 12: PAT 蛋白 90°C加热 60 分钟
泳道 6: PAT 蛋白 60°C加热 60 分钟	泳道 13: 1/10 PAT 蛋白 0 分钟 (4°C)
泳道 7: PAT 蛋白 75°C加热 10 分钟	泳道 14: 分子量标准

结论

由 *pat* 基因编码的 PAT 蛋白在 90°C 条件下孵育 60 分钟时, PAT 蛋白条带有少量降解。

E. 经口急毒试验

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 (批号 1339_PATpat)。采用同样的方法, 同时饲喂一组包含 10 只雄鼠和 10 只雌鼠的另一组小鼠摄入溶剂, 该组小鼠起到对照的作用。连续 15 天每天观察所有小鼠的临床症状, 同时每隔一周测定一次小鼠体重和摄食量。实验结束时, 称量小鼠体重, 然后进行尸体剖检, 包括大体解剖检查。保存小鼠组织, 以供之后进行的显微检查。

C57BL/6J 小鼠按 2000 mg/kg 体重的剂量标准急性口服 PAT/*pat* 蛋白后, 尸检前, 小鼠没有死亡或者出现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。

总之，按照 2000 mg/kg 体重的剂量标准，通过口服途径给雄/雌 C57BL/6J 小鼠饲喂 PAT/*pat* 蛋白后，均未表现出任何系统毒性。

F. 大鼠 90 天喂养试验

2003 年，由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所开展的油菜 T45 大鼠 90 天喂养试验，在该试验中，非转基因油菜受体和常规油菜作为对照。将转基因油菜 T45 掺入饲料（比例为 5%），饲喂大鼠 90 天，动物活动，生长未见异常，被毛浓密光泽，转基因油菜籽 T45、非转基因油菜受体和常规油菜对照比较，未发现转基因油菜对试验大鼠的体重、食物利用率，血液学指标、血生化指标、脏体比以及组织病理学观察有生物学意义的异常变化。

3.3.2 过敏性；

评价蛋白质的致敏性，一般包括对蛋白的来源、该蛋白的表达量及在食品中所占的比例、与已知的致敏原氨基酸的相似性、模拟消化胃液中的稳定性等方面的评估。

如前所述，转基因油菜 T45 的 *pat* 基因来自绿棕褐链霉菌，该供体生物在自然界广泛存在，不具有致敏性。PAT 蛋白在转基因油菜 T45 中低水平表达。生物信息学分析表明 PAT 与已知过敏原不存在相似性，并且在模拟人体胃液中快速消化。转基因油菜 T45 表达的 PAT 蛋白不存在 N-糖基化位点。综上所述，PAT 蛋白不太可能具有致敏性。

3.3.3 抗营养因子；

在 2004 年，由中国疾病预防控制中心委托农业部油料及制品质量监督检验测试中心，对转基因油菜 T45 和非转基因油菜对照的抗营养因子进行检测。检测结果如下：

表 9. 转基因油菜 T45 和非转基因油菜抗营养因子检测

样品名称	T45 转基因	T45 亲本对照	检测方法
检测编号	20040100	20040101	
硫苷 (μmol/g 饼)	19.94	20.28	ISO9167-1992, NY414-2000
芥酸	0.38	0.38	GB/T17377-1998

3.3.4 营养成份；

拜耳作物科学（加拿大）公司对转基因油菜 T45、油菜栽培种 SW Flare 及对应的非转基因品种 A 和 X 进行了田间测试。试验在加拿大主要的油菜种植区萨斯喀彻温省和亚伯达省的 6 个不同的试验点进行了试验。这一研究中的植株种植在通常的生产实践条件下。

所有 6 个试验点中的试验均采用随机分裂区组设计。处理小区中，种植了油

菜 T45 的小区在第 2-4 叶期用草铵膦（Liberty 除草剂）喷雾一次，靶喷施剂量为 500 g ai/ha。其他小区为用 Liberty 处理的常规油菜小区以及未用 Liberty 处理的常规油菜小区。

在成熟时（种子含水量低于 12%），用小区联合收割机或用手（第 101 号试验点，Warman）收集未加工的农产品种子。将栽培种 SW Flare 及对应的非转基因品种 A 的样品运往 Eurofins Scientific Inc.和加拿大拜耳作物科学公司的油菜分析实验室，进行成分分析。品种 X 的种子样品未提交分析实验室。

从 Liberty 处理和未用 Liberty 处理的转基因样品以及非转基因样品获得常规成分、纤维、矿物质、生育酚、抗营养物、氨基酸和脂肪酸的数据。计算所有数据的平均值和标准差。

从 Liberty 处理的油菜 T45 植株以及未用 Liberty 处理的油菜 T45 植株所获得的种子，其不同营养物和抗营养物的含量与对应的非转基因油菜 A 的植株所获得的种子中的含量十分一致。如果发现计算出的转基因油菜和非转基因油菜的平均值的差异超过 20%（即，钠、铁、 α -生育酚、MSGF 和吡咯类硫苷、硬脂酸、亚麻酸和芥酸），则这是由于出现一些极端数值引起的（如铁和芥酸），只在一个转基因样品组是这样，或是为草铵膦处理的或未用草铵膦处理的同一样品组（即铁、硬脂酸和芥酸）；或未被总的参数（即总生育酚和总糖苷）所证实。

矿物质、生育酚和抗营养物的结果列于表 10 中。

在所有种子样品中， β -生育酚和 δ 生育酚的含量低于 3.33 mg/kg 干重这一限量。

在非转基因对照组平均值的基础上，发现钠、铁、 α -生育酚和 MSGF 平均值的差异大于 20%。

就铁而言，Liberty 除草剂处理的转基因样品的数据组有 3 个十分高的结果，在试验点 102 的第 701 号样品、104 号试验点的 302 号和 701 号样品中测定出。将这些结果剔除之后，差异不超过对照平均值的 20%。出现这一现象的原因可能是在收获和实验室分析测试期间，样品受到铁的污染。由于证明铁的含量高，因此可排除分析误差。

转基因样品中 α -生育酚的平均含量略高。未用 Liberty 除草剂处理的转基因样品的 α -生育酚的平均差异为 21.9%，Liberty 除草剂处理的转基因样品的 α -生育酚的平均差异为 20.4%。对总生育酚的平均值进行比较时，未证明这一结果。非转基因和转基因平均值的差异小于 20%。

表 10. 转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 以及对应的非转基因油菜品种 A 的种子中的矿物质、生育酚和抗营养物

参数	非转基因油菜			未用Liberty处理的转基因油菜			用Liberty处理的转基因油菜		
	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差
矿物质									
钙 (%)	0.40	±	0.03	0.43	±	0.04	0.43	±	0.05
磷 (%)	0.84	±	0.12	0.88	±	0.12	0.88	±	0.15
钾 (%)	0.92	±	0.13	0.85	±	0.14	0.86	±	0.15
镁 (%)	0.36	±	0.04	0.38	±	0.05	0.38	±	0.05
钠 (mg/kg)	71.6	±	28.7	47.2	±	22.3	53.4	±	16.5
铁 (mg/kg)	82.5	±	24.4	85.8	±	23.8	128.8	±	129.2
铁 (mg/kg) ^a	82.5	±	24.4	85.8	±	23.8	92.0	±	25.6
锰 (mg/kg)	32.0	±	3.6	34.0	±	3.0	35.8	±	6.9
铜 (mg/kg)	3.4	±	0.3	3.6	±	0.3	3.6	±	0.3
锌 (mg/kg)	33.8		6.3	36.4		6.9	37.0		7.0
生育酚									
α-生育酚	75.1	±	12.5	91.6	±	13.7	90.4	±	14.4
β-生育酚 ^b	<3.33			<3.33			<3.33		
γ-生育酚	51.4	±	17.0	45.9	±	16.3	46.6	±	18.5
δ-生育酚	<3.33			<3.33			<3.33		
总生育酚	126.4	±	28.3	137.5	±	28.9	136.9	±	31.6
抗营养物									
肌醇六磷酸 (%)	2.21	±	0.37	2.45	±	0.40	2.38	±	0.44
烯基GSL (μmol/g)	8.9	±	3.4	9.2	±	2.9	9.7	±	2.7
MSGSL GSL (μmol/g) ^c	0.4	±	0.1	0.2	±	0.1	0.3	±	0.1
吲哚GSL (μmol/g) ^d	4.2	±	0.7	5.6	±	0.7	5.7	±	0.6
总GSL (μmol/g) ^e	13.41	±	3.25	15.25	±	2.84	15.83	±	2.96

^a 将>200 mg/kg 干重的铁の数値剔除后计算的平均值。

^b 由于所有结果均低于定量限 (3.33 mg/kg)，因此数值不是通过计算平均值而获得的。

^c 烯基 GSL 报道为 3-丁烯基、4-戊烯基、2-羟基-3-丁烯、2-羟基-戊烯基硫苷的总和。

^d MSGSL GSL 报道为 4-甲基戊硫醇 (4-methylthiobutenyl) 和 5-甲基硫代戊烯基戊烯基硫苷 (5-methylthiopentenylglucosinolate) 的总和。

^e 吲哚 GSL 报道为吲哚-3-甲基和4-羟基吲哚-3-甲基硫苷 (4-hydroxylindolyl-3-methylglucosinolate) 的总和。

表 11 表示的是油菜种子的常规成分和纤维化合物的结果。转基因种子样品的常规成分和纤维的平均值与非转基因种子样品的平均值十分一致。

表 11. 转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 以及对应的非转基因油菜品种 A 的种子中的常规成分和纤维化合物

参数	非转基因油菜			未用Liberty处理的转基因油菜			用Liberty处理的转基因油菜		
	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差
含水量（%鲜重）	5.88	±	0.39	5.73	±	0.35	5.79	±	0.39
脂肪（%干重）	34.77	±	3.60	35.05	±	3.68	34.20	±	3.79
蛋白质（%干重）	27.29	±	1.77	26.73	±	1.84	26.72	±	1.50
灰分（%干重）	4.62	±	0.48	4.67	±	0.50	4.84	±	0.76
总碳水化合物（%干重） ^a	33.32	±	2.81	33.55	±	2.20	34.16	±	2.65
酸性洗涤纤维（%干重）	9.06	±	0.76	9.26	±	0.85	9.10	±	0.85
中性洗涤纤维（%干重）	12.82	±	1.31	13.60	±	1.35	14.26	±	1.63

^a 总碳水化合物计算为 100% - (蛋白质占干重的百分比 + 脂肪占干重的百分比 + 灰分占干重的百分比)

表 12 列出了酸水解蛋白后总氨基酸的分析结果。3 个处理组的氨基酸组成相似。表 13 列出了脂肪酸的分析结果。

通常地，转基因样品的脂肪酸组成与非转基因样品相似。转基因样品组的平均值存在较大差异的是亚麻酸（未用 Liberty 处理的转基因样品比对照的平均值高出 22.5%，用 Liberty 处理的转基因样品比对照的平均值高出 20.9%）。

就硬脂酸和芥酸而言，只有一个转基因样品组的平均值与对照组不同。就芥酸而言，这是由于第 106 号试验点的样品有一个结果十分高而引起的。如果从计算的平均值中剔除这一结果，3 个处理组的范围相同。

表 12. 转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 以及对应的非转基因油菜品种 A 的种子中的总氨基酸

参数	非转基因油菜			未用Liberty处理的转基因油菜			用Liberty处理的转基因油菜		
	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差
丙氨酸	1.24	±	0.07	1.19	±	0.08	1.21	±	0.07
精氨酸	1.68	±	0.14	1.59	±	0.15	1.63	±	0.15
天冬氨酸	2.02	±	0.16	1.86	±	0.17	1.90	±	0.17
半胱氨酸	0.63	±	0.04	0.66	±	0.05	0.67	±	0.03
谷氨酸	4.73	±	0.31	4.64	±	0.34	4.72	±	0.32
甘氨酸	1.28	±	0.07	1.27	±	0.08	1.29	±	0.08
组氨酸	0.71	±	0.04	0.70	±	0.04	0.72	±	0.04
异亮氨酸	1.01	±	0.06	0.96	±	0.07	0.99	±	0.05
亮氨酸	1.85	±	0.11	1.79	±	0.11	1.82	±	0.11
赖氨酸	1.55	±	0.10	1.52	±	0.10	1.54	±	0.10
甲硫氨酸	0.52	±	0.03	0.51	±	0.04	0.51	±	0.03
苯丙氨酸	1.09	±	0.06	1.03	±	0.07	1.06	±	0.07
脯氨酸	1.72	±	0.16	1.68	±	0.15	1.72	±	0.13
丝氨酸	1.12	±	0.09	1.09	±	0.07	1.10	±	0.10
苏氨酸	1.13	±	0.07	1.10	±	0.07	1.11	±	0.08
色氨酸	0.37	±	0.04	0.36	±	0.05	0.36	±	0.03
酪氨酸	0.69	±	0.05	0.66	±	0.06	0.68	±	0.06
缬氨酸	1.31	±	0.07	1.25	±	0.09	1.28	±	0.07

表 13. 转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 以及对应的非转基因油菜品种 A 的种子中的总脂肪酸

参数	非转基因油菜			未用Liberty处理的转基因油菜			用Liberty处理的转基因油菜		
	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差	平均值	±	标准差
C14:0 肉豆蔻酸 ^a	<0.03 - 0.05			<0.03 - 0.05			<0.03 - 0.05		
C16:0 棕榈酸	4.95	±	0.42	4.42	±	0.34	4.47	±	0.42
C16:1 棕榈油酸	0.32	±	0.05	0.33	±	0.03	0.34	±	0.04
C18:0 硬脂酸	1.91	±	0.34	1.48	±	0.23	1.53	±	0.26
C18:1 油酸	54.21	±	1.98	54.86	±	1.77	54.69	±	1.89
C18:2 亚油酸	22.92	±	1.44	20.83	±	1.28	20.95	±	1.26
C18:3 亚麻酸	11.56	±	0.70	14.06	±	0.59	13.98	±	0.86
C20:0 花生酸	0.70	±	0.10	0.60	±	0.08	0.62	±	0.08
C20:1 二十碳烯酸	1.56	±	0.09	1.62	±	0.09	1.61	±	0.05
C20:2 二十碳二烯酸	0.10	±	0.01	0.10	±	0.01	0.10	±	0.01
C22:0 山嵛酸	0.45	±	0.07	0.48	±	0.08	0.49	±	0.07
C22:1 芥酸 ^a	<0.03 - 0.11			<0.03 - 0.43			<0.03 - 0.08		
C22:1 芥酸 ^{a, b}	<0.03 - 0.11			<0.03 - 0.07			<0.03 - 0.08		
C24:0 二十四烷酸	0.25	±	0.07	0.21	±	0.06	0.23	±	0.06
C24:1 神经酸	0.43	±	0.16	0.41	±	0.16	0.40	±	0.08

^a 结果表示的不是平均值，原因是一些脂肪酸的含量低于定量限（低于 0.03%）。

^b 剔除了 0.43% 这一个十分高的芥酸值而计算出的平均值

3.3.5 抗生素抗性；

转基因油菜 T45 中不存在抗生素抗性基因，没有抗生素抗性。

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响。

PAT 蛋白与存在于微生物中的类似蛋白同源，在自然界是广泛存在的。并且，对 PAT 蛋白的安全性评价，也支持该蛋白对人类健康无不良影响的结论。因此转基因油菜 T45 对人体和食品安全性没有不良影响。

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。

根据农业部农业转基因生物的安全等级和产品的生产、加工活动对其安全等级的影响类型和影响程度，拜耳公司通过对受体植物、转基因操作、转基因植物及转基因产品的安全进行了全面的评估，认为转基因油菜 T45 的安全等级为 I 级。

4 转基因植物产品的安全性评价

4.1 生产、加工活动对转基因植物安全性的影响。

将 T45 转基因油菜中重要营养成分的含量与常规油菜相比，结果说明其营养成分并无实质性差异，而且转基因油菜 T45 中引入的基因并不编码能影响加工过程的性状。因此，考虑到转基因油菜 T45 的成分分析结果和引入的基因，不认为加工过程会导致 T45 转基因油菜和常规油菜间出现差异。

4.2 转基因植物产品的稳定性。

通过对多个世代和多个地点的转基因油菜 T45 的分子特征分析，确定了转基因油菜 T45 在多个世代的遗传稳定性。对转基因油菜 T45 的营养成分进行分析，并与非转基因对照进行比较，认为二者间的营养成分是实质等同的。

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。

与非转基因对照相比，转基因油菜 T45 在农艺性状和对环境安全方面的影响是等同的。抗除草剂杂草化能力没有增强，没有增强试验点的种群丰富度；未发现转基因油菜 T45 在生存竞争能力方面更强的证据；转基因油菜 T45 对油菜地昆虫和病害种群的影响与常规油菜无显著差异。

通过对 PAT 蛋白进行研究可知，该蛋白功能特异，不具有毒性或者致敏性。此外，在植物产品的加工和消费的过程中，包括了机械研磨、加热及人类、动物胃肠道消化，转基因油菜 T45 中的 PAT 蛋白很难以完整的活性形式存在，因此转基因油菜 T45 的植物产品比转基因植物对环境安全性方面的影响更小。

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。

前文所涉研究表明，油菜 T45 与常规油菜的组成成分实质等同，且两者加工方式相同。尽管 T45 油菜表达的 PAT 蛋白在常规油菜中不存在，但该蛋白表达量不具备营养学意义。PAT 蛋白不致毒、不致敏，且对酸不稳定。在产品的加工过程和人类消费的过程中，PAT 蛋白的含量和活性会大大降低，因此转基因油菜 T45 的植物产品不会对人类健康带来不良影响。

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，油菜所采用的生产加工方法不会影响油菜产品的安全性，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，油菜 T45 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 基因的核苷酸序列（商业保密资料）

商业保密信息，在本公开版本已删除

推导的氨基酸序列（183 a.a）

```
1  msperrpvei rpataadmaa vcdinvhyie tstvnfrtep qtpqewiddl erlqdrypwl
61  vaevogvvag iayagpwkar naydwtvest vyvshrhqrl glgstlythl lksmeaggfk
121 svvaviglpn dpsvrlheal gytargtlra agykhggwhd vgfwrdfel papprpvrpv
181 tqi
```

2. 目的基因与载体构建的图谱

植物的转化采用的是 Koncz 等人 (Mol. Gen. Genet. 204, (1986), 383-396) 介绍的载体系统。该载体系统由农杆菌菌株和两个质粒组成: 1) 非致瘤 Ti 质粒和 2) 基于质粒 pHOE4 的双元克隆载体。T 区已被删除的非致瘤 Ti 质粒携带有将在另一种质粒中克隆出的人工 T-DNA 转移到植物基因组中所需的 *vir* 基因。此外, 非致瘤 Ti 质粒还含有来自大肠杆菌的具有广泛宿主范围的载体 pRK2013 (Figurski and Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), 1648-1652), 它是维系农杆菌中的双元载体所必需的。在该双元载体中, 目标基因——例如嵌合的 *pat* 基因——位于 T-DNA 的边界序列之间。

1) 农杆菌菌株:

作为宿主的农杆菌菌株, 对利福平具有抗性, 由 C58 衍生而来的, 通过改造获得 Ti 质粒 pTiC58 (C58CTRI^r) (Van Larebeke *et al.*, Nature 252, (1974), 169-170)。非致瘤 Ti 质粒 pMP90RK 是由胭脂碱 Ti 质粒 pTiC58 获得的。pTiC58 的 T 区已被删除, 产生了 pMP90 质粒 (Mol. Gen. Genet. 204, (1986), 383-396)。为了确保农杆菌中的双元载体得到维系, 将具有广泛宿主范围的载体 pRK2013 的复制和维护功能引入到 pMP90 中, 获得了 pMP90RK 质粒。获得的菌株 C58CTRI^r (pMP90RK) 可以用作携带 T-DNA 边界序列之间的目的基因的双元载体的受体菌株, 像 pHoe4/Ac(II) 一样。

2) 双元载体 pHoe4/Ac(II) 的序列信息和遗传元件:

质粒 pHoe4/Ac(II) 基本上是通过载体 pPCV002 获得的 (Koncz *et al.*, Mol. Gen. Genet. 204, (1986), 383-396), 它包括以下结构元件:

- 质粒内核, 包含来自合成的大肠杆菌载体 PiAN7 (Huang *et al.*, Biotechnology 10, (1988), pp. 269-283)、使质粒能在大肠杆菌中复制的复制起始点, 以及来自载体 RK2 (Figurski and Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), pp. 1648-1652)、使质粒能在农杆菌中复制的 *oriV* 和 *oriT* 区域。

- 选择标记基因来自含有可表达抗链霉素和壮观霉素的蛋白的链霉素/壮观霉素乙酰转移酶基因 (Hollingshead and Vapnek, Plasmid 13, 17-30, (1985)) 的大肠杆菌质粒 R538-1, 用于在大肠杆菌和农杆菌中增殖和筛选质粒。

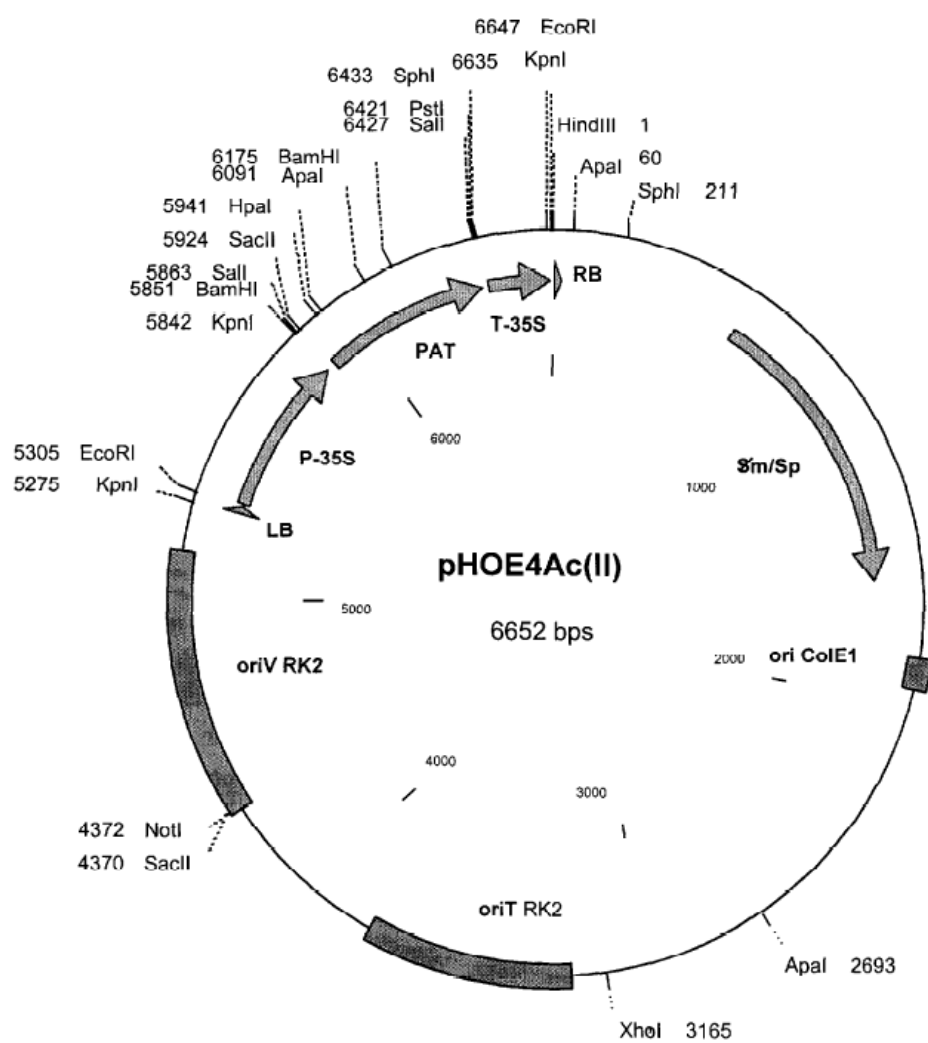
- 源自 Ti 质粒 pTiT37 的合成右边界序列

- 源自 Ti 质粒 pTiAch5 的合成左边界序列

- T-DNA 边界序列之间的嵌合 *pat* 基因。该嵌合基因由可起始转录的启动子序列、*pat* 基因的编码序列以及含有 3' 端不翻译区域 (终止子) 的片段 (提供转录终止和多腺苷酸化信号) 组成。启动子和终止子序列源自于花椰菜花叶病毒的 35S 转录产物 (Pietrzak *et al.*, Nucleic Acids Res. 14, (1986), pp 5857-5868)。

只有嵌合的 *pat* 基因和多接头序列位于边界序列之间。

a.) 载体 pHoe4/Ac(II)图谱



b.) pHoe4/Ac(II)遗传元件的描述

核苷酸位置	描述及参考文献
1—60	含土壤根癌农杆菌 Ti 质粒 pTiT37 右边界重复序列的人工合成 DNA
61—1841	来自含链霉素/壮观霉素腺苷酰转移酶基因的大肠杆菌 <i>E. coli</i> 质粒 R538-1 (第 619—1587 位) (Hollingshead and Vapnek, Plasmid 13, 17—30, 1985)
1842—2692	来自包括 ori ColE1 在内的人工合成的大肠杆菌 <i>E. coli</i> 载体 PiAN7 (第 1859 位) (Huang et al., Biotechnology 10, (1988), 第 269—283 页)
2693—3164	来自土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> Ti 质粒 pTiT37 (靠近第 60 位的 Apal 位点)
3165—5274	大肠杆菌 <i>E. coli</i> RK2 质粒的 OriV 和 oriT 区 (Figurski and Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), 第 1648—1652 页)
5275—5310	人工合成的土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> Ti 质粒 pTiAch5 左边界重复序列
5311—5840	pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (Pietrzak M et al., Nucleic Acids Res., 14, (1986), 第 5857—5868 页)
5841—5868	人工合成的多接头序列
5869 —6420	人工合成的 <i>pat</i> 基因 (绿棕褐链霉菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 的氨基酸序列) (Strauch et al., 1993, 欧洲专利 275957 B1)
6421—6440	人工合成的多接头序列
6441—6645	pDH51 载体的花椰菜花叶病毒 35S 终止子 (Pietrzak M et al., Nucleic Acids Res., 14, (1986), 第 5857—5868 页)
6646—6652	人工合成的多接头序列

**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 转基因油菜 T45 中插入的转基因位点序列的鉴定

3.2 转基因油菜 T45 的分子特征

3.3 油菜转化事件 T45 的整合稳定性的分子证据

3.4 油菜转化事件 T45 的转基因的表达分析

3.1 转基因油菜 T45 中插入的转基因位点序列的鉴定

转基因油菜 T45 是用 pHoe4/Ac(II)质粒、通过农杆菌介导的基因转化而产生的。转化的 pHoe4/Ac(II)质粒携带一个嵌合的 *pat* 基因构建体，赋予植物对除草剂草铵膦的抗性。

通过测定转基因油菜 T45 中插入的转基因 DNA 序列，将所获得的序列信息与推断出的 pHoe4/Ac(II)质粒序列比较，进而确定插入的序列。

转基因油菜 T45 的种子和野生型非转基因对照油菜 Ac Excel 的种子均种植在拜耳生物科技公司的温室里。播种 5 周之后，采收转基因油菜和非转基因对照油菜的叶片组织，之后直接将材料转移和冻存到液氮中。

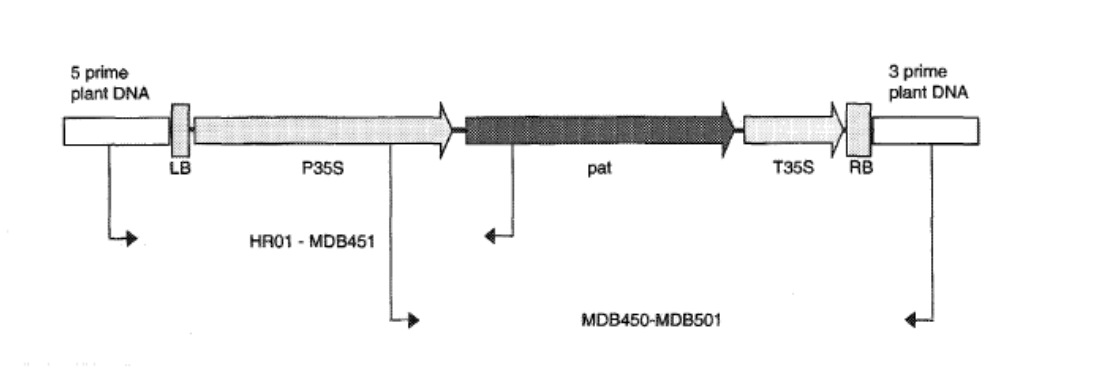
从转基因和非转基因油菜样品中提取基因组 DNA。利用已开发的差异 PCR 方案（D-PCR），确定转基因和非转基因油菜样品中是否存在转基因油菜 T45。

利用高保真 PCR 系统，扩增出两个重叠片段，它们代表了转基因油菜 T45 完整的插入序列（扩增策略见附图 1）。将这些片段交给 Eurogentec 公司（比利时 Seraing），用于序列测定。将获得的共有序列与推断出的 pHoe4/Ac(II)质粒序列比较。

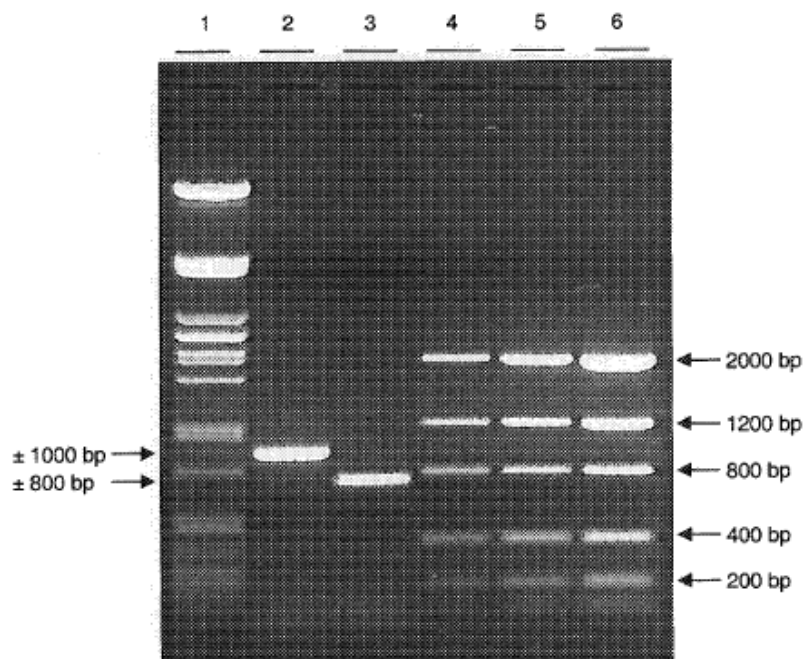
T45 插入序列与推断出的质粒 DNA 序列之间的任何差异，都重新扩增，然后测定 T45 插入序列和转化用质粒相关区域的序列，加以验证。

通过对转基因油菜T45中插入序列进行测序，确认存在一个拷贝的T-DNA。转基因油菜T45插入序列的DNA序列与相应的转化质粒DNA序列完全一致。插入序列长度为1364 bp（附图2）。

附图 1. 转基因油菜 T45 插入片段的扩增策略



片段	引物	在 pHoe4/Ac(II)中的位置	扩增片段长度（约）
BPC010-01	HR01	5'侧翼序列引物	±800 bp
	MDB451	6006→5985	
BPC010-02	MDB450	5754→5773	±1000 bp
	MDB501	3'侧翼序列引物	



附图 2. 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳分析

1:	λ DNA- <i>pst</i> I 酶切
2:	BPC010-02 片段 (MDB450-MDB501)
3:	BPC010-01 片段 (HRO1-MDB451)
4:	2 μ l 低分子量 DNA 分子量标准
5:	4 μ l 低分子量 DNA 分子量标准
6:	8 μ l 低分子量 DNA 分子量标准

附图 3. 转基因油菜 T45 插入序列 (1364 bp)

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

3.2 转基因油菜 T45 的分子特征

为了确认插入序列的拷贝数，对转基因油菜 T45 进行了分子特征的鉴定。

油菜 T45 的种子（种子批次 F5）和非转基因对照油菜的种子均种植在拜耳生物科技公司的温室里（比利时 Deinze）。每粒种子分别种在一个花盆中。通过标准的 Liberty-dot 鉴定分析法鉴定出表达 *pat* 基因的油菜。

播种四周之后，采收转基因油菜和非转基因对照油菜的叶片组织。将采收好的组织直接转移和冻存到液氮中。采集两份不同的叶片组织样品。

提取油菜基因组 DNA，用限制性切割酶消化基因组 DNA，根据分子量分离酶切片段，然后将酶切片段转移到薄膜上。用放射性元素标记的探针检测薄膜。清洗薄膜，去除游离的探针，然后进行放射自显影。通过分析转基因油菜 T45 和转化用质粒的各种酶切片段的杂交条带，来鉴定插入序列和确定插入拷贝的数量。

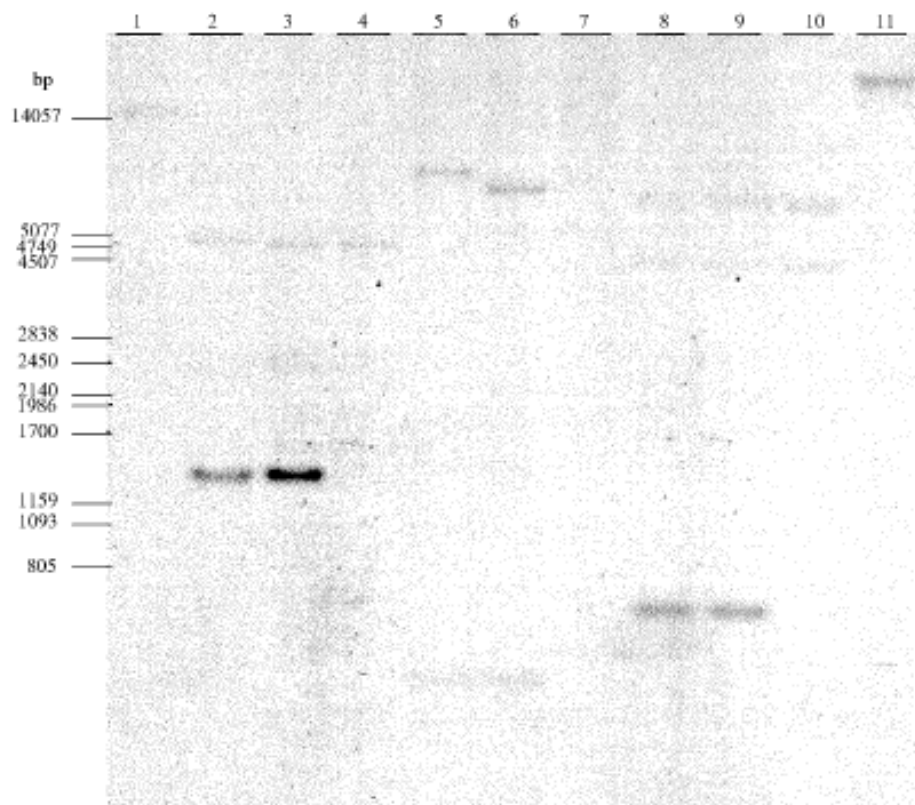
结果与讨论

Southern blot 所用的探针对于转基因油菜 T45 中的外源基因序列是特异的，它们不与非转基因油菜栽培种 AC Excel 中提取的 DNA 进行杂交（附图 4、5 和 6，第 4，7 和 10 泳道）。

在 Southern 印迹分析中用了 3 个探针（P35S，*pat* 和 *pat*-T35S），用各探针进行杂交时，DNA 阳性对照产生了预期大小的片段（附图 4、5 和 6），说明杂交是在探针可与靶序列杂交的条件下进行的。未经酶切消化的 T45 DNA 与用所用的各探针杂交时，观察到一条高分子量的片段，说明转基因序列整合到了油菜基因组 DNA 中（附图 4、5 和 6，第 11 泳道）。

结论

用转基因油菜 T45 进行 Southern 印迹杂交，获得的结果表明，植物基因组中转移的 DNA 与 pHoe4/Ac(II)质粒载体中的 DNA 构型一致。验证的区域为 pHoe4/Ac(II)质粒中的第 5305 位碱基至第 6647 位碱基（携带 *pat* 基因盒的 *EcoR* I 片段）。所获得的数据确切地表明，一个拷贝的基因盒被整合到了转基因油菜 T45 中。



附图 4. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-P35S 探针 (blot T45/01)

泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切

泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切

泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* I 酶切

泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切

泳道 5: T45, *BspE* I 酶切

泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *BspE* I 酶切

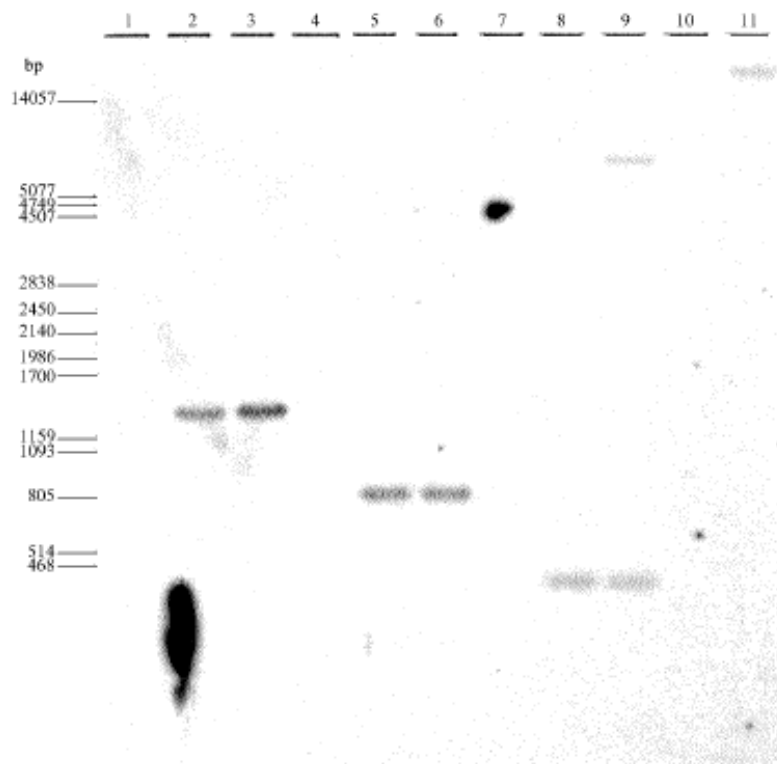
泳道 7: AC Excel 野生型, *BspE* I 酶切

泳道 8: T45, *Nco* I/*Hpa* I 酶切

泳道 9: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Nco* I/*Hpa* I 酶切

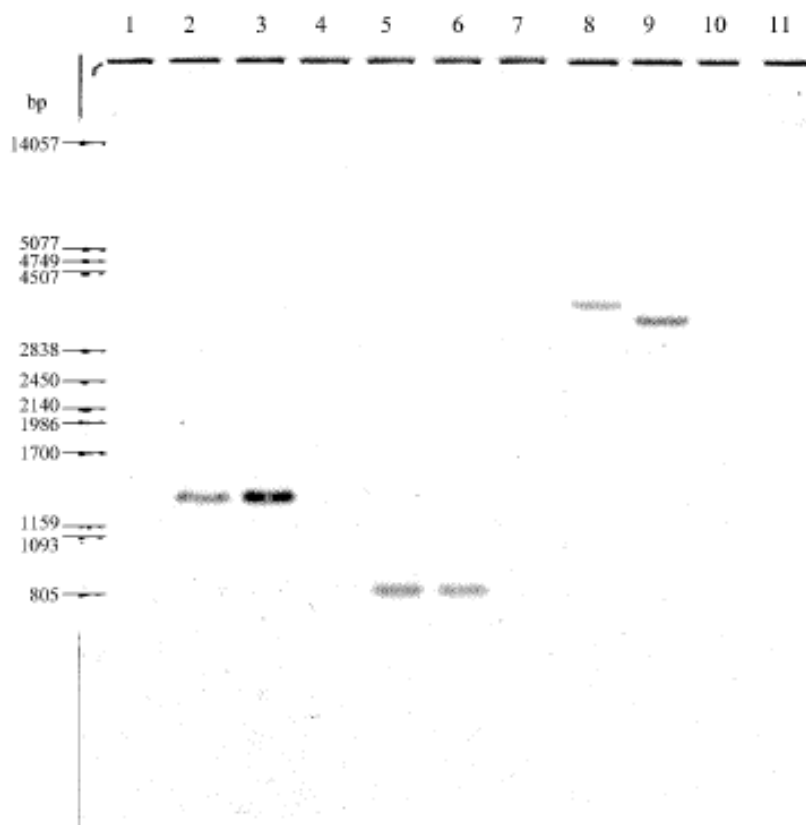
泳道 10: AC Excel 野生型, *Nco* I/*Hpa* I 酶切

泳道 11: T45, 未酶切



附图 5. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-*pat* 探针 (blot T45/02)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切
- 泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* I 酶切
- 泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切
- 泳道 5: T45, *Kpn* I 酶切
- 泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Kpn* I 酶切
- 泳道 7: AC Excel 野生型, *Kpn* I 酶切
- 泳道 8: T45, *Pvu* II 酶切
- 泳道 9: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Pvu* II 酶切
- 泳道 10: AC Excel 野生型, *Pvu* II 酶切
- 泳道 11: T45, 未酶切



附图 6. 转基因油菜 T45 Southern 杂交分析-*pat*-T35S 探针 (blot T45/03)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45, *EcoR* I 酶切
- 泳道 3: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* I 酶切
- 泳道 4: AC Excel 野生型, *EcoR* I 酶切
- 泳道 5: T45, *Kpn* I 酶切
- 泳道 6: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *Kpn* I 酶切
- 泳道 7: AC Excel 野生型, *Kpn* I 酶切
- 泳道 8: T45, *EcoR* V 酶切
- 泳道 9: AC Excel 野生型 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II), *EcoR* V 酶切
- 泳道 10: AC Excel 野生型, *EcoR* V 酶切
- 泳道 11: T45, 未酶切

3.3 油菜转化事件 T45 的整合稳定性的分子证据

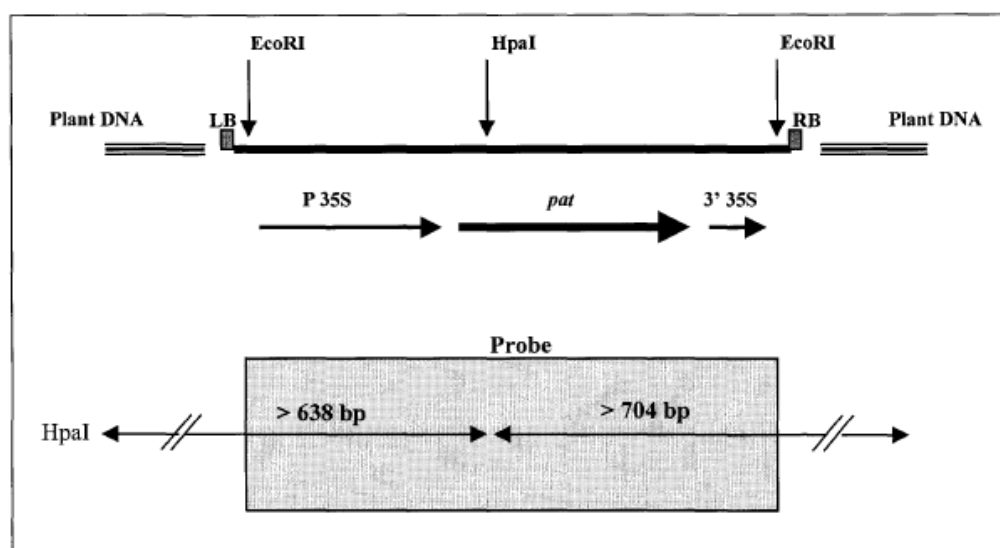
为了证明转基因油菜 T45 在多个世代中的稳定性,用含有 *pat* 基因盒的 1342 bp 的 *EcoR* I 酶切片段,进行了 Southern 印迹杂交分析。杂交策略的示意图列于附图 7 中。杂交结果列于附图 8 中。

我们用从非转基因品种 AC Excel 植株中制备的基因组 DNA 作为 DNA 阴性对照。用阴性对照来证实不存在背景杂交(见附图 8,第 5 和 11 泳道)。

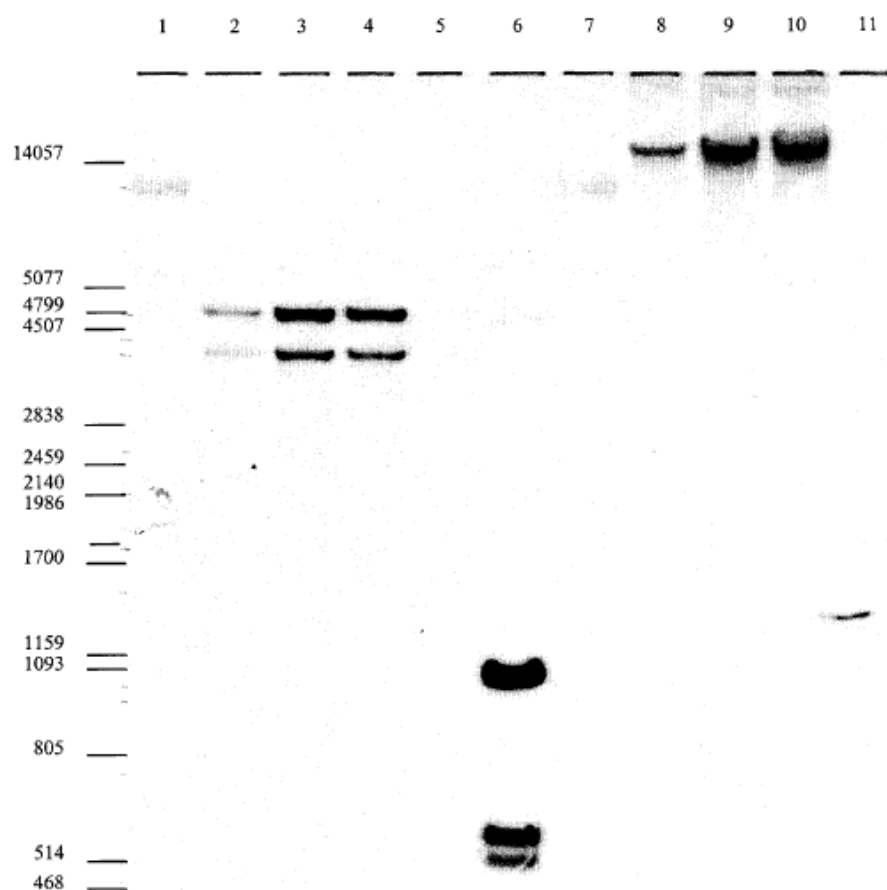
我们用从非转基因品种 AC Excel 植株中制备的基因组 DNA 加上大约 1 拷贝的 *EcoR* I 酶切消化的 pHoe4/Ac(II)、以及 1 拷贝的 *EcoR* I-*Hpa* I 双酶切消化的 pHoe4/Ac(II)作为 DNA 阳性对照。观察到预期大小的 1342 bp、704 bp 和 638 bp 的片段。这一对照表明,杂交是在可让探针与靶序列进行杂交的条件下进行的。

将 3 个世代的 T45 油菜用 *Hpa* I 酶切消化。这一限制性酶在转基因 T-DNA 中只有一个限制性识别位点(见附图 7)。将 *Hpa* I 酶切消化的 T45 基因组 DNA 与 1342 bp 的 *EcoR* I 酶切消化片段杂交,结果产生大小分别为 5100 bp 和 4500 bp 的两条杂交片段,分别代表的是转基因序列与 T-DNA 插入序列上游植物 DNA 序列之间的接合区,以及转基因序列与 T-DNA 插入序列下游植物 DNA 序列之间的接合区(见附图 8)。从不同世代的未经酶切消化的 T45 基因组 DNA 的 3 个泳道中,观察到高分子量的片段。

通过 Southern 印迹杂交分析,我们证明了:限制性酶对整合的 T-DNA 以及相邻的植物 DNA 进行了切割,所产生的转基因油菜 T45 的上游整合片段和下游整合片段,在测试的 3 个世代中是相同的。这些结果表明,转基因油菜 T45 在多个世代中,在基因组水平上保持稳定。



附图 7. 油菜 T45 的遗传稳定性分析的策略



附图 8. Southern 杂交分析 (探针: 1342 bp *EcoR* I 片段)

- 泳道 1: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 2: T45 (F5), pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I 酶切
- 泳道 3: T45 (F7), *Hpa* I 酶切
- 泳道 4: T45 (R2), *Hpa* I 酶切
- 泳道 5: 野生型, *Hpa* I 酶切
- 泳道 6: 野生型, *Hpa* I 酶切 + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I + 1 拷贝 pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I- pHoe4/Ac(II)-*EcoR* I/ *Hpa* I
- 泳道 7: λ DNA, *Pst* I 酶切
- 泳道 8: T45 (F5), 未酶切
- 泳道 9: T45 (F7), 未酶切
- 泳道 10: T45 (R2), 未酶切
- 泳道 11: 野生型, 未酶切

3.4 油菜转化事件 T45 的转基因的表达分析

利用 Northern 印迹杂交分析，在不同组织中分析了插入序列的表达量。

测试物、对照物质和标准物质

从转基因油菜 T45 (F5 代) 的叶片、茎、根和籽粒组织中提取的总 RNA，作为测试物。

从非转基因油菜 AC Excel 的叶片、茎、根和籽粒组织中提取的总 RNA，作为对照物。

体外合成的正义 *pat* RNA 转录产物系列稀释液加从野生型油菜叶片中提取的 RNA，用作证明所转入基因表达水平的标准物质。

Northern 印迹分析

转基因油菜 T45 和非转基因油菜 AC Excel 都种植在拜耳生物科技公司的温室里(比利时 Deinze)。收集油菜的叶片、茎和根组织，将它们直接转移到和冻存在液氮中。根据 Chomczynski 和 Sacchi (1987) 提出的改良单步 RNA 提取法分离出总 RNA。

为了分析 *pat* 基因的表达水平，我们扩增了一个特异的 T-DNA 片段，充当体外 RNA 合成所用的 DNA 模板。针对该模板，我们设计两个引物：一个是上游引物 (MDB404)，它是由与特异 T-DNA 序列相邻的 SP6 启动子(包括存在于转录产物 5'端的 6 个核苷酸 ggg.AgA) 组成；另一个是下游引物 (MDB403)，它是由与特异 T-DNA 序列相邻的 T7 启动子(包括存在于转录产物 5'端的 6 个核苷酸 gAATAC)组成。借助 Expand™高保真 PCR 系统(Boehringer Mannheim)，通过 PCR 合成体外 RNA 合成所用的 DNA 模板。利用 PCR 生成的模板和 Boehringer Mannheim 公司的 SP6/T7 转录工具包，制备高比活单链 RNA 探针。

利用 Ambion 公司(Ambion Inc., Austin, Texas, USA)提供的 Megascript™ SP6 和 T7 试剂盒，通过合成的 PCR 片段进行体外 RNA 分析。通过含有甲醛的变性琼脂糖凝胶电泳，将分子质量不同的 RNA 分离开。完成电泳后，通过毛细管洗脱立即将 RNA 从琼脂糖凝胶转移到尼龙膜(Hybond-N, Amersham)上(Sambrook *et al.*, 1989)。借助旋转瓶架，在杂交箱中实施杂交和清洗步骤。

结果与讨论

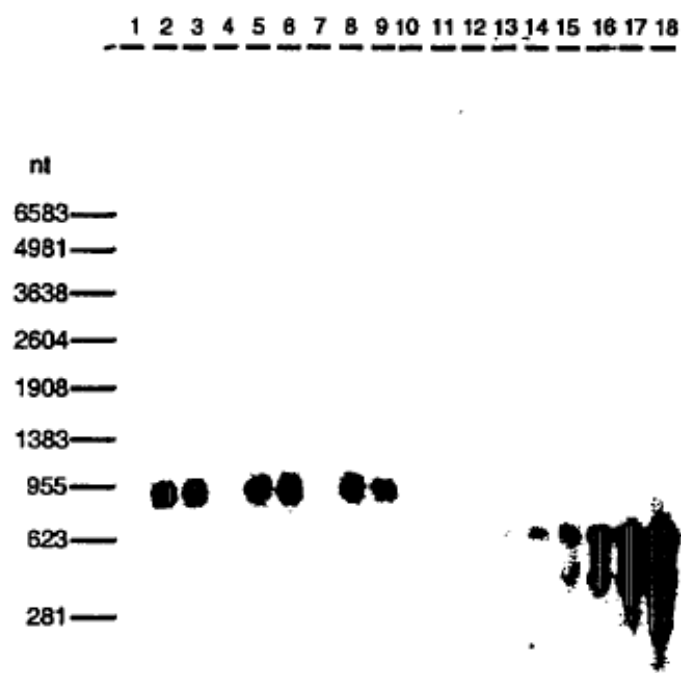
体外合成的*pat*基因转录体的系列稀释溶液与反义*pat*基因探针进行杂交(见附图9，第13~18泳道)。这就表明，Northern印迹杂交是在可与靶序列杂交的条件下进行的。

用测试物对应的非转基因样品进行杂交，没有获得杂交信号，表明不存在探针的背景杂交(见附图9，第4，7，10和12泳道)。用5 µg叶片总RNA(见附图9，第2和3泳道)和茎秆总RNA(见附图9，第5和6泳道)杂交，表明在100 ~ 200 ng 之间存在杂交信号(大小：约900个核苷酸)。这将相当于*pat*基因的表达水平为

20~40 pg/μg叶片总RNA或茎总RNA。用5 μg根的总RNA（见附图9，第8和第9泳道）进行杂交，表明从25~100 pg参比样品获得的杂交信号之间，存在一条杂交信号。这将相当于*pat*基因在根中的表达水平为5~20 pg/μg根总RNA。用5 μg T45的种子总RNA（见附图9，第11泳道）进行杂交，没有出现杂交信号。系列稀释浓度中可见的最低量相当于5 μg 叶片总RNA中含12.5 pg *pat*基因转录体。

尽管在收获的成熟种子中未检测到杂交信号，但是由于在收获的种子中可检测到约200 ng/g的PAT蛋白，因此预计在发育的种子中检测得到RNA。

自显影图如附图9所示。



附图 9. *pat* 基因在转基因油菜 T45 中的表达分析

从转化事件 T45 植株和非转基因植株 (AC Excel) 中提取总 RNA。每个泳道上样 5 μ g 总 RNA。

探针: 反义 *pat* 转录本 (T7 转录)

1. RNA 分子量标准 (G319, Promega)
2. 油菜转化事件 T45 叶片 RNA, 植物 A (RNA-T45-0197)
3. 油菜转化事件 T45 叶片 RNA, 植物 B (RNA-T45-0297)
4. 野生型 AC Excel 叶片 RNA (RNA-T45-0197C)
5. 油菜转化事件 T45 茎 RNA, 植物 A (RNA-T45-0397)
6. 油菜转化事件 T45 茎 RNA, 植物 B (RNA-T45-0497)
7. 野生型 AC Excel 茎 RNA (RNA-T45-0297C)
8. 油菜转化事件 T45 根 RNA, 植物 A (RNA-T45-0597)
9. 油菜转化事件 T45 根 RNA, 植物 B (RNA-T45-0697)
10. 野生型 AC Excel 种子 RNA (RNA-T45-0397C)
11. 油菜转化事件 T45 种子 RNA (RNA-T45-0797)
12. 野生型 AC Excel 种子 RNA (RNA-T45-0397C)
13. 野生型 AC Excel 叶片 RNA (RNA-T45-0197C) +12.5 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
14. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 25 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
15. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 50 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
16. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 100 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
17. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 200 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本
18. 野生型 AC Excel 叶片 RNA + 400 pg MDB403-MDB404 反义 *pat* 转录本

4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术（商业保密资料）

由于涉及商业保密资料，T45转化事件特异性定性与定量检测方法的详细信息在本公开版本中已删除

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

由于本申请用于进口转基因生物直接申请安全证书，所以不适用。

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）

由于本申请用于进口转基因生物直接申请安全证书，所以不适用。

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告

转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告请见下页《转 *pat* 基因抗草铵膦除草剂油菜 T45 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，其营养成分及抗营养因子分析报告等

食用安全性综合评价报告请见下页《转 *pat* 基因抗草铵膦除草剂油菜 T45 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油菜 T45 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告

一. 摘要

抗除草剂草铵膦的转基因油菜 T45（原称作 HCN28，是 T45 转化体的衍生品种）是由绿棕褐链霉菌（*Streptomyces viridomogenes*）Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因的合成基因转化而成的。*pat* 基因编码 PAT（膦丝菌素乙酰转移酶），该酶是乙酰化膦丝菌素的酶，PAT 酶通过乙酰化除草剂活性成分膦丝菌素上的游离氨基，防止机体自身中毒。它对高剂量的膦丝菌素、双丙铵膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性，这种基因修饰使草铵膦这种低残留、用于萌后的广谱除草剂可在转基因油菜 T45 的衍生品种的生产中施用，为油菜种植者提供杂草控制新选择。

转基因油菜 T45 是通过农杆菌转化介导的转化方法，将载体 pHoe4/Ac 转入油菜栽培种 AC Excel 而获得的。来自绿棕褐链霉菌的 *pat* 基因赋予植物对除草剂草铵膦的抗性。通过密码子优化的方法，合成了植物偏好的 *pat* 基因核苷酸序列，PAT 蛋白的氨基酸的序列保持不变。

受农业部委托，中国农业科学院油料所的农业部转基因油菜环境安全检测机构（筹）承担了转基因抗草铵膦油菜 T45 的环境安全检测工作，并于 2002 年 9 月至 2003 年 11 月根据农业部有关标准实施了试验。

用作加工原料的转基因油菜环境安全评估，是针对进口用作加工原料的转基因油菜籽在运输过程中撒落到田野或被误用作种子种植后，对农业生态环境可能存在的影响进行综合评估。评估的主要内容包括：生存竞争能力分析、花粉飘逸距离与异交率检测、对非靶标生物影响的测定。

环境安全检测结果表明：油菜 T45 与对照受体油菜及其他油菜栽培种相比，除了能够耐受除草剂草铵膦以外，在竞争性、杂草化能力、入侵性等方面没有显著差异，在所有试验点都没有增加种群的丰富度；T45 对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著影响，表明抗草铵膦 T45 与捕食者或有益的非靶标生物的互动上没有改变，对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

受农业部委托，中国疾病预防控制中心营养与食品安全所（食用安全检测单位）承担了转基因油菜 T45 的食用安全检测工作，检测指标为 90 天大鼠喂养和抗营养成分检测，实验时间为 2003 年 9 月至 2004 年 3 月。结果表明：将转基因油菜 T45 掺入饲料（比例为 5%），饲喂大鼠 90 天，动物活动和生长未见异常，被毛浓密光泽，转基因油菜籽 T45 和非转基因油菜受体和常规油菜对照比较，未发现转基因油菜对试验大鼠的体重、食物利用率、血液学指标、血生化指标、脏器比以及组织病理学观察有生物学意义的异常变化。油菜籽中芥酸和硫苷的含量在转基因和非转基因油菜中相近。

二. 背景介绍

抗除草剂草铵膦的转基因油菜 T45（原称作 HCN28，是 T45 转化体的衍生品种）是由绿棕褐链霉菌 *Streptomyces viridomogenes* Tü 494 菌株分离出来的天然 *pat* 基因的合成基因转化而成的。通过农杆菌转化介导的转化方法，将载体 pHoe4/Ac 转入油菜栽培种 AC Excel。来自绿棕褐链霉菌的 *pat* 基因赋予植物对除草剂草铵膦的抗性。通过密码子优化的方法，合成了植物偏好的 *pat* 基因核苷酸序列，PAT 蛋白的氨基酸的序列保持不变。

转基因油菜 T45 是通过农杆菌介导的转化方法将质粒 pHoe4/Ac(II) 中的 T-DNA 转入油菜受体 AC Excel 中的。通过农杆菌转化植物组织，用含有草铵膦的愈伤组织培养基筛选得到的愈伤组织。最后将筛选出来的愈伤组织转移至不含草铵膦的培养基上以使愈伤组织发育并成苗。将分离的幼苗转移至温室，作进一步鉴定。

pat 基因编码 PAT（膦丝菌素乙酰转移酶），该酶是乙酰化膦丝菌素的酶，PAT 酶通过乙酰化除草剂活性成分膦丝菌素上的游离铵基，防止机体自身中毒。它对高剂量的膦丝菌素、双丙铵膦（bialaphos）或草铵膦有完全的抗性，这种基因修饰使草铵膦这种低残留、用于萌后的广谱除草剂可在转基因油菜 T45 的衍生品种的生产中施用，为油菜种植者提供杂草控制新选择。

草铵膦是一种非选择性除草剂，对许多阔叶类和禾本科杂草具有有效的萌后控制。草铵膦通过抑制谷氨酰胺合成酶而导致植物体内氨的植物毒性水平累积，最终达到控制杂草的目的。谷氨酰胺合成酶催化谷氨酸和氨合成谷氨酰胺，该酶是植物体内唯一的、可以对光呼吸、硝酸盐还原作用和氨基酸降解过程产生的氨进行解毒作用。

抗草铵膦转基因油菜将为油菜种植者提供一种新的杂草管理工具。草铵膦目前已经作为一种非选择性除草剂在加拿大和美国登记，可在农作物或非农作物上施用。草铵膦可进行高度生物降解，无残留活性并对人体和野生动物具有极低的毒性。

油菜品种抗草铵膦的使用使得种植者转向高效的农业生产耕作，包括减少广谱除草剂的总施用剂量，减少了用于杂草防治的耕作，同时草铵膦代表了一种独特的作用方式，为种植者提供了一种新型的交替防治杂草的选择，以减少抗性杂草的发生率。

在加拿大及美国主要种植区农民们将会种植 T45 的衍生油菜品种。在生产区收获的农产品或种子将作为原材料在国内或出口到国外进行加工。菜籽油和菜籽粕是其主要的产品，加工后可以分别用于人类食品和动物饲料。这些油菜品种是“双低”品种，菜籽油中的芥酸含量和加工菜籽粕中硫苷含量均低，从而提高了品质。由于国际农产品贸易的进行，在不久的将来中国也会用到经 T45 原料加工得到的食品和饲料。

三. 受体生物学特性

受体植物为甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) ($2n=38$, aacc) 是由甘蓝 (*B. Oleracea* L.) ($2n=18$, cc) 与芸薹 (*B. campestris* L.) ($2n=20$, aa) 自然杂交异源多倍化后进化而来的。甘蓝型油菜属于十字花科 (*Cruciferous*)、芸薹族 (*Brassicaceae*)、芸薹亚族 (*Brassicinae*)。

在欧洲和亚洲都已经发现野生种油菜,但是准确的发源地(或者是地中海地区,或者是北欧地区)尚不清楚。公元前 2000 年到 1500 年的一些梵语著作直接描述了油菜的形态。古代亚洲和地中海地区的一些居民就有用菜籽油进行照明的记录,后来又被用作食用油。早期的记录显示油菜籽早在 3000 多年前的印度就已有种植。然后又在公元前后被引入中国和日本。

中国、印度、欧洲和加拿大是目前最主要的油菜种植国家,其他国家和地区如美国、南美洲和澳大利亚也是可以种植油菜,近几年种植面积和年产量大幅增加。油菜是中国的主要油料作物之一,分布极为广泛,几乎遍及全国各地。北至黑龙江省大兴安岭地区,南迄海南岛,西起新疆维吾尔自治区克孜勒苏柯尔克孜自治州的乌恰县,东抵沿海各省,从平原到海拔 4630m 的西藏高原都有油菜栽培。

甘蓝型油菜属于喜冷作物,其中冬油菜品种生长发育对温度反应敏感,分为:冬性、半冬性和春性,而对长日照反应不敏感;春油菜对温度反应均为春性,对长日照反应敏感,按强弱分为敏感型和不敏感型。冬油菜不经过一定时间的低温就不能通过春化,就不能开花、结实。春油菜不满足长日照要求也不能开花、结实。

油菜具有广泛的适应性,但对逆境的反应,因油菜类型和品种不同而有显著差异。一般来讲,甘蓝型油菜具有广泛的适应性,但在干旱、无霜期短和气温较高的地区较难适应。甘蓝型油菜植株在春油菜区一般难以越冬,在冬油菜区则难以越夏。

油菜 T45 转化用受体品种为 AC Excel。

四. 基因操作

转基因油菜 T45 是通过农杆菌介导的转化将质粒 pHoe4/Ac(II)中的 T-DNA 转入油菜受体 AC Excel 中的。通过农杆菌转化植物组织,用含有草铵膦的愈伤组织培养基筛选得到的愈伤组织。最后将筛选出来的愈伤组织转移至不含草铵膦的培养基上以使愈伤组织发育并成苗。将分离的幼苗转移至温室,作进一步鉴定。

质粒 pHoe4/Ac(II)基本上是通过载体 pPCV002 获得的,它包括以下结构元件:

- 质粒的核心部分: 包含来自合成的大肠杆菌载体 PiAN7, 使质粒能在大肠杆菌中复制的复制起始点; 以及来自载体 RK2, 使质粒能在农杆菌中复制的 oriV 和 oriT 区域。

- 选择标记基因：源自含有可表达抗链霉素和壮观霉素的蛋白的链霉素/壮观霉素乙酰转移酶基因的大肠杆菌质粒 R538-1，可供在大肠杆菌和农杆菌中增殖和筛选质粒。

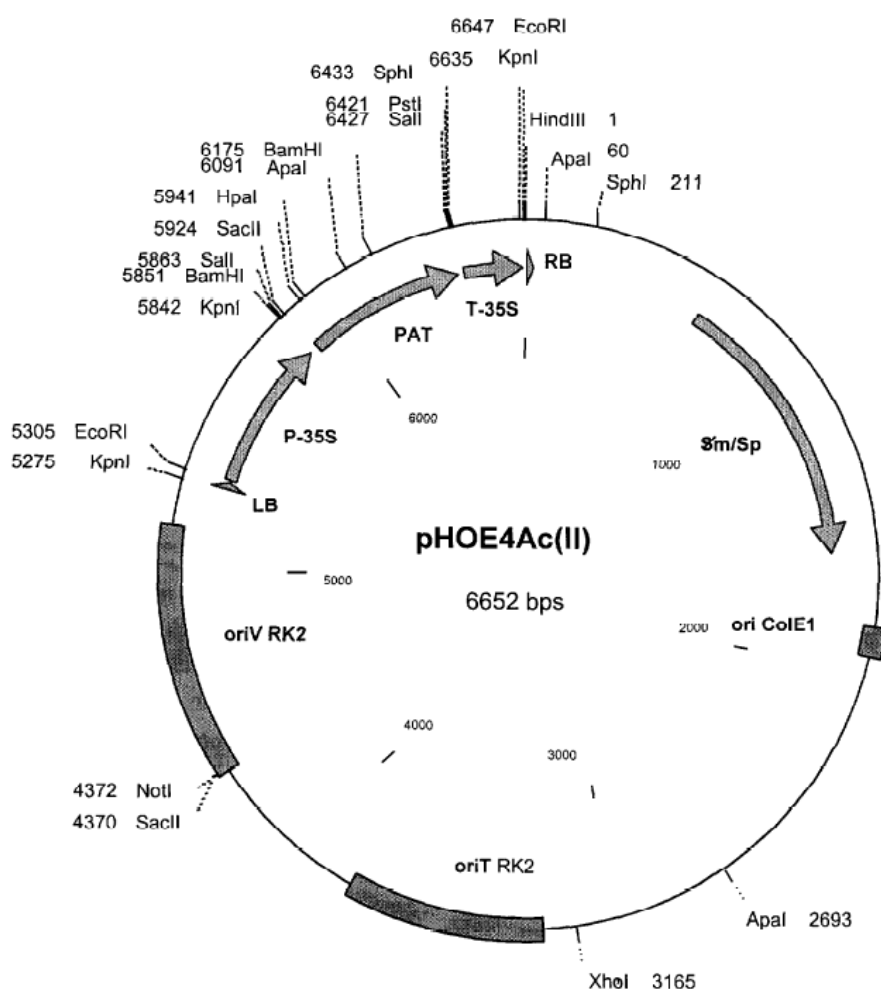
- 源自 Ti 质粒 pTiT37 的合成右边界序列

- 源自 Ti 质粒 pTiAch5 的合成左边界序列

- T-DNA 边界序列之间的嵌合 *pat* 基因：该嵌合基因由以下几部分组成，即可启动转录的启动子序列、*pat* 基因的编码序列以及含有 3'端非翻译区域（终止子）的片段（提供转录终止和多腺苷酸化信号）。启动子和终止子序列源自于花椰菜花叶病毒的 35S 转录产物。

只有嵌合的 *pat* 基因和多接头序列位于边界序列之间。

pHoe4/Ac(II)图谱见下：



五. 遗传稳定性

为了证明转基因油菜 T45 在多个世代中的稳定性,用含有 *pat* 基因盒的 1342 bp 的 *EcoR* I 酶切片段,进行了 Southern 印迹杂交分析。

通过 Southern 印迹杂交分析,我们证明了:限制性酶对整合的 T-DNA 以及相邻的植物 DNA 进行了切割,所产生的转基因油菜 T45 的上游整合片段和下游整合片段,在测试的 3 个世代中是相同的。这些结果表明,转基因油菜 T45 在多个世代中,在基因组水平上保持稳定。

对油菜 T45 衍生的育种品系的分离分析,结果表明:插入的构建以孟德尔单基因模式进行分离。

六. 环境安全评价

生存竞争能力

中国农业科学院油料所于 2002 年 9 月-2003 年 11 月在武汉市汉南区汉南农场八支沟、青海省乐都县高店良种繁育场和农科院油料所试验农场开展了转基因油菜 T45 的生存竞争能力风险检测。

检测结果显示:转基因油菜和非转基因油菜品种的发芽率、芽势和休眠性,无显著差;不同播期的生育期调查结果表明,转基因油菜 T45 与其他对照品种相似;通过对转基因油菜和非转基因油菜对非靶标除草剂抗性的检测,检测结果显示,二者间没有显著差异,对不同非靶标除草剂的抗、感性趋势相似;通过检测油菜的生存适合度,可以从种群生态角度评价各个品种的生存竞争能力强弱,通过本项检测可以看出甘蓝型油菜的适合度较低,转基因品种的生存适合度与非转基因油菜品种间虽然存在差异,但未检测到转基因明显改变品种的生存适合度。因此,本检测结果显示转基因油菜 T45 的生存竞争能力与非转基因油菜相当,未检测到有明显提高。

生物多样性

PAT 蛋白在根、叶、芽和种子中组成型表达。在种子的表达水平每克种子组织从 150 到 223 ng/g。在茎的组织中和花粉提取的蛋白中没有测定到有 PAT 蛋白。

田间的扩大观察已确认,抗草铵膦油菜 T45 与受体在表现型、对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著区别,这表明油菜 T45 与捕食者或者有益的非靶标生物的相互作用上没有改变。

王国平、张国安和姜道宏登(2003)检测抗草铵膦油菜 T45 对生物多样性影响,认为该油菜对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

基因飘移

T45 油菜品种花粉对普通甘蓝型油菜品种的天然异交率为 3% 以下,通过空间隔离、时间隔离和设置保护行,可以显著降低异交的发生。对于一般油菜生产

田，设置 10 米宽的保护行外加 400 隔离带，可以基本防止异交导致的转基因扩散。油菜 T45 与其他物种（甘蓝、白芥、新疆野油菜、诸葛菜、菘蓝等）很难杂交。

七. 食用安全评价

营养成分

拜耳作物科学（加拿大）公司对转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 及对应的非转基因品种 A 进行了田间测试。试验在加拿大主要的油菜种植区萨斯喀彻温省和亚伯达省的 6 个不同的试验点进行。这一研究中的植株种植于通常的生产实践条件下。

收集未加工的农产品籽粒，将转基因油菜 T45、栽培种 SW Flare 及对应的非转基因品种 A 的样品运往 Eurofins Scientific Inc.和加拿大拜耳作物科学公司的油菜分析中心，用于分析其组成成分。

从 Liberty 处理的油菜 T45 植株以及未用 Liberty 处理的油菜 T45 植株所获得的种子中，常规成分、纤维化合物、矿物质、生育酚、抗营养物、总氨基酸和总脂肪酸含量与对应的非转基因油菜 A 的植株所获得的种子中的含量十分一致。发现计算出的转基因油菜和非转基因油菜的平均值的差异超过 20%（即，钠、铁、 α -生育酚、MSGF 和吡啶类硫苷、硬脂酸、亚麻酸和芥酸）的情况，则这是由于：出现一些极端值引起的（即铁和芥酸），或者只在一个转基因样品组是这样，要么是草铵膦处理的样品组要么是未用草铵膦处理的样品组（即铁、硬脂酸和芥酸），或者总的参数不是这样（即总生育酚和总糖苷）。因此，油菜 T45 的营养成分与常规油菜相当。

在 2004 年，由中国疾病预防控制中心委托农业部油料及制品质量监督检验测试中心，对转基因油菜 T45 和非转基因油菜对照的抗营养因子进行检测。检测结果显示二者的值相近。

毒理学评价

磷丝菌素乙酰转移酶基因（*pat*）的供体生物是绿棕褐链霉菌。该供体生物已知不是毒素的产生者，是一种土壤中的放线菌，因此是广泛存在于土壤环境中的。没有任何与这种绿棕褐链霉菌相关的负面报道。

利用计算机模拟方法，对来源于 *pat* 基因的 PAT 蛋白与公共蛋白质数据库中的已知毒素进行比对，评价它们在氨基酸序列上是否存在潜在相似性。与预期的一样，用来源于 *pat* 基因的 PAT 蛋白进行的整体同源性检索，结果表明该蛋白仅与各种细菌来源的其他乙酰转移酶存在主要的相似性。

大肠杆菌中表达的、由 *pat* 基因编码的 PAT/*pat* 蛋白在模拟的人体胃液中培养 0.5~60 min 后，测试了 PAT 蛋白的消化稳定性。在 0.5 min 内，90% 以上的 PAT/*pat* 蛋白降解。

C57BL/6J 小鼠按 2000 mg/kg 体重的剂量标准急性口服 PAT/*pat* 蛋白后，尸检前，小鼠没有死亡或者出现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。因此，按照 2000 mg/kg 体重的剂量标准，通过口服途径给雄/雌 C57BL/6J 小鼠饲喂 PAT/*pat* 蛋白后，均未表现出任何系统毒性。

中国疾病预防控制中心所进行的 90 天大鼠喂养试验结果也表明：90 天大鼠喂养未发现 T45 对大鼠体重、食物利用率、血液学指标、血生化指标、脏体以及组织病理学观察由生物学意义改变。

致敏性评价

PAT 蛋白通常不表现与食物过敏原相关的特性。该蛋白很容易在胃液中降解。它不具有糖基化部位。它与过敏原蛋白没有同源性。*pat* 基因的供体生物不是食物过敏原。

PAT 蛋白的氨基酸和已知的过敏原蛋白进行了同源性分析。全部的的同源性检索的结果表明 PAT 蛋白与已知的过敏原没有同源性。

造成某些食物蛋白质过敏性的另一个重要的因子，是它们在食物中的高含量（Taylor 等，1987；Taylor，1992；Fuchs 和 Astwood，1996）。多数过敏原在特定的食物中都是作为主要的蛋白质成分存在的，表现为从全部蛋白质的2-3%到80%（Fuchs 和 Astwood，1996）。而PAT 蛋白质在抗草铵膦油菜T45中只以极低的水平存在，对人类健康的影响很小。此外，体外消化性的评价也都表明，PAT蛋白在模拟胃液中迅速被消化降解。

八. 非预期效应

从大量现有的油菜 T45 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 T45 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用的安全监控措施

作为转基因油菜 T45 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，会要求贸易商采取相关措施来保证转基因油菜 T45 进口过程中的安全，包括：遵守相关法律法规；包装要牢固，标识要清楚；运输各环节严格操作；对贸易商不定期监测；必要时，向贸易商提供技术指导和支持。

十. 结论

总之，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环境安全、食用安全检测结果均表明油菜 T45 在环境、食用方面的安全性，未发现可预期的风险。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况

抗草铵膦除草剂油菜 T45 是由拜耳作物科学公司通过农杆菌介导的转化获得的。含 T45 的油菜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 T45 油菜转基因安全证书的目的在于进口用作加工原料。中国是世界上的油菜主要种植国家，也是油菜消费主要国家。

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。

进口过程中拟采取的安全防范措施

作为转基因油菜 T45 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油菜 T45 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：在转基因油菜 T45 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。

11.审查所需的其它相关资料

在本申报书中除了正文所提及的用于安全评价的数据资料外，我公司将这些数据的研究报告作为附件提供。考虑到文件较多，为了审阅方便，会在申报书正文后面单独提供。

附件目录

（技术报告为商业保密材料）

- 附件 1: 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告（生存竞争能力的检测）——中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 2: 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告（与油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率的检测）——中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 3: 转基因油菜 T45 食用安全检测报告——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所
- 附件 4: 转基因油菜 T45 油菜籽检验报告——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所
- 附件 5: 转基因油菜 T45 中插入转基因位点序列的鉴定
- 附件 6: 转基因油菜 T45 的分子特征
- 附件 7: 双元植物转化载体 pHoe/Ac(II)的描述
- 附件 8: 油菜转化事件 T45 的转基因的表达分析
- 附件 9: 油菜转化事件 T45 的整合稳定性的分子证据
- 附件 10: 油菜 T45 转基因位点的描述
- 附件 11: 大肠杆菌和油菜 T45 中表达的 PAT/*pat* 蛋白的结构和功能的等同性分析
- 附件 12: *pat* 基因产物——膦丝菌素乙酰转移酶（PAT）的热稳定性研究
- 附件 13: PAT/*pat* 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索
- 附件 14: PAT/*pat* 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验
- 附件 15: 抗草铵膦油菜 T45 与其非转基因对照的营养成分分析

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

加拿大食品检验署（CFIA）批准文件

植物卫生和生产分部

植物生物安全办公室

决定文件 DD96-11:

对安万特加拿大公司抗草铵膦油菜品系 HCN28 环境安全性的决定

制定本决定文件的目的是在 Dir94-08 *确定新性状植物环境安全性的评估准则*及其随同文件 Dir94-09 *油菜 (油菜/油菜籽) 生物学指导*下达成的对管理决定的解释说明。

植物卫生和生产分部植物生物技术办公室已经对安万特公司提交的关于抗草铵膦油菜品系的信息进行了评估。这些部门已经确定，同目前在加拿大已经商品化的油菜品种相比，这些具有新性状的植物不会改变对环境的相互作用。

因此可认为，将 **HCN28** 及其衍生品系，但不具有任何其它导入的新性状的油菜品系自由投放入环境中是安全的。

本公告由加拿大食品检查局植物卫生和生产分部发布，如需更多信息请联系植物生物安全办公室：

植物卫生和生产分部

加拿大食品检验署

59 Camelot Drive

Nepean, 安大略, K1A 0Y9

电话: (613)225-2342

传真: (613) 228-6629



Canadian Food
Inspection Agency

Agence canadienne
d'inspection des aliments



Plant Health and Production Division,
Plant Biosafety Office

*Decision Document DD96-11:
Determination of Environmental Safety of AgrEvo
Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant
Canola Line HCN28*

This Decision Document has been prepared to explain the regulatory decision reached under the guidelines Dir94-08 *Assessment Criteria for Determining Environmental Safety of Plants with Novel Traits* and its companion document Dir94-09 *The Biology of Brassica napus L. (Canola/Rapeseed)*.

The Plant Biotechnology Office of the Plant Health and Production Division has evaluated information submitted by AgrEvo Canada Inc. regarding a glufosinate ammonium-tolerant canola line. They have determined that this plant with novel traits does not present altered environmental interactions when compared to currently commercialized canola varieties.

Unconfined release into the environment of HCN28 and other *B. napus* lines derived from it, but without the introduction of any other novel trait, is therefore considered safe.

This bulletin is published by the Plant Health and Production Division, Canadian Food Inspection Agency. For further information, please contact the Plant Biosafety Office at:

Plant Health and Production Division
Canadian Food Inspection Agency
59 Camelot Drive
Nepean, Ontario, K1A 0Y9
Tel: (613) 225-2342
Fax: (613) 228-6629

加拿大卫生部 (**Health Canada**) 批准文件

新的食品信息-食品生物技术

抗草铵膦油菜 (T45)

加拿大卫生部已经通知安万特加拿大公司，同意将由转基因油菜品系 T45 中提炼出来的精炼油，用作食品。依照《*新型食品安全性评估准则*》(1994 年 9 月)，该部门对转基因油菜品系 T45 进行了全面评估。这些准则是以国际公认的用于确定由转基因生物加工成的食品的安全性的原则为基础的。

所制定的此食品信息新文件是为了总结由加拿大卫生部卫生保健分部食品理事会提供的有关产品的鉴定意见。这项鉴定是根据《*新型食品的安全性评估准则*》，对申请者提交的信息进行全面评估而做出的。

要知道更多的信息，请与我们联系：

食品生物技术办公室
食品理事会
卫生保健分部
加拿大卫生部
Tunney 牧场
渥太华，安大略省 KIA012

电话：(613) 941-5535
传真：(613) 952-6400



NOVEL FOOD INFORMATION - FOOD BIOTECHNOLOGY

GLUFOSINATE AMMONIUM TOLERANT CANOLA (T45)

Health Canada has notified AgrEvo Canada Inc. that it has no objection to the food use of refined oil from canola lines derived from the genetically modified canola transformant designated T45, which is resistant to glufosinate ammonium. The Department conducted a comprehensive assessment of T45 derived canola lines according to its *Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods* (September, 1994). These guidelines are based upon internationally accepted principles for establishing the safety of foods derived from genetically modified organisms.

This Novel Food Information document has been prepared to summarize the opinion regarding the subject product provided by the Food Directorate, Health Protection Branch, Health Canada. This opinion is based upon the comprehensive review of information submitted by the petitioner according to the *Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods*.

(Également disponible en français)

For further information, please contact:

Office of Food Biotechnology
Food Directorate
Health Protection Branch
Health Canada
Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario K1A 0L2

Telephone: (613) 952-5137
Facsimile: (613) 952-6400

加拿大农业部批准文件

加拿大农业和农业食品部
食物生产和检测局

食品检测理事会
植物产品处

59, Camelot Drive

Nepean, Ontario

K1A 0Y9

电话: (613) 952-8000

传真: (613) 992-5219

1996 年 5 月 6 日

Conor Dobson 先生

经理, Government Affairs

Agrevo Canada Inc.

1600 James Naismith Drive

Gloucester, Ontario K1B 5N4

传真: 613-748-5728

亲爱的 Dobson 先生:

我们已经审阅了您们关于转基因甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 品种 HCN28 的田间无限制释放的申请。这些植物由于基因导入而对除草剂草铵膦。

根据您们提供的资料, HCN28 的无限制释放没有环境安全性问题, 因而被加拿大批准。

关于 HCN28 和其它用相同基因转化的甘蓝型油菜春季品种及其它们的后代的批准授权是基于不进行品种间杂交、使用目的相似而且它们未呈现有其它新的额外的性状。

不管在任何时候, 贵公司察觉到由于品种释放而对环境包括人畜健康有潜在的危险, 应当立即将这些信息提供给我们办公室。

请注意, 虽然确定这些带新性状的植物品种的环境安全性是这类品种商品化的关键步骤, 其它一些要求也要考虑在内, 包括加拿大卫生局的食物安全性评估, 加拿大农业和农业食品局的品种注册。我们将会通知该决议省代理机构。

该决议的判决书进行了理论说明并将会公开。我们将会通知各省代理机构。如果您想索取关于该批准的更详细资料, 请打电话给 Anne-Christine Bonfiles (分机号是 5325)

您忠诚的

Glenn Hansen

主管



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

RECEIVED

JUN 10 1996

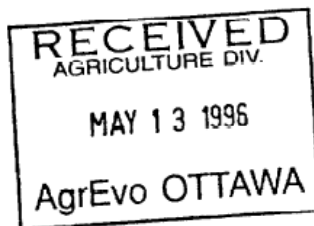
REGULATORY
AgrEvo - Regina

Your file Votre référence

Our file Notre référence

May 6, 1996

Mr. Conor Dobson
AgrEvo Canada Inc.
Manager, Government Affairs
213-1600 James Naismith Drive
Gloucester, Ontario
Fax (613) 748-5728



3625-6-10H1

1(1)

C016976

Dear Mr. Dobson:

We have reviewed your application for unconfined field release of the canola (*Brassica napus*) line HCN28. These plants have been transformed with a gene that confers tolerance to the herbicide glufosinate ammonium.

On the basis of the information provided to us, the unconfined release of HCN28 should not pose any concern to environmental safety, and is therefore authorized in Canada.

The present authorization relates to HCN28, all other *Brassica napus* spring varieties resulting from the same transformation event, and 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, including risk to animal or human health, 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 may need to be addressed, including a feed safety assessment by Agriculture and Agri-Food Canada, a food safety assessment by Health Canada, and Variety Registration 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 Anne-Christine Bonfils at extension -5325.

Yours sincerely,

Glen Hansen
Director

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

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

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

附件目录

（技术报告为商业保密材料）

- 附件 1:** 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告（生存竞争能力的检测）——中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 2:** 转基因油菜品种 T45 环境安全检测报告（与油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率的检测）——中国农业科学院油料作物研究所
- 附件 3:** 转基因油菜 T45 食用安全检测报告——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所
- 附件 4:** 转基因油菜 T45 油菜籽检验报告——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所
- 附件 5:** 转基因油菜 T45 中插入转基因位点序列的鉴定
- 附件 6:** 转基因油菜 T45 的分子特征
- 附件 7:** 双元植物转化载体 pHoe/Ac(II)的描述
- 附件 8:** 油菜转化事件 T45 的转基因的表达分析
- 附件 9:** 油菜转化事件 T45 的整合稳定性的分子证据
- 附件 10:** 油菜 T45 转基因位点的描述
- 附件 11:** 大肠杆菌和油菜 T45 中表达的 PAT/*pat* 蛋白的结构和功能的等同性分析
- 附件 12:** *pat* 基因产物——膦丝菌素乙酰转移酶（PAT）的热稳定性研究
- 附件 13:** PAT/*pat* 蛋白与已知毒素的氨基酸序列同源性检索
- 附件 14:** PAT/*pat* 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验
- 附件 15:** 抗草铵膦油菜 T45 与其非转基因对照的营养成分分析

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

油菜是一种人们熟知的作物，几个世纪以来被用于食品和饲料。转基因油菜是一种“双低”品种，由此生产的菜籽油的芥酸含量和加工菜籽饼粕中硫苷含量均低，从而提高了品质。

抗除草剂草铵膦转基因油菜T45是通过农杆菌转化介导的转化方法而获得，转化方法不会改变受体油菜的安全性；*pat*基因的供体生物为绿棕褐链霉菌 *Streptomyces viridomogenes*，在自然界广泛存在，无致病性和致敏性；用Southern印迹杂交的方法，证明了一个拷贝的基因盒整合到了转基因油菜T45植物基因组中，并且在多世代中证明了遗传的稳定性；PAT蛋白的氨基酸序列与已知毒素和过敏原的氨基酸序列无相似性；用高剂量的PAT蛋白灌胃小鼠，未观察到不良影响；油菜T45的营养成分与非转基因油菜是实质等同的；在生存竞争能力、基因漂移和对生物多样性的影响方面，油菜T45与非转基因油菜无显著差异。

综上所述，所有转基因油菜 T45 的安全性评价数据均支持该油菜对人类健康及环境没有不良影响的结论。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

（盖章）

八、本单位审查意见

抗草铵膦转基因油菜将为油菜种植者提供一种新的杂草管理工具，使得种植者转向高效的农业生产耕作，包括减少广谱除草剂的总施用剂量，减少了用于杂草防治的耕作，同时草铵膦代表了一种独特的作用方式，为种植者提供了一种新型的交替防治杂草的选择，以减少抗性杂草的发生率。

转基因油菜 T45 对除草剂草铵膦具有抗性。大量的安全性评价数据说明，油菜 T45 对人类健康和生态环境是安全的。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

（盖章）

九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见
（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）

不适用，本申请为进口用作加工原料的安全证书申请。