

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价

申 报 书

转 *bar*、*barnase* 和 *barstar* 基因抗除草剂油菜 Ms1Rf1
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 *bar*、*barnase* 和 *barstar* 基因抗除草剂油菜 Ms1Rf1 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 100022 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。
8. 申报书应当用中文填写，一式十份，一律使用 A4 纸，正文用小四宋体打印，标准字间距和单倍行距，并提供光盘。对于不符合要求的申报书，不予受理。
9. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。
10. 受理时间：每年 3 次，截止日期分别为 3 月 1 日、7 月 1 日和 11 月 1 日。
11. 受理单位：农业部行政审批综合办公室科教窗口。地址：北京市朝阳区农展馆南里 11 号。邮政编码：100125。收款单位：农业部科技发展中心；开户行：中信银行北京朝阳支行；帐号：7111110189800000419。

目 录

附 件 目 录.....	I
公司名称声明.....	II
商业保密资料声明	III
一、 申请表.....	1
二、 项目内容摘要	3
三、 工作目的和意义	5
四、 国内外研究的相关资料	7
五、 安全性评价	9
六、 相关附件资料	56
七、 本单位农业转基因生物安全小组审查意见	84
八、 本单位审查意见	85
九、 所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见	86

附 件 目 录

(商业保密信息)

国内检测报告

附件 1: 转基因油菜环境安全检测报告 (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: 转基因油菜环境安全检测报告 (对生物多样性影响检测) ——华中农业大学

附件 4: 转基因油菜 Ms1Rf1 及其产品食用安全检测报告 (抗营养因子检测) ——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 Ms1Rf1 食品安全检测报告 (大鼠 90 天喂养) ——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

拜耳作物科学公司内部报告

附件 6: Ms1 和 Rf1 分子特性鉴定报告

附件 7: Ms1 插入序列和插入位点分析

附件 8: Rf1 插入序列和插入位点分析

附件 9: 雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 和 Rf2 中新基因的表达水平检测

附件 10: 雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 的农艺性状评估

附件 11: PAT/bar 蛋白与已知毒素和过敏原的氨基酸序列同源性检索

附件 12: PAT/bar 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 13: PAT/bar 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 14: bar 基因的产物 PAT/bar 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 15: Barnase 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: Barstar 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 17: bar 基因的产物 PAT/bar 蛋白的热稳定性试验

附件 18: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barnase 蛋白的热稳定性

附件 19: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barstar 蛋白的热稳定性

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*bar*、*barnase*和*barstar*基因抗除草剂油菜Ms1Rf1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Ms1Rf1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 <i>bar</i> 、 <i>barnase</i> 和 <i>barstar</i> 基因抗除草剂油菜 Ms1Rf1 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□		植物 <input checked="" type="checkbox"/>	微生物□ (选√)		
	转基因生物名称		抗除草剂油菜 Ms1Rf1				
	受体生物	中文名	油菜(甘蓝型)		学名	<i>Brassica napus L. Oleifera</i>	
		分类学地位	十字花科芸薹属	品种(品系)名称		Drakkar	安全等级
	目的基因 1	名称	<i>barnase</i>		供体生物	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
		生物学功能			编码 RNA nuclease (RNA 核酸酶)		
	目的基因 2	启动子	PTA29		终止子	3'nos	
		名称	<i>barstar</i>		供体生物	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
	目的基因 3	生物学功能		编码 Barstar 蛋白, 能够抑制 Barnase 的活性			
		启动子	PTA29		终止子	3'nos	
	载体 1	名称	<i>bar</i>		供体生物	吸水链霉菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	
		生物学功能	编码 PAT/bar 蛋白, 使得植物具有抗除草剂草铵膦特性				
	载体 2	启动子	PSsuAra		终止子	3'g7	
		pTTM8RE (Ms1)		供体生物	农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
	标记基因 1	名称	<i>neo</i>		供体生物	农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
		启动子	Pnos		终止子	3'ocs	
	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	农杆菌介导转化法			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			
		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□中外合作□中外合资□外方独资□) 境外单位(企业 <input checked="" type="checkbox"/> 其它□)(选√)				
	申请人姓名			电话		
	传真			电子邮件		
	联系人姓名			电话		
	传真			电子邮件		
	单位名称			法人代表		
研制单位概况	联系人姓名			电话		
	传真			电子邮件		
	主要完成人					
	姓名			性别	男	出身年月
	学历	农学及环境生物博士		专业技术职务	全球法规部经理	
	何时何地曾从事何种基因工程工					
	参与完成人					
	姓名	年龄	学历	职称	单位	在本项目中的分
			工业工程	研究员	拜耳作物科学公司	分子生物
		博士	经理	拜耳作物科学公司	性状开发	
		学士	经理	拜耳作物科学公司	育种及生产	

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、转基因生物品种(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的抗草铵膦除草剂（商品名为 Basta[®], Buster[®], Finale[®], Ignite[®], Liberty[®]和 Rely[®]）油菜产品，产品的商品名为 LibertyLink[®] 油菜 (InVigor 油菜)。InVigor 油菜杂交品种是以两个特征清楚的转化体 Ms1 和 Rf1 的杂交为基础的，其 OECD 唯一标识码分别为 ACS-BN004-7 和 ACS-BN001-4。

Ms1 油菜（雄性不育系）含有编码核糖核酸酶 Barnase 的 *barnase* 基因（来源于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*），该基因由 Pta29 启动子驱动，在花药发育过程中，基因只在绒毡层细胞中表达。因此，Barnase 蛋白除了在花药发育过程中，在绒毡层细胞中表达之外，在其他任何组织中均不表达。Barnase 在 Ms1 油菜的绒毡层细胞中表达，使得产生的花粉失活，引起雄性不育。同时，Ms1 油菜也含有编码膦丝菌素乙酰转移酶(PAT/bar)的 *bar* 基因（来源于吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus*），赋予植物抵抗草铵膦除草剂。*bar* 基因受 PSSuAra 启动子驱动，该启动子在植物的所有绿色组织中具有活性。

Rf1 油菜（育性恢复系）含有 *barstar* 基因（来源于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*），编码 Barnase 蛋白抑制剂 Barstar 蛋白。*barstar* 基因受 Pta29 启动子驱动，在花药发育过程中，仅在绒毡层细胞中表达。因此，Barstar 蛋白除了在花药发育过程中，在绒毡层细胞中表达之外，在其他任何组织中都不表达。与 Ms1 油菜杂交之后，Barstar 蛋白抑制了 Barnase 蛋白在绒毡层细胞中的表达，从而使得花粉育性恢复。另外，Rf1 油菜也含有编码膦丝菌素乙酰转移酶(PAT/bar)的 *bar* 基因（来源于吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus*），赋予植物对草铵膦除草剂的抗性。*bar* 基因受 PSSuAra 植物启动子驱动，该启动子在植物的所有绿色组织中具有活性。

雄性不育的 Ms1 油菜和育性恢复系 Rf1 油菜为油菜杂交体系的基础。F1 代杂交种的产量比最好的自然授粉油菜品种高 20%--25%。在商业大田中，杂交品种的均一性是其优势，有利于收获和销售。*bar* 基因的插入为油菜种植人员提供了杂草管理新选择。

用作进口用作加工原料的 Ms1Rf1 油菜的安全性评价要点如下：

用覆盖质粒 pTTM8RE 全长 T-DNA 的一组 DNA 片段为探针，与以不同的限制性酶切消化的基因组 DNA 产物进行杂交，对 Ms1 油菜基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析。结果显示，Ms1 油菜含有单一位点的单拷贝的 pTTM8RE T-DNA 插入。这一结果通过 PCR 分析得到了进一步的证实。

对 Rf1 油菜进行的 Southern 印迹杂交和 PCR 分析证明存在单一位点的插入，插入序列包含 pTVE74RE T-DNA 的一部分和反向互补的另一个不完整拷贝的 pTVE74RE T-DNA。Rf1 中插入的 T-DNA 的一部分包括一个完整的 *bar* 基因盒和含有不完整 Pta29 启动子的 *barstar* 基因盒组成，反向互补的另一不完整 T-DNA 拷贝包括一个完整的 *barstar* 基因盒和部分 PSSuAra 启动子序列。通过 Southern 印迹杂交和 PCR 分析，分析了 Rf1 油菜中不存在 pTVE74RE 质粒骨架序列。用任何

Southern 杂交探针和 PCR 引物对，均未测定到 Southern 印迹杂交和 PCR 扩增信号，从而证实在 Rf1 油菜中不存在质粒 pTVE74RE 骨架序列。

插入的基因以单一的显性性状遗传。Southern 印迹杂交分析和孟德尔杂交证明了基因插入的稳定性。

与对应的常规油菜进行的平行比较证明，两者的植物表型实质等同。通过对与油菜品质和形态相关参数的评估，证实了二者之间的相似性。此外，通过常规育种将转基因油菜 Ms1Rf1 与其他油菜品种杂交，未测定到或观察到有超出农业生产中常用的油菜植物的表型参数范围的情况。

实验验证了来源于转化体 Ms1Rf1 油菜的食品参数与常规油菜具有实质等同性。用于分析的样品来自美国和加拿大地区的多个田间试验。对 Ms1Rf1 及其对照采用相同的常规农业操作进行管理。对转基因油菜和非转基因对照的主要营养成分的化学组成分析证实。已知的抗营养因子硫代葡萄糖苷和芥酸存在的差异不具有生物学意义，且所有数值均在 CODEX 标准公布的范围之内。未观察到潜在的抗营养的问题或毒理学方面的问题。

2002年~2003年油菜生长季，由中国农业科学院油料作物研究所开展了转基因油菜的环境安全评价，结果表明转基因油菜与非转基因油菜相比，在环境安全方面不存在差异。

2003年，由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所开展的Ms1Rf1 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Ms1Rf1 粉掺入饲料（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Ms1Rf1 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。

油菜加工产品在食品和饲料中的应用非常普遍：油料既可以单独食用也可以用作其它食品的添加成分，籽粒则可以不同比例加入饲料中。正如本文所述，没有迹象显示，Ms1 和/或 Rf1 的遗传修饰对由转基因甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 加工而成的食品和饲料的安全性有任何负面作用。迄今，在加拿大和美国获得了商业化种植的批准，且在澳大利亚、日本、欧盟等国家和区域获得了食用安全批准。

三、工作目的和意义

1. 工作目的

油菜育种者的主要目的是获得高产量的甘蓝型油菜品种 (*Brassica napus L. oleifera*)。实现此目标的最有效办法是使用 F1 代杂交种，因为杂交油菜品种预计可以比最好的常规品种产量提高 20-25%。另外，F1 代杂交种的一致性有利于油菜的商品化生产，既有助于提高产量又有助于促进销售。

因为油菜既可以自花授粉 (70%)，又可以异花授粉 (30%)，需要利用授粉控制系统才能得到 100% 的 F1 代杂交种子。与其它农作物的杂交系统一样，拜耳作物科学公司的油菜杂交系统也包括两部分：雄性不育系和育性恢复系。雄性不育系阻止自花授粉，因此可以保证得到 100% 真正的杂交种子。育性恢复系使杂交种子自身在田间完全可育。

雄性不育系作为保证异花授粉的有效工具已广泛应用于不同的农作物。油菜的雄性不育系的构建采用了新的方法，即通过农杆菌接到的转化方法将 *barnase* 基因转入油菜基因组 DNA。该基因在特异启动子的调控下在绒毡层细胞特异性表达，从而使得花粉失活，引起雄性不育。

barstar 基因 (核糖核酸酶抑制物) 也通过农杆菌接到的转化方法被转入到油菜基因组 DNA 中，用于构建杂交系统的育性恢复系 Rf1。*barstar* 基因表达 Barnase 蛋白的特异性抑制剂，使得 Barnase 活性被抑制。将雄性不育系和育性恢复系杂交，油菜后代的育性将得到恢复。

bar 基因在转化体筛选过程中用作选择性标记，直接决定了转化/再生过程和田间的选择效率。此外，*bar* 基因的表达产生了抗除草剂草铵膦活性的 PAT/*bar* 蛋白，从而可在转基因作物田中使用除草剂进行杂草防治。

在主要油菜种植区加拿大农民们会种植 Ms1Rf1 F1 (子一代) 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 杂交品种。所收获的是 F2 (子二代) 种子，将在本国加工或以原料的方式出口做为加工使用。油菜油料和菜籽粕是其主要的产品，加工后可以分别用于人类食用和动物饲料。这些油菜品种是“双低”品种，即油料中芥子酸含量低和加工油菜产品中的硫甙含量低，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有经 Ms1Rf1 原料加工得到的食品和饲料。本申请的目的在于获得油菜 Ms1Rf1 的进口用作加工原料的安全证书，以支持国内油菜贸易商可以顺利进口该油菜及相应的油菜加工产品。

2. 工作意义

杂草是油菜生产上影响产量的一个重要的参数，因此杂草控制对于提高油菜产量有很重要的帮助。

1：有效的杂草控制

草铵膦是草铵膦抗性油菜种植中杂草控制的有效途径。播种前对种植田进行一次草铵膦喷施，在生长季节中再进行一次喷施即可达到抗除草剂油菜田中杂草的有

效控制。

2: 简易方便的操作

草铵膦抗性油菜 Ms1Rf1 为油菜种植提供了一种操作方便的杂草控制方法。与非转基因油菜种植相比，在同样的条件下，Ms1Rf1 高效的草铵膦抗性可以使得农民增加种植面积。另外，在某些程度上可以减少机器设备的花费和劳动力的花费，比如免耕种植。

3: 农民的经济受益

国外多年的抗除草剂油菜的商业化已经证明种植抗除草剂油菜可以增加农民的收益，比如增加产量，减少间接成本。抗除草剂油菜没有商业化之前，除草剂的使用率是：1.13 kg a.i/公顷，而种植草铵膦抗性油菜的除草剂使用率是：0.39 kg a.i/公顷。这种在抗除草剂的油菜田中使用有效地除草剂可以使得加拿大的除草剂使用量减少到130万公斤。

4: 环境受益

种植 Ms1Rf1 油菜在环境受益方面主要表现在除草剂的使用量减少和有助于免耕技术的推广。这些种植习惯可以减少水或风对土壤的侵蚀。免耕技术还可以减少石油的使用，从而降低空气污染，改善土壤的保水性，降低土壤板结。利用草铵膦来替代其它苗前除草剂可以降低地表水中除草剂含量。

四、国内外研究的相关资料

油菜是我国最重要的食用油和饲料蛋白来源，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苔属，起源于非常有限的地理区域内芜菁和白菜基因组的自然杂交，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。抗除草剂油菜的种植主要分布在加拿大和美国，在澳大利亚也有种植，农民欢迎此项新技术，因为它促使种植业能够成功地防治杂草，降低除草剂用量及其在土壤中的残留，减少除草剂混用及多次处理。

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：农杆菌介导转化法，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 50kb 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。缺点是仍受宿主范围和菌株特异性等因素的限制。

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”的子叶柄为受体，通过农杆菌介导的遗传转化，获得了含有 10mg/L 卡那霉素和 20mg/L PPT 的筛选培养基上再生的转基因植株。

拜耳作物科学公司利用农杆菌介导的转化方法获得了雄性不育系 Ms1 和育性恢复系 Rf1。从 1991 年开始，拜耳作物科学公司对这种新型的杂交系统进行了户外田间实验的评估，显示了其可行性和与科学预测的一致性，并对农艺性状，花的表型，雄性不育和育性恢复性状的稳定性和确认其不会减产等方面进行了研究。在欧洲和北美的几个国家进行了多处田间实验。田间实验结果证明在选择合适的油菜雄性不育系和育性恢复系的基础上可以得到可靠的油菜杂交系统。

迄今，在加拿大和美国获得了商业化种植的批准，且在澳大利亚、日本、欧盟等国家和区域获得了食用安全批准。

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：芸苔属

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；

受体名称为 Drakkar。

1.1.4 是野生种还是栽培种；

Drakkar 是一种在加拿大西部和欧洲广泛种植的栽培种。

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；油菜饼粕除去硫代葡萄糖甙后，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所杀死。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。栽培油菜是一年生作物。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，芸苔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，由于籽粒中含有硫代葡萄糖苷而限制可油菜加工副产品在动物饲料中的应用，通常认为硫代葡萄糖苷本身是无害的，但是其水解产物对动物具有不利影响，其适口性差，并且硫代葡萄糖苷有抗甲状腺活性的副作用，由此导致了低硫代葡萄糖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；

在大田条件下，油菜胚珠受精通常是通过自花授粉的结果，尽管油菜有5%~30%的异交率。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°C，在12~30°C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环境；

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，芸苔属栽培种对硫的营养需求最高。

鉴于对保护的土壤，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除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,认为油菜是对环境和生态没有危害的作物。

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,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环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,认为油菜不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,这意味着杂交种和他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.nupus* 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，和在细菌中表达（Morrison, M., 1996）。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。

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

Ms1Rf1 是通过将雄性不育系 **Ms1** 和育性恢复系 **Rf1** 常规的杂交获得的。常规杂交通常是用来改进作物的某些农艺性状，从而使得新品种可以适应特定的生长环境或特定的农事操作。将已经批准的单一转化体，通过常规的杂交育种复合在一起的生物学原则和筛选原则，与常规品种之间的杂交育种原则是一样的。因此，当被复合在一起的转基因性状不存在互作的情况下，对单一性状的安全性评价数据同样也适用于复合性状产品。

2.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的叙述。

Ms1

油菜转化体 **Ms1** 是拜耳作物科学公司利用农杆菌介导的转化方法将质粒 **pTTM8RE** T-DNA 转入油菜基因组 DNA 中获得的。**pTTM8RE** T-DNA 含有 2 个基因表达盒：**bar** 基因表达盒（**PSsuAra-bar-3'g7**）和 **barnase** 基因表达盒（**Pta29-barnase-3'nos**），**bar** 基因编码 **PAT/bar** 蛋白，使得 **Ms1** 具有草铵膦除草剂抗性，**barnase** 基因在花药绒毡层特异性表达，引起花粉失活，从而引起雄性不育。

Rf1

油菜转化体 **Rf1** 是拜耳作物科学公司利用农杆菌介导的转化方法将质粒 **pTVE74RE** T-DNA 转入油菜基因组 DNA 中获得的。**pTVE74RE** T-DNA 含有 2 个基因表达盒：**bar** 基因表达盒（**PSsuAra-bar-3'g7**）和 **barstar** 基因表达盒（**Pta29-barstar-3'nos**），**bar** 基因编码 **PAT/bar** 蛋白，使得 **Rf1** 具有草铵膦除草剂抗性，**barstar** 编码 **Barstar** 蛋白，在花粉中特异表达，抑制 **Barnase** 蛋白活性，从而使得植株育性恢复。

此外，**Ms1Rf1** 还表达由 **bar** 基因编码的 **PAT/bar** 蛋白，使得植株具有草铵膦抗性。草铵膦除草剂（glufosinate-ammonium）活性成分 **L-PPT**（**L-phosphinothricin**）为谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase）的抑制剂，由于谷氨酰胺合成酶参与氨代谢途径所需酶的合成系统，因此抑制谷氨酸合成酶会使氨代谢效率下降，快速累积的氨造成植物细胞膜的瓦解并阻断光合作用，最后导致植物枯萎甚至死亡。

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；

Ms1

利用高保真 PCR 反应体系，对 **Ms1** 基因组 DNA 进行 PCR 扩增，获得两条具有重叠区域的 PCR 扩增片段，将两个片段进行拼接获得 **Ms1** 的全长插入序列（图 1），将该序列与质粒 **pTTM8RE** T-DNA 进行比对，发现 **Ms1** 含有 8150 bp 的外源插入序列：**bar** 基因表达盒（**PSsuAra-bar-3'g7**）和 **barnase** 基因表达盒（**Pta29-barnase-3'nos**），不含质粒骨架序列（图 2）。

利用连接介导 PCR（Ligation-mediated PCR）方法获得了 **Ms1** 插入序列的左右侧翼序列。

商业保密信息，在公开版本已删除

图1：转化体 Ms1 插入序列扩增片段示意图

商业保密信息，在公开版本已删除

图2：转化体Ms1插入序列及侧翼序列

Rf1

利用 2 条具有重叠的 PCR 片段测定了转基因油菜 Rf1 的基因插入位点的 DNA 序列，包括插入的 DNA 序列和两边的侧翼序列（图 3），然后将 2 个片段进行拼接，获得完整的插入及侧翼序列，将该序列与质粒 pTVE74RE T-DNA 进行比对，发现 Rf1 插入序列大小为 8084 bp（图 4），不含有骨架序列。利用反向 PCR 方法分析了 Rf1 插入序列的左右边界序列。

商业保密信息，在公开版本已删除

图3：转化体 Rf1 插入序列扩增片段示意图

商业保密信息，在公开版本已删除

图4：转化体Rf1插入序列及侧翼序列

2.2.2 删 除 区 域 的 大 小 和 功 能 ；

Ms1

以野生型植株的基因组 DNA 为模板，分别利用插入序列左侧侧翼序列的一段序列和右侧侧翼序列的一段序列为引物，进行扩增，获得了 T-DNA 插入前片段，将该片段与 Ms1 插入序列的左右侧翼序列进行比对，发现野生型植株的 525bp 在 Ms1 中不存在，因此推断该片段在整合过程中丢失。

商业保密信息，在公开版本已删除

将侧翼序列和删除序列与 NCBI 的 Blast 数据可进行了比对，结果证明 T-DNA 的插入没有造成内源基因的破坏。

Rf1

以野生型植株的基因组 DNA 为模板，分别利用插入序列左侧侧翼序列的一段序列和右侧侧翼序列的一段序列为引物，进行扩增，获得了 T-DNA 插入前片段，将该片段与 Rf1 插入序列的左右侧翼序列进行比对，发现野生型植株的 74bp 在 Rf1 中不存在，因此推断该片段在整合过程中丢失。

商业保密信息，在公开版本已删除

将侧翼序列和删除序列与 NCBI 的 Blast 数据可进行了比对，结果证明 T-DNA 的插入没有造成内源基因的破坏。

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

bar 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

bar 基因编码的 PAT/*bar* 蛋白氨基酸序列

1 MDPERRPADI RRATEADMPA VCTIVNHYIE TSTVNFRTEP QEPQEWTDDL VRLRERYPWL
61 VAEVDGEVAG IAYAGPWKAR NAYDWTAEST VYVSPRHQRT GLGSTILYTHL LKSLEAQGFK
121 SVVAVIGLPN DPSVRMHEAL GYAPRGMLRA AGFKHGNWHD VGFWQLDFSL PVPPRPVLPV
181 TEI

barnase 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

barnase 基因编码的 BARNASE 蛋白氨基酸序列

1 MVPVINTFDG VADYLQTYHK LPDNYITKSE AQALGWVASK GNLADVAPGK SIGGDIIFSNR
61 EGKLPKGKSGR TWREADINYT SGFRNSDRIL YSSDWLIYKT TDHYQTFTKI R

barstar 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

barstar 基因编码的 BARSTAR 氨基酸序列

1 MKKAVINGEQ IRSISDLHQT LKKELALPEY YGENLDALWD CLTGWVEYPL VLEWRQFEQS
61 KQLTENGAES VLQVFREAKA EGCDITIILS

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，证明外源整合到油菜基因组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。

Ms1

利用单酶切或双酶切的方法对 Ms1 油菜基因组 DNA 进行酶切消化后，与涵盖整个质粒 pTTM8RE T-DNA 的 DNA 片段为探针（*bar*, P_{Ssu}Ara, pTA 29 和 *neo*），进行 Southern 杂交。杂交结果与预期杂交结果一致(图 5)。表明在 Ms1 基因组 DNA 中仅含有单一拷贝的 T-DNA 插入。

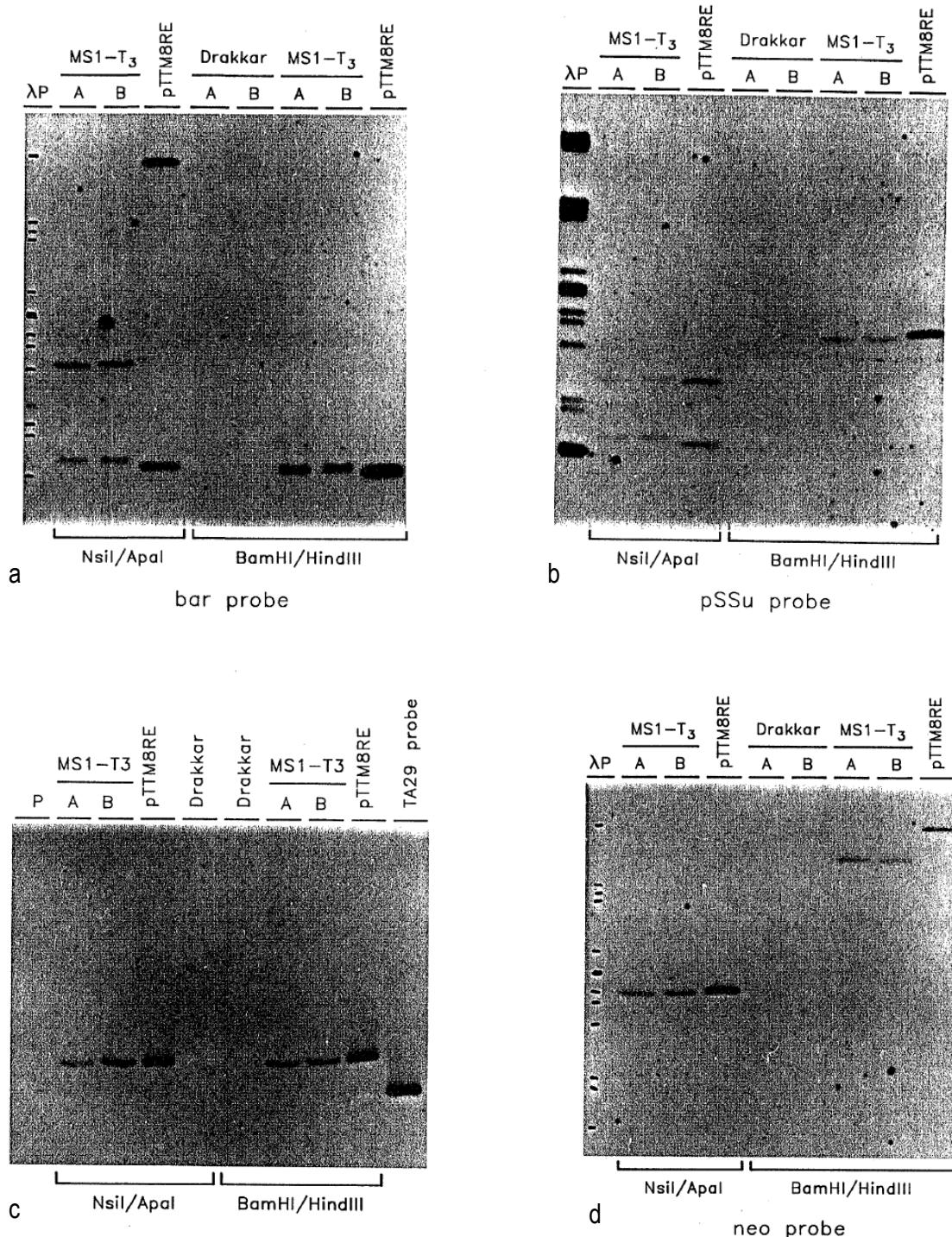


图 5: 转基因油菜 Ms1 (B91-4) 的基因组 DNA 与探针 (bar, pSSu, PTA29, neo) 的杂交图

Rf1

为了鉴定质粒载体 pTVE74RE 的 T-DNA 插入序列的整合拷贝数, 将总的植株 DNA 用琼脂糖凝胶电泳分离后用两种不同的 DNA 探针进行杂交。一个片段包括的是限制性酶切位点间核苷酸序列信息 (barstar 编码序列) 和 T-DNA 右侧边界序列, 另一个包括限制性酶切位点间核苷酸序列 (neo 编码序列) 和左侧边

界 (图 6, A)。

从图 6 A 的分析中不能判断重复边界序列末端外侧的质粒序列是否也被转入植物染色体组中。针对这一点, 从相应植株中提取的总 DNA 用相同的酶消化后另外与质粒 pTVE74RE 边界重复序列末端外侧的核苷酸序列 (图 6, 平板 B 中探针命名为: +RB 和+LB) 杂交。

结果

Southern 印记杂交结果如下 (图 6, A 和 B)。

图 6 A 包括两个部分 (I, II), 显示了 *barstar* 探针 (I) (图 6 A, 左) 和 *neo* 探针 (II) (图 6 A) 的杂交结果。分析了三个独立的植株 (1, 2, 3) 及一个非转化对照 (-)。与 *barstar* 探针 (I) 杂交时期望结果是覆盖右边界至少 3.6 kb 大小序列的片段。杂交结果显示在所有转基因植株中都有一条大约为 10 kb 的条带, 在非转化对照中不存在。与 *neo* 探针(II)杂交时期望结果是覆盖左边界至少 4.4 kb 大小序列的片段。杂交模式的分析结果显示在所有转基因植株中都有一条大约为 5 kb 的条带, 在非转化对照中不存在。因此这个分析结果显示在转基因品种 Rf1 中只包含一个拷贝的转化载体 T-DNA。

图 6 B 包含两个部分 (I, II), 显示了右侧边界重复序列外侧的质粒序列探针 (I) 和左侧边界重复序列外侧的质粒序列探针 (II) 的杂交结果。用了两个独立的植株 (平板 A 中 1 和 2)。胶上用相应探针 (+RB 和 +LB) 的片段作为阳性对照。结果显示, Rf1 的两个泳道 1, 2 均无杂交条带。平板 A 上在 T-DNA 边界重复外侧序列的泳道, 检测到与预期的同样大小的条带。

结论

在上述实验结果中总结得出以下结论:

- Southern 印记杂交分析得出植物染色体组的基因整合模式;
- 在 Rf1 中整合了单一拷贝的外源基因;
- 质粒骨架序列没有随同 T-DNA 插入到植物基因组中; 嵌合基因在边界重复序列之间。

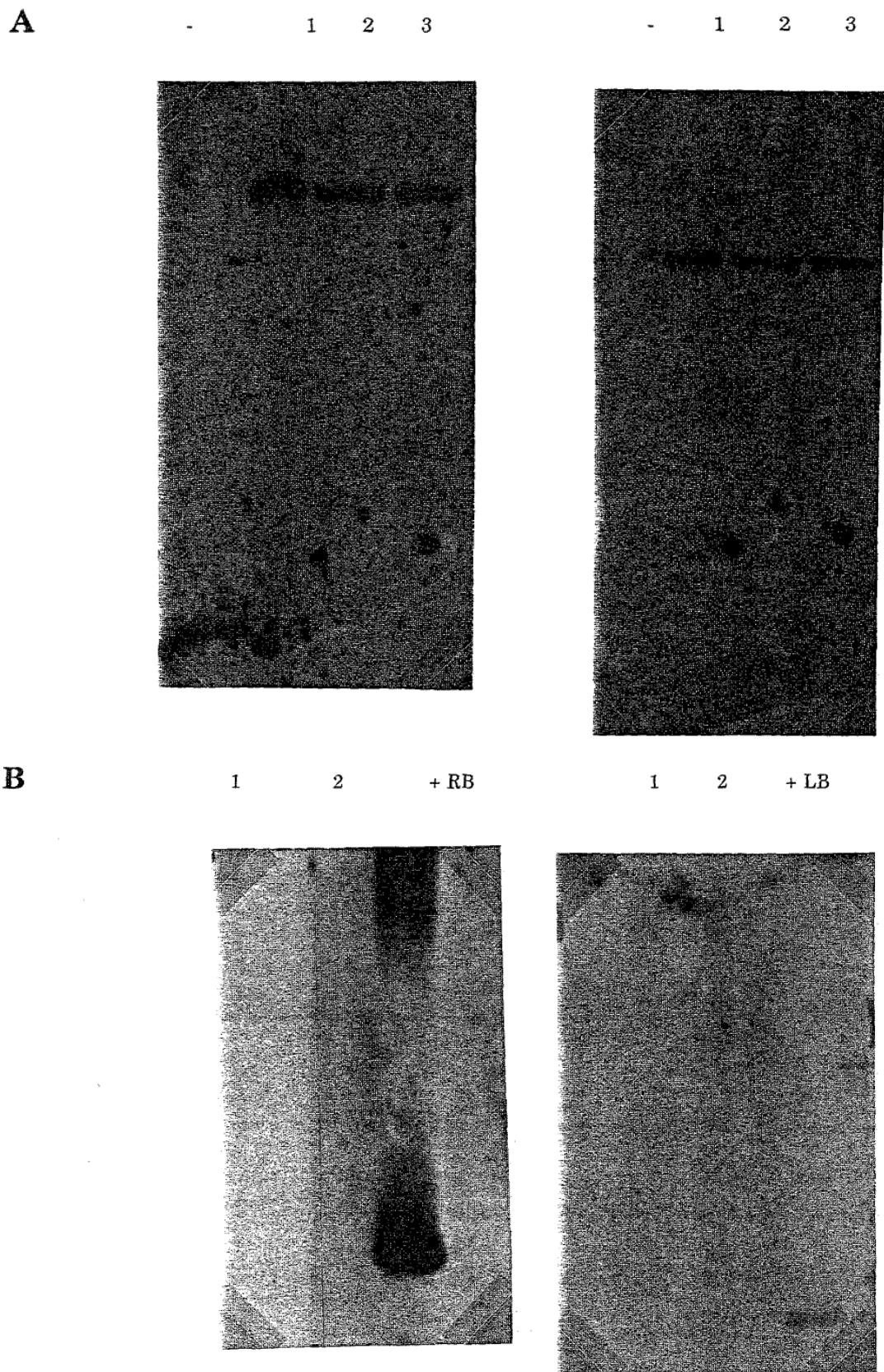


图 6: Rf1 southern 杂交结果

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。

Ms1

将pTTM8RE质粒载体的T-DNA转入到春油菜品种Drakkar中,获得油菜转化体Ms1。其T-DNA含有“PTA29-barnase-3'nos”表达盒和“PSSuAra-bar-3'g7”表达盒。

Rf1

将pTVE74RE质粒载体的T-DNA转入到春油菜品种Drakkar中,获得油菜转化体Rf1。T-DNA含有“PTA29-barstar-3'nos”表达盒和“PSSuAra-bar-3'g7”表达盒。

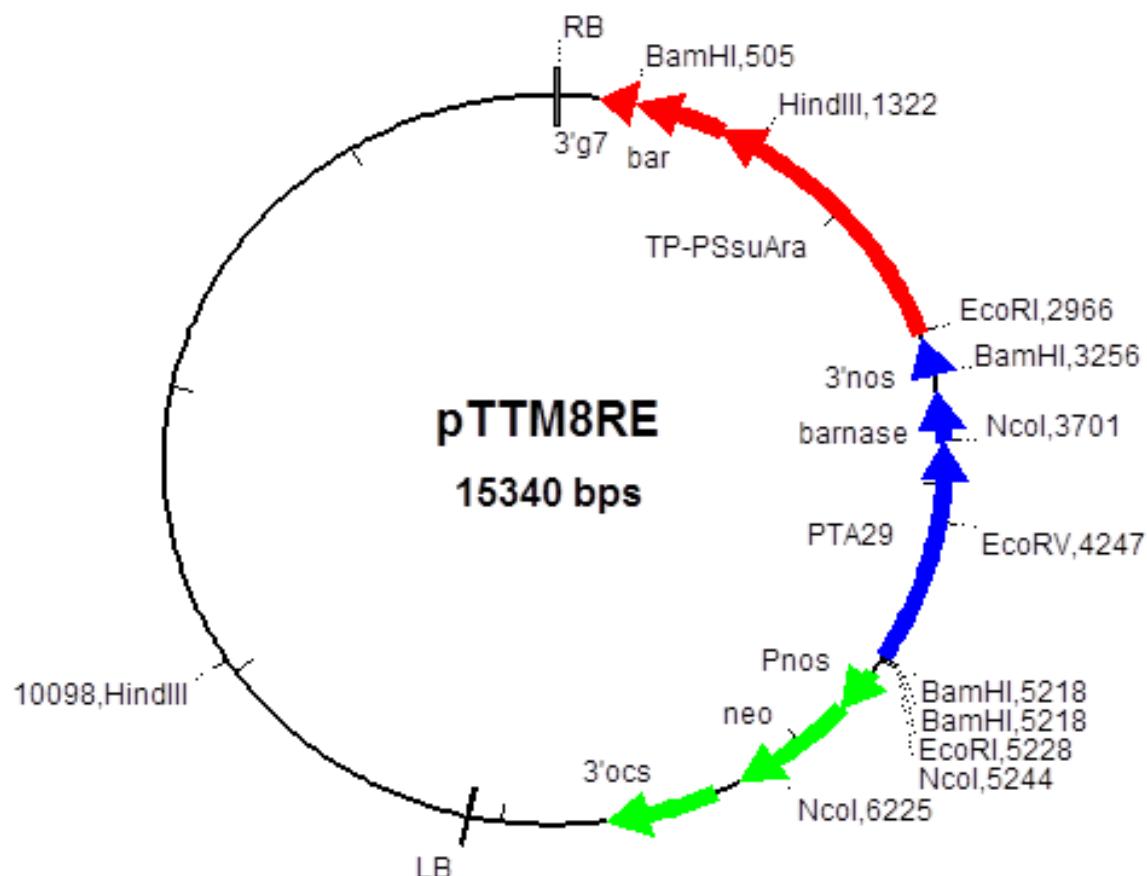


图 7: Ms1 转化用质粒 pTTM8RE 图谱

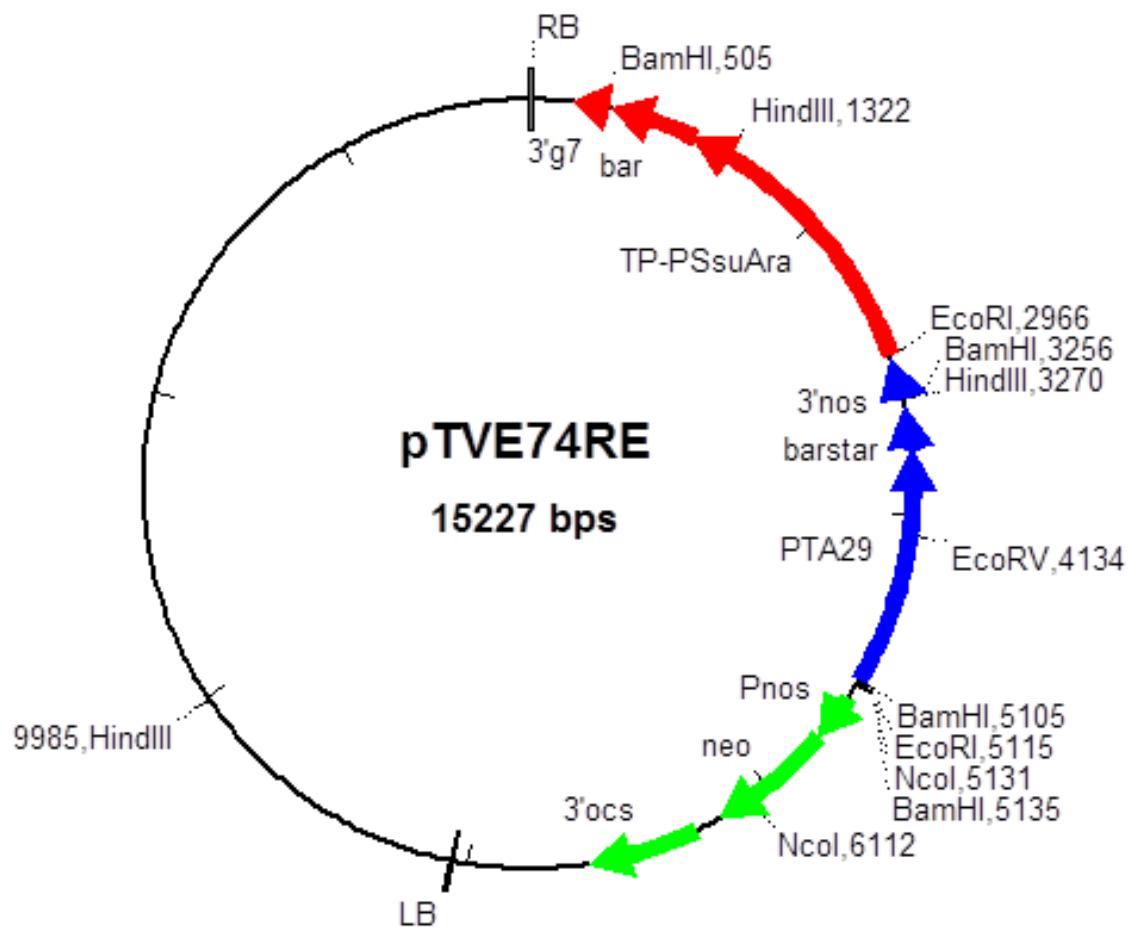


图 8: Rf1 转化用质粒 pTVE74RE 图谱

表 1: Ms1 转化用质粒 pTTM8RE 的 T-DNA 遗传元件描述

核苷酸的位置 (bp)	方向	说明
1-25		来自于 pTiB6S3 右边界的 TL-DNA 重复序列。
26-283		右边界重复序列处 TL-DNA 的残余序列。接合位点位于 TL-DNA 的 <i>Hpa</i> I 限制性酶切位点处。
284-290		人工合成多接点序列
502-291	逆时针	含多聚腺苷酸信号的一个 212 bp 的 <i>Eco</i> R V- <i>Cla</i> I 双酶切片段, 来自于 pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3'端非翻译区 (3'g7)
503-523		人工合成多接点序列
1075-524	逆时针	源自吸水链霉菌 (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) 的 <i>bar</i> 基因的编码序列
2966-1076	逆时针	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子 (PssuAra)。这一启动子片段含有 atS1A 起始密码子 ATG 上游的 1.7 kb 片段以及靶向叶绿体的转运肽序列 (1240-1076)
2967-2995		人工合成多接点序列
3256-2996	逆时针	一个 260 bp 的 <i>Taq</i> I 酶切片段, 该片段来自于 pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的 3' 端非翻译区 (3' nos), 并含有植物多聚腺苷酸信号。
3257-3272		人工合成多接点序列
3273-3367		解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 的 <i>barnase</i> 基因 3'端非编码区序列
3704-3368	逆时针	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) <i>barnase</i> 完整蛋白的编码区。
5214-3705	逆时针	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>) 的花药特异表达基因 TA29 的启动子区域。该 PTA29 启动子包括了 ATG 启始密码子的上游 1.5kb 的序列。
5215-5250		人工合成多接点序列
5251-5655	顺时针	土壤农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) (Pnos) pTiT37 质粒的 T-DNA 上的胭脂碱基因启动子。
5656-6633	顺时针	编码新霉素磷酸转移酶 II 的 <i>neo</i> 基因序列。这一序列与 Beck 等 (1982) 描述的大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> Tn5 序列一致。 <i>neo</i> 编码序列的 ATG 起始密码子已经替代为 Reiss 等 (1984) 所述的接头序列。 <i>neo</i> 编码序列下游存在 171 bp 的 Tn5 序列。
6634-7509	顺时针	章鱼碱合成基因 (3'ocs) 3'端非编码区序列, 这一序列与 706 bp 的章鱼碱合成酶基因的 <i>Pvu</i> II 片段一致。已经从 Tn5 序列的 <i>Sma</i> I 酶切位点中

		克隆了这一 <i>Pvu</i> II 片段。另外还有 169 bp 的 Tn5 序列位于 3'ocs 片段下游。
7510-7513		人工合成多接点序列
7514-8202		TL-DNA 左边界的重复序列的残余序列。接合区域是在 TL-DNA 的前面 <i>Bgl</i> II 位点上。
8203-8227		PTiB6S3 质粒的 TL-DNA 的左边界重复序列

表 2: Rf1 转化用质粒 pTVE74RE 的 T-DNA 遗传元件描述

核苷酸的位置	方位	说明
1-25		PTiB6S3 右边界 TL-DNA 重复序列。
26-283		右边界重复序列处 TL-DNA 的残余序列。接合区位于 TL-DNA 的 <i>Hpa</i> I 限制性酶切位点处。
284-290		人工合成的多聚接头序列
502-291	逆时针	含多聚腺苷酸信号的一个 212 bp 的 <i>Eco</i> R V- <i>Cla</i> I 双酶切片段, 来自于 pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3'端非编码序列 (3'g7)
503-523		人工合成的多聚接头序列
1075-524	逆时针	源自吸水链霉菌 (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) 的 <i>bar</i> 基因的编码序列
2966-1076	逆时针	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子 (PssuAra)。这一启动子片段含有 atS1A 起始密码子 ATG 上游的 1.7 kb 片段以及靶向叶绿体的转运肽序列 (1240-1076)
2967-2995		人工合成的多聚接头序列
3256-2996	逆时针	一个 260 bp 的 <i>Taq</i> I 酶切片段, 该片段来自于 pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的 3' 端非编码序列 (3' nos), 并含有植物多聚腺苷酸信号。
3257-3276		人工合成的多聚接头序列
3277-3316		解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 的 <i>barstar</i> 基因 3'端非编码序列
3589-3317	逆时针	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) <i>barstar</i> 成熟蛋白的编码区。
5100-3590	顺时针	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> 的花药特异性基因 TA29 的启动子区域。PTA29 启动子含 ATG 起始密码子上游的 1.5 kb 的序列。
5101-5136		人工合成的多聚接头序列
5137-5541	顺时针	根瘤土壤农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的启动子 (Pnos); Depicker et al. (1982) 对 Pnos 启动子的核苷酸序列进行了描述。

5542-6519	顺时针	编码新霉素磷酸转移酶 II 的 <i>neo</i> 基因序列。这一序列与 Beck 等 (1982) 描述的大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> Tn5 序列一致。 <i>neo</i> 编码序列的 ATG 起始密码子已经替代为 Reiss 等 (1984) 所述的接头序列。 <i>neo</i> 编码序列下游存在 171 bp 的 Tn5 序列。
6520-7395	顺时针	章鱼碱合成基因 (3'ocs) 3'端未翻译序列, 章鱼碱合成酶基因的 3' 端非翻译区 (3' ocs)。这一序列与 706 bp 的章鱼碱合成酶基因的 <i>Pvu</i> II 片段一致 (Gielen et al., 1984)。已经从 Tn5 序列的 <i>Sma</i> I 酶切位点中克隆了这一 <i>Pvu</i> II 片段。另外还有 169 bp 的 Tn5 序列位于 3' ocs 片段下游。
7396-7399		人工合成的多聚接头序列
7400-8089		左边界重复序列处的 TL-DNA 残余序列。接合区位于 TL-DNA 的前一 <i>Bgl</i> II 酶切位点处。
8090-8114		PTiB6S3 质粒的 TL-DNA 的左端重复序列 (Gielen et al. (1984) The EMBO Journal 3:835-846)。

2.4 载体中插入区域各片断的资料:

2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物是名称;

Ms1:

pTTM8RE 质粒含有 “PTA29-*barnase*-3'nos” 表达盒和 “P_{SsuAra}-*bar*-3'g7” 表达盒。

pTTM8RE 质粒中 *barnase* 基因的启动子、终止子如下:

启动子: 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 花药特异基因 TA29 的启动子区域, 位于 ATG 起始密码子上游的 1.5 kb 的序列, 启动目标基因在花药中的表达。

终止子: 3'nos, 来自于胭脂碱合成酶基因的 3'端非编码区, 一个 260 bp 的 *Taq* I 酶切片段, 终止信号。

pTTM8RE 质粒中 *bar* 基因的启动子、终止子如下:

启动子: P_{SsuAra}, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子, 位于 ATG 起始密码子上游的 1.7 kb 的序列, 启动目标基因在绿色组织中的表达。

终止子: 3'g7, pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3'端非编码区, 终止信号。

Rf1:

pTVE74RE 质粒载体含有“PTA29-*barstar*-3'nos”表达盒和“P_{SsuAra}-*bar*-3'g7”表达盒。

pTVE74RE 质粒中 *barstar* 基因的启动子、终止子如下:

启动子: 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 花药特异基因 TA29 的启动子区域, 位于 ATG 起始密码子上游的 1.5 kb 的序列, 启动目标基因在花药中的表达。

终止子: 3'nos, 来自于胭脂碱合成酶基因的 3'端非编码区, 一个 260 bp 的 *Taq* I

酶切片段，终止信号。

pTVE74RE 质粒中 *bar* 基因的启动子、终止子如下：

启动子：P_{SsuAra}，拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子，位于 ATG 起始密码子上游的 1.7 kb 的序列，启动目标基因在绿色组织中的表达。

终止子：3'g7， pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3' 端非编码区，终止信号。

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；

pTTM8RE 和 pTVE74RE 质粒均携带有产生抗生素卡那霉素 (kanamycin) 选择性标记基因 *neo* (P_{Nos}-*neo*-3'ocs)。*neo* 基因编码新霉素磷酸转化酶 II neomycin phosphotransferaseII (APH(3')II) (NPTII)，可以产生对氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素如卡那霉素 kanamycin, geneticin(G418) 和新霉素 neomycin 的抗性。该基因表达盒在两个载体中完全相同。

P_{Nos}-*neo*-3'ocs

启动子：土壤根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumifaciens* pTiT37 的 T-DNA 中胭脂碱合成酶基因的启动子。大小：404bp。

编码区：*neo* 基因上编码新霉素磷酸化酶 II neomycin phosphotransferaseII 的编码区。该序列对应于大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 Tn5 序列。大小：977bp

终止子：胭脂碱合成酶基因的 3' 非翻译区 (3'ocs) 末端，来自 *Agrobacterium tumifaciens*。大小：875bp。

2.4.3 其它表达调控序列的名称及其来源 (如人工合成或供体生物名称)；

除了之前 2.3 部分所描述的调控序列外，没有其它的调控基因。

2.5 转基因方法。

油菜 Ms1 和 Rf1 均是通过农杆菌介导的转化将外源基因转入到油菜基因组 DNA 中的。

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；

barnase 和 *barstar* 基因分别特异性表达在油菜转化子 Ms1 和 Rf1 花粉囊胚周围的绒毡层细胞。详细的 Northern blot 分析表明，两个基因在叶、种子和花粉中都没有表达。嵌合 *bar* 基因不会在除了绿色组织之外的器官中表达。*bar* 基因产物 (mRNA 或蛋白或蛋白活性) 可以在叶、绿色花蕾中检测到，种子中也有痕量存在。*neo* 基因由弱组成型启动子操纵。其 mRNA 在各种组织中都检测不到存在，只在叶组织中可以检测到 NPTII 活性阳性信号。

表 3: Rf1 转化体外源基因表达情况

	PAT/bar	Bastar	NPTII
总 RNA			
叶片 A	+	-	-
叶片 B	+	-	-
Drakkar 叶片对照	-	-	-
2mm 花蕾 (A)	+	(+)	-
3mm 花蕾 (A)	-	-	-
2mm 花蕾 (B)	+	+	-
3mm 花蕾 (B)	-	-	-
Drakkar2mm 花蕾对照	-	-	-
Drakkar3mm 花蕾对照	-	-	-
种子	-	-	-
Drakkar 种子对照	-	-	-
花粉	-	-	-
Drakkar 花粉对照	-	-	-
检测限 (pg/Hg total RNA)	0.1	0.4	0.2

表 4: Ms1 转化体外源基因表达

	PAT/bar	Bastar	NPTII
总 RNA			
叶片 A	+	-	-
叶片 B	+	-	-
Drakkar 叶片对照	-	-	-
2mm 花蕾 (A)	-	-	-
3mm 花蕾 (A)	-	-	-
2mm 花蕾 (B)	-	-	-
3mm 花蕾 (B)	-	-	-
Drakkar2mm 花蕾对照	-	-	-
Drakkar3mm 花蕾对照	-	-	-
种子	-	-	-
Drakkar 种子对照	-	-	-
检测限 (pg/Hg total RNA)	0.1	0.4	0.2

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法;

为了研究不育系和育性恢复系的油菜外源基因的表达量, 用 Northern blot 分析定量检测 mRNA。Drakkar 作为该实验的阴性对照。

实验方法:

总 RNA 的提取与提纯: 总 RNA 的提取方法参照 Jones 等的方法 (Jones D., Dunsmuir P. & Bedbrook J., The EMBO Journal, 4, 2411 - 2418, 1985)

对照 RNA 片段的体外合成: 为了体外合成 RNA 对照的片段, 使用了 4 种核糖核酸。在 “冷” 转录反应中, 由于底物是充足的, 因此合成可以生成大量 RNA。

RNA 的分离: RNA 的分离是根据片段大小通过含有甲醛的变性凝胶电泳来实现的。

将变性的 RNA 转移到尼龙膜上: 凝胶电泳结束后, 立即将 RNA 转移到尼龙膜(Hybond-N, Amersham International)上, 转移方法采用毛细管法。

体外合成 RNA 探针: 高特异性的单链 RNA 探针的制备是利用 PCR 方法来制备的。利用放射性标记 ($[a-^{32}P]UTP$) 对探针模板进行标记。

杂交和自显影: 65°C条件下预杂交 1-2 小时后, 加入变性的放射性标记的探针过夜杂交, 杂交结束后, 洗膜, 将膜在-70°C条件下暴露于在 X-射线下 24-48 小时, 放射自显影。

2.6.3 插入序列表达的稳定性。

为了验证 PAT/bar 蛋白在不同的世代中稳定表达, 利用分光光度法对不同世代的 Ms1 和 Rf1 油菜基因组进行了 PAT/bar 蛋白检测。

实验材料: 不育系和育性恢复系油菜的不同世代。具体如下:

植物材料	备注
Ms1 后代:	
T ₁ (B91-4)	Ms1-T ₁
T ₃ (B91-4)	Ms1-T ₃
B91-4 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Ms1-BC ₄
B91-4 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Ms1-BC ₄
Rf1 后代:	
S ₁ (B93-101)	Rf1-S ₁
S ₃ (B93-101)	Rf1-S ₃
B93-101 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Rf1-BC ₃ (B6907)
B93-101 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Rf1-BC ₃ (B6923)

实验方法:

PAT/bar 通过消耗乙酰辅酶 A (AcCoA) 将草铵膦乙酰化, 辅酶 A (CoA) 的游离巯基基团可以与 Ellman 试剂 (5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)) 发生反应。在此反应期间会生成黄色产物, 可以通过监测黄色产物随时间的变化来检测 PAT/bar 蛋白的活性。

PAT/bar 蛋白检测

溶液:

0.4 mg DTNB/mL 100 mM TRIS/C1 pH = 7.5

9.75 mg PPT/ mL miQ

20.2 mg AcCoA/ mL miQ

测量:

968 uL DTNB

2 uL PPT

20 uL AcCoA

10 uL sample

在 412 nm 下检测光密度值 (OD)，在 25 °C 时绘制标准曲线 (包含除样品外的所有溶液)。1 个单位被定义为在 25 °C 时 412 nm 下每分钟增加 1 OD。

结果和结论

经证实引入 *bar* 基因没有在乙酰转移酶活性背景上增加特定的 PAT/*bar* 蛋白活性。这与预期相符，由于 PSsuAra 启动子只在绿色组织中指导表达。

表 5：PAT/*bar* 蛋白在不同世代的表达情况

样品	mg prot/ml	PAT/ <i>bar</i> U/ml	μg PAT/ <i>bar</i>	μg PAT/ <i>bar</i> /mg prot
Ms1 T ₁ A	2.8	0.50	2.9	1.1
Ms1 T ₁ B	2.8	0.34	2.0	0.7
	3.5	0.35	2.1	0.5
Ms1 T ₃ A	2.5	0.22	1.3	0.5
Ms1 T ₃ B				
Ms1-BC ₄ (93B0498) A	3.4	0.51	3.0	0.9
Ms1-BC ₄ (93B0498) B	3.6	0.64	3.8	1.1
Ms1-BC ₄ (B4973) A	2.9	0.82	4.8	1.6
Ms1-BC ₄ (B4973) B	2.7	0.67	3.9	1.5
Rf1-S ₁ A	1.7	0.54	3.2	1.9
Rf1-S ₁ B	3.6	0.77	4.5	1.2
Rf1-S ₃ A	4.8	1.15	6.8	1.4
Rf1-S ₃ B	3.6	0.69	4.1	1.1
Rf1-BC ₃ (B6907) A	3.8	1.01	5.9	1.6
Rf1-BC ₃ (B6907) B	2.9	0.64	3.8	1.3
Rf1-BC ₃ (B6923) A	2.4	0.75	4.4	1.8
Rf1-BC ₃ (B6923) B	3.0	0.75	4.4	1.5
Drakkar (对照)	2.8	0.00	0.00	0.00

a) 用 Biorad 的 Dc 蛋白检测法 (Lowry 法) 测定蛋白浓度，用 BSA 作为标准物质。

b) ug PAT/*bar* 是通过具体酶活 170 U/mg PAT/*bar* 估计而来的。

PAT/*bar* 蛋白的检测结果清楚地表明在不同的油菜世代中，外源基因的表达量是稳定的。

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，油菜 Ms1Rf1 采用的基因操作为农杆菌介导的转化法。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，用于油菜 Ms1Rf1 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。

为了分析 Ms1 和 Rf1 转基因油菜后代的 *barnase* 和 *barstar* 嵌合基因构建体的整合以及遗传稳定性。实验方法是基于 Southern 印迹杂交的分子分析。

植物材料

为了证明整合基因构建体的稳定性，用后代的植株做分子分析。对于雄性不育和育性恢复系，每个转化体的稳定性分析利用了至少 3 个世代的分子检测。每个后代用两个独立的植株来进行分析。用非转基因 Drakkar 作为阴性对照。

植物材料

植物材料	备注
Ms1 后代:	
T ₁ (B91-4)	Ms1-T ₁
T ₃ (B91-4)	Ms1-T ₃
B91-4 的 BC ₄ 加拿大 SOSR2	Ms1-BC ₄
B91-4 的 BC ₅ 欧洲 SOSR6	Ms1-BC ₅
Rf1 后代:	
S ₁ (B93-101)	Rf1-S ₁
S ₃ (B93-101)	Rf1-S ₃
B93-101 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Rf1-BC ₃ (B6907)
B93-101 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Rf1-BC ₃ (B6923)

实验方法

按照 Dellaporta *et al.* (1983) 的方法从相应植物组织中提取总 DNA，然后用 *EcoRV* 酶消化，该酶在 T-DNA 片段上有单一酶切位点，定位于 TA29 启动子片段。与 TA29 启动子片段杂交后，两个期望杂交条带是覆盖转化 DNA 整合位点左右两侧方向的染色体组 DNA 片段。这意味着对于雄性不育植株，片段大小为 9 和 13kb，对于育性恢复基因植株，片段大小为 10 和 5kb。T-DNA 的线性示意图见图 9 (pTTM8RE) 和图 10 (PTVE74RE)。

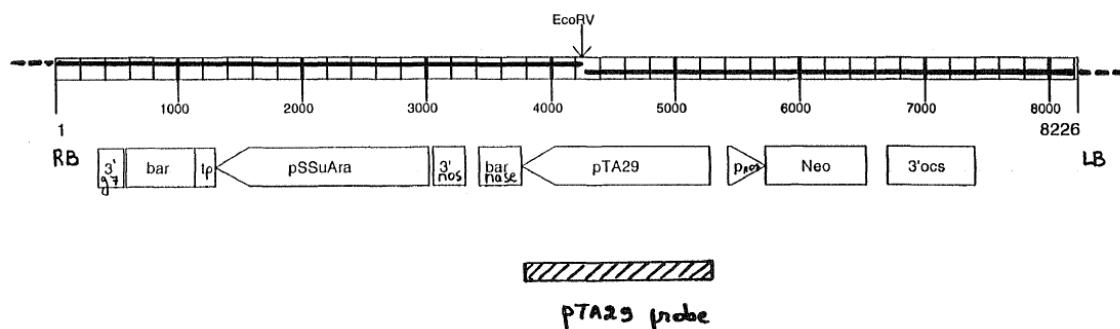


图 9: Southern 杂交的线性示意图 (Ms1)

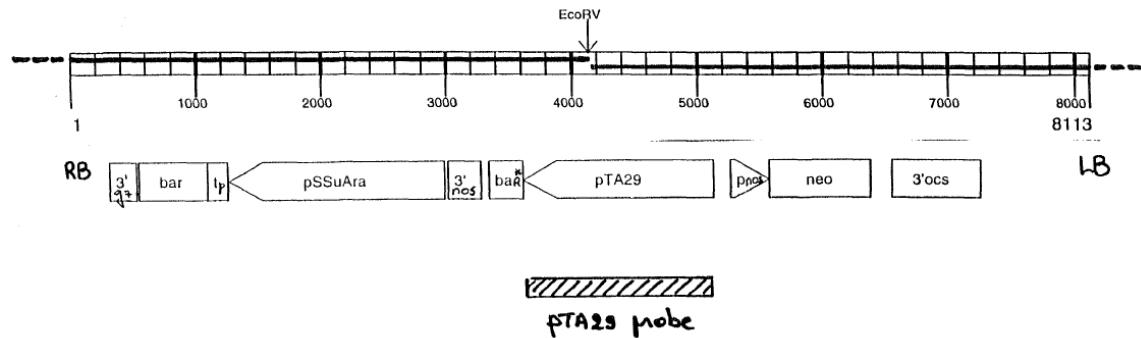


图 10: Southern 杂交的线性示意图 (Rf1)

结果与结论

图 9 和 10 为 pTTM8RE 和 PTVE74RE 相应 T-DNA 边界重复序列间的 DNA 片段的图示。图示显示了转化 DNA 上的 *EcoRV* 酶切位点, 作为探针的 TA29 启动子片段和预期的杂交条带大小。

用 TA29 探针对雄性不育基因植株不同世代(T_1 , T_3 , BC_4 和 BC_5)及育性恢复基因植株不同世代(S_1 , S_3 和 BC_3)进行的 Southern 印记杂交放射自显影结果显示于图 11。在各个世代都鉴定到了预期的杂交结果。

总之, 本研究的分析结果证明在不同世代及不同遗传背景下 T-DNA 的插入稳定遗传。

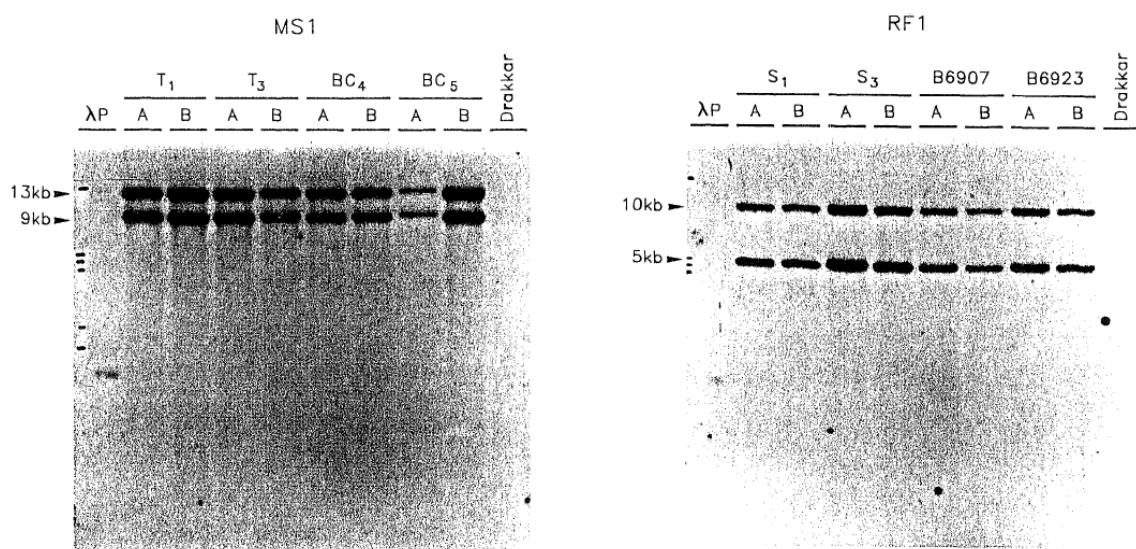


图 11: Ms1Rf1 遗传稳定性的 southern 杂交结果

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。

拜耳作物科学公司在不同国家的田间试验表明转基因油菜 Ms1Rf1 与非转基因对照 Drakkar 以及当地的对照品种间在种子成苗率和种子活力参数不存在差异。

表 6：转基因油菜 Ms1Rf1 和非转基因油菜对照的每平方米的成苗率比较

	比利时 (株)	美国 (株)
Ms1Rf1	82	119
Drakka	77	115
当地对照 1	93	154
当地对照 2	90	230

注：每个国家的数据为 4 个不同小区的平均值。

表 7：转基因油菜 Ms1Rf1 和非转基因油菜对照的种子活力比较

	比利时 ¹	美国 ²	加拿大 ³
Ms1Rf1	4.3	7.5	9.00
Drakka	4.0	7.3	8.50
当地对照	5.0	7.8	10.00
	5.0	8.3	9.75

注：1：比利时采用的种子活力评估标准范围是：1~5，1 表示活力很低，5 表示活力很高

2：美国采用的种子活力评估标准范围是 1~9：1 表示活力很低，9 表示活力很高

3：加拿大采用的种子活力评估范围是 1~10：1 表示活力很低，10 表示活力很高

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。

拜耳作物科学公司在不同国家的田间试验表明转基因油菜 Ms1Rf1 与非转基因对照 Drakkar 以及当地的对照品种间在种子产量没有差异。

表 8: 转基因油菜 Ms1Rf1 和非转基因油菜对照的种子产量 (kg/ha) 比较

	比利时	法国 Paris Sud	法国 Paris Sud	UK	瑞典	加拿大 Guelph	加拿大 Saskatoon
Ms1Rf1	3744	2363	1925	980	1914	2644	2783
Drakka	4504	2447	1770	1090	1989	2590	2723
当地对照	3888	2052	1886	1570	2174	2648	2743

3.2.3 休眠期;

发芽能力是检测休眠的关键参数。正如上文所述, 转基因油菜种子发芽能力的与非转基因油菜没有不同。

2002 年冬天, 由中国农业科学院油料作物研究所在冬油菜和春油菜区分别进行了休眠性检测。结果表明: 在冬油菜区休眠期不存在差异, 且休眠性与埋藏深度没有关系。而在春油菜区, 品种间不存在休眠性差异, 但是休眠性受埋藏深度影响明显。原因是春油菜区在试验期间雨水少, 空气相对湿度小, 气温低。因此深层土壤含水量小, 土温低, 种子不宜萌发或腐烂。种子子深层土壤易处于休眠状态。

表 9: 冬油菜区种子一年休眠期在品种和埋藏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 10: 春油菜区种子一年休眠期在品种和埋藏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			

3.2.4 适应性;

转基因植株和非转基因植株在适应性和成长结实方面没有显示任何不同。

3.2.5 生存竞争能力：

2002年9月~2003年11月,由中国农业科学院油料作物研究所开展的转基因油菜在农田和荒地的生存竞争能力。

在自然荒地条件下,白芥的抗逆性强于甘蓝型油菜,种子发芽、幼苗成株率高显示其抗旱、抗虫、抗瘠等能力强。甘蓝型油菜品种间的差异表现也不同,转基因油菜和非转基因油菜也检测到了差异,但,这一结果不能推测转基因改变品中抗逆性。转基因品中的成株率在参见的15个品种中处于中间或偏低水平。

表11: 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12: 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

此外,在本次试验中还进行了适合度分析进而来分析在自然条件下的生存竞争

能力。本试验的适合度是指在自然或栽培条件下油菜通过有性繁殖后代的成株数和父代的成株数比率。理论上通过该指标的检测可以判断一个物种在自然界的繁衍生存能力。如果一个物种的适合度大于 1，表明该物种在没有人工干预的自然条件下将逐渐扩大。如果适合度小于 1，则说明该物种的种群数量在自然条件下将逐渐减少；如果等于 1，在自然界该物种的种群数量保持平衡。

表 13：荒地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	0.00422	0.00141	0.779	2.83	
处理间	14	0.10845	0.00775	4.282**	1.94	2.54
误差	42	0.07603	0.00181			
总变异	59	0.18870				

表 14：荒地转基因与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	0.2475	a	A
Ms1Rf1	0.1850	b	B
OXY235	0.1750	c	C
CH03	0.1700	d	D
青油 14 号	0.1675	de	DE
Ms8Rf3	0.1675	de	DE
CH06	0.1650	e	E
CH07	0.1575	f	F
Topas 19/2	0.1575	f	F
CH02	0.1550	f	F
T45	0.1550	f	F
CH04	0.1500	g	G
Ms1Rf2	0.1475	g	G
CH05	0.1100	h	H
CH01	0.1025	i	I
白芥	0.0050	j	J

上述结果表明：非转基因油菜中双 7 号的适合度最高，与其他品种的适合度有明显差异。转基因油菜 Ms1Rf1 位于第二位，但非转基因油菜中双 7 号有明显差异。尽管品种间适合度差异显著，但是都小于 0.3，表明这些品种在自然条件下种群很难扩大。

3.2.6 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；

1. 垂直基因漂移

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，这意味着杂交种和他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% 杂种种子），且这些杂交种能产生少量的种子和可育的后代。即便基因转移能够发生，可能的融合基因 *barstar-bar*，或 *barnase-bar* 也不存在任何优势，因为在自然界中缺乏抗草铵膦性状选择压力。

2. 水平基因漂移

由于植物和微生物之间的 DNA 同源性很低，因此即使发生植物向微生物间的基因转移也是在进化时间上需要几千年的时间。即使这样的转移可能发生，基因转移至微生物中也并不会造成风险，因为 *bar* 基因本身就是来自于微生物中。

3. 国内异交率检测结果

2002 年 7 月到 2003 年 9 月由华中农业大学在冬油菜区和春油菜区开展了油菜异交率的检测。检测结果表明：在田间自然授粉条件下，转基因抗除草剂油菜 Ms1Rf1 与中国的甘蓝型油菜品中间存在一定的异交率，与白菜型油菜及其变种和芥菜型油菜间也存在一定比例的天然异交率。而在芸苔属的黑芥和甘蓝及其变种、其它属的白芥、新疆野油菜、诸葛菜、芥菜、菘蓝和萝卜为转基因油菜的花粉受体时，未检测到杂种植株。

3.2.7 转变成杂草的可能性；

油菜 Ms1Rf1 表达 PAT/bar 蛋白，因此赋予植株抵抗灭生性除草剂草铵膦的性状，与此同时并不会增加其成为杂草的可能性（与现在商业化的油菜相比）。田间试验结果表明 Ms1Rf1 在正常的农事操作条件下没有转变成杂草的可能性。即使油菜 *B. napus* 具有自生苗，却并不被视为一种杂草。引入的与环境相关的性状——抗草铵膦，增加油菜杂草化的可能性并不大，因为草铵膦并不是作物防治杂草的唯一选择。由于抗草铵膦性状并不赋予植株抗虫性特征或者任何改变其生存能力的生理性特征，因此这一性状改变并不会赋予 Ms1Rf1 相对于现在商业化的油菜的竞争优势。

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；

不适用，因为 Ms1Rf1 油菜为抗除草剂性状产品，不存在靶标生物和非靶标生

物。

2002 年 7 月到 2003 年 10 月由华中农业大学在冬油菜区和春油菜区均开展的对生物多样性进行了检测。试验采用随机区组排列，试验中除了转基因油菜和非转基因油菜对照外，还包括当地对照品种。在油菜的生长周期中，共进行 4 次田间调查，调查采用 5 点取样法，系统调查各小区的所有昆虫类型和数量。

检测结果表明无论在春油菜区还是在冬油菜区，在油菜的生长苗期，抽薹期，花期，结荚期、成熟期供试的转基因油菜 Ms1Rf1 植株上的小菜蛾、蚜虫、潜叶蝇、茎象甲，其它害虫和害虫天敌的发生数量与当地的对照品种和非转基因对照品种之间基本无明显差异。在同样的试验条件下，该转基因油菜品种田间节肢动物生物多样性指数----SHANNON-WIENER 指数与当地的对照品种和非转基因对照品种之间基本无明显差异。

3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用。

在加拿大和欧洲进行的 Ms1 和 Rf1 油菜以及他们的杂交品种 Ms1Rf1 的所有田间试验中，均未发现对有益生物（例如蜜蜂或蚯蚓）具有有害或伤害现象。此外，由于油菜中引入的基因或基因表达的酶都没有显示出任何毒性，因此不认为转基因油菜会对有益生物造成伤害作用或显著影响。

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；小鼠进行经口急性毒性研究和大鼠 90 天喂养试验。由于下文中的有些试验数据的产生是利用大肠杆菌表达的 PAT/*bar* 蛋白进行的，因此，拜耳作物科学公司进行了体外表达蛋白（大肠杆菌表达蛋白）和植物表达的蛋白的实质等同性。

1) 安全应用历史：

膦丝菌素乙酰转移酶（PAT）蛋白是由 20 世纪 80 年代中叶从吸水链霉菌中分离出的 *bar* 基因编码的。吸水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。

链霉菌属细菌在 1916 年被首次描述。链霉菌属细菌属于革兰氏阳性产孢土壤微生物，常被称为放线菌。吸水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 *bar* 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。据知，吸水链霉菌不属于植物、人类或其他动物的致病菌，而 PAT 蛋白像其他乙酰转移酶一样，据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。

2) PAT/*bar* 蛋白的实质等同性

利用抗体吸附柱分离大肠杆菌和转基因油菜 Ms1Rf1 中的 PAT/*bar* 蛋白。进而通过 SDS-PAGE 和 WesternBlot 来对两种来源的蛋白进行了等同性分析。SDS-PAGE 如图 12（左）所示，泳道 1 和 3 是大肠杆菌表达的 PAT/*bar* 蛋白，泳道 2 为植物表达 PAT/*bar* 蛋白；泳道 4 为蛋白分析量，分别为：150、75、50、25、10kDa；泳道 5 为空白泳道。图 12（右）为 Western 杂交结果：泳道 1 和 3 是大肠杆菌表达的 PAT/*bar* 蛋白，泳道 2 为植物表达 PAT/*bar* 蛋白；泳道 5 为蛋白

分析量，分别为：150、75、50、25、10kDa；泳道4为空白泳道。Ms1Rf1油菜表达的PAT/bar蛋白和大肠杆菌表达的PAT/bar蛋白是一致的，且未发现PAT/bar蛋白发生糖基化。

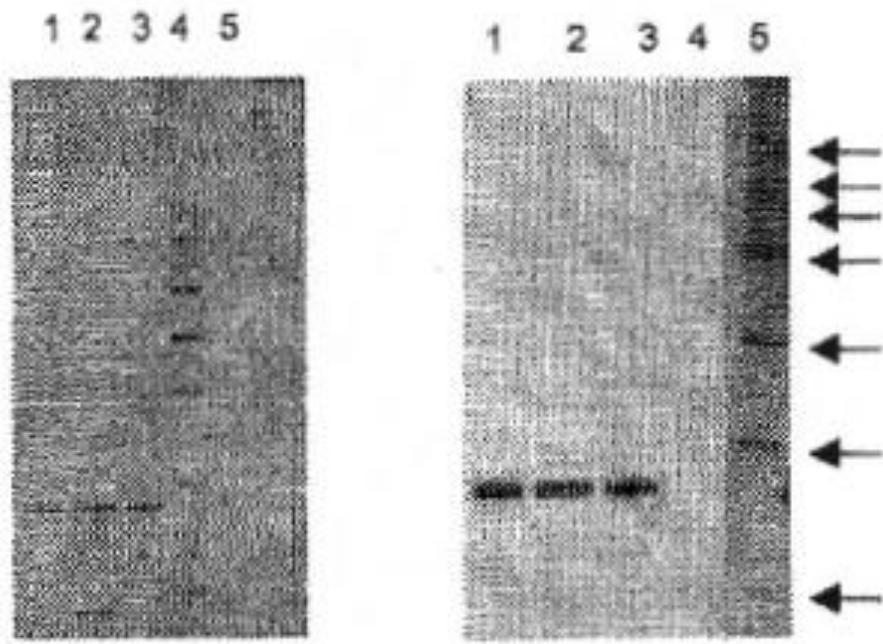


图 12：大肠杆菌和转基因油菜 Ms1Rf1 中的 PAT/bar 蛋白实质等同性分析

3) 与已知毒素的同源性检索

利用计算机模拟方法，评价了 PAT/bar 蛋白与已知毒素可能存在的氨基酸序列相似性。

与以下大型公共参比数据库中的所有蛋白质序列进行了全序列一致性检索：Uniprot_Swissprot，Uniprot_TrEMBL，PDB，DAD 和 GenPept。然后根据BLASTP2.2.2 计算方法和 BLOSUM62 矩阵得分 (scoring matrix)，如某一蛋白质的全部氨基酸序列与已知的毒性蛋白的 80 个氨基酸有 35% 的等同性，则认为该蛋白与已知毒性蛋白具有同源性。

与预期的结果一样，对 PAT/bar 蛋白进行的全序列同源性检索结果表明，该蛋白只与来源于各种细菌的其它乙酰转移酶蛋白具有主要的相似性。此外，未发现与拜耳毒素数据库中的任何毒蛋白存在显著的相似性。因此，没有证据表明 PAT/bar 蛋白具有潜在毒性。

4) 急性毒性研究：

PAT/bar 蛋白

拜耳作物科学公司为了评估 PAT/bar 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（由于 PAT/bar 蛋白的溶解度有限，2000 mg/kg 体重是能达到的最高浓度），对包含 10 只雄鼠和 10 只雌鼠 (C57BL/6J) 的一组小鼠饲喂 PAT/bar 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 2000mg/kg 体重的 PAT/bar 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 2000mg/kg 体重的 PAT/bar 蛋白后，对雄/雌 C57BL/6J 小鼠不会产生任何全身中毒症状。

Barnase 和 Barstar 蛋白

Barnase 和 Barstar 蛋白受启动子 pta29 调控，因此不能像 PAT/bar 蛋白一样在植物整个生长周期组成型表达。Pta29 启动子可以调控基因在植物的花药绒毡层高特异性表达，利用高灵敏度的 Western 杂交方法仅在特定时期的特性组织中能够检测到 Barnase 和 Barstar 蛋白的痕量表达，其它的植物组织（如：种子叶片）均不能检测到 Barnase 和 Barstar 蛋白。

由于该申请为进口用作加工原料，在获得农业部批准后，Ms1Rf1 只会用作加工原料，不会用作种植，因此，仅在花期特定时期利用高灵敏性检测方法检测到的痕量的 Barnase 和 Barstar 蛋白在中国暴露的可能性几乎为零。

5) 大鼠喂养试验：

2003 年，由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所开展的 Ms1Rf1 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 Ms1Rf1 粉掺入饲料（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 Ms1Rf1 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。

3.3.2 过敏性；

拜耳作物科学公司进行了与已知过敏原的同源性比对、热稳定性实验和模拟胃液消化实验以全面的评价油菜中外源蛋白 PAT/bar, Barnase 和 Barstar 蛋白的致敏性。

1) 与已知过敏原氨基酸序列同源性检索

PAT/bar 蛋白

通过生物信息学评估放大可以比较蛋白质之间氨基酸序列的相似性及其程度，从而在一定程度上评估某种蛋白质是不是过敏原。拜耳作物科学公司利用 Silico 方法对 PAT/bar 蛋白氨基酸与已知致敏物氨基酸序列进行了分析。Silico 方法包括使用 BLAST 程序比较查询氨基酸序列，与不同的数据库进行比较，列出相似区域并进行计算相似值。

与以下大型公共参比数据库中的所有蛋白质序列进行了全序列一致性检索：Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PDB, DAD 和 GenPept。然后根据 BLASTP2.2.2 计算方法和 BLOSUM62 矩阵得分（scoring matrix），如某一蛋白质的全部氨基酸序列与已知的毒性蛋白的 80 个氨基酸有 35% 的等同性，则认为该蛋白与已知致敏物具有同源性。结果表明 PAT/bar 蛋白不具有致敏性。

热稳定性分析

PAT/bar 蛋白

测试了 PAT/bar 蛋白（由 *bar* 基因编码）于 60, 75, 90 °C 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 *bar* 基因编码的 PAT/bar 蛋白条带 (SDS-PAGE 检测) 在 90 °C 加热 60 min 后没有显著性变化。

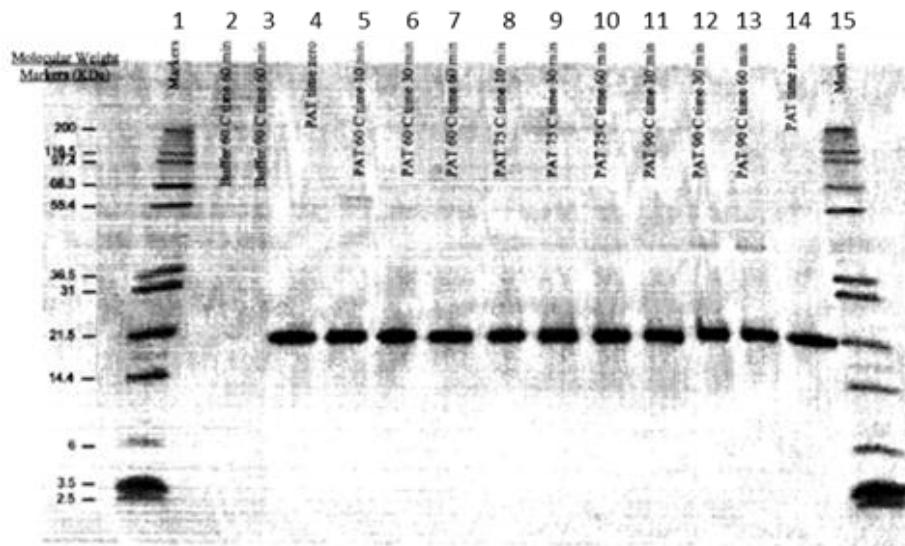


图 13: PAT/bar 蛋白热稳定性

泳道设计从左至右依次如下：

泳道 1: 分子量标记
泳道 2: 缓冲液 60°C 加热 60 分钟
泳道 3: 缓冲液 90°C 加热 60 分钟
泳道 4: PAT/bar 蛋白不加热
泳道 5: PAT/bar 蛋白 60°C 加热 10 分钟
泳道 6: PAT/bar 蛋白 60°C 加热 30 分钟
泳道 7: PAT/bar 蛋白 60°C 加热 60 分钟
泳道 8: PAT/bar 蛋白 75°C 加热 10 分钟

泳道 9: PAT/bar 蛋白 75°C 加热 30 分钟
泳道 10: PAT/bar 蛋白 75°C 加热 60 分钟
泳道 11: PAT/bar 蛋白 90°C 加热 10 分钟
泳道 12: PAT/bar 蛋白 90°C 加热 30 分钟
泳道 13: PAT/bar 蛋白 90°C 加热 60 分钟
泳道 14: PAT/bar 蛋白不加热
泳道 15: 分子量标记

Barnase 蛋白

通过 SDS-PAGE 和 Western 杂交来评估 Barnase 蛋白的热稳定性。分别在 4 °C, 25 °C, 37 °C, 55 °C, 75 °C 和 95 °C 条件下将 Barnase 蛋白孵育 30 min, 然后利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交进行检测。4 °C 条件下孵育的 Barnase 蛋白用于与其他温度孵育蛋白进行比较。

SDS-PAGE 和 Western 杂交检测产生了相似的结果。Barnase 蛋白在 25 °C, 37 °C 和 55 °C 绝大部分的 Barnase 蛋白依然在上清液中。在 55 °C 处理条件下出现了分子量小于 Barnase 的条带, 表明 Barnase 正在降解, 在 75 °C 和 95 °C 条件下处理 30 min 后, 出现了大量的降解条带。SDS-PAGE 和 Western 杂交均显示在 95 °C 处理下 Barnase 蛋白条带浓度降低了。该结果表明 55 °C 热处理后, Barnase 蛋白开始降解, 因此 Barnase 蛋白在 55 °C 以上温度的热处理是不稳定的。

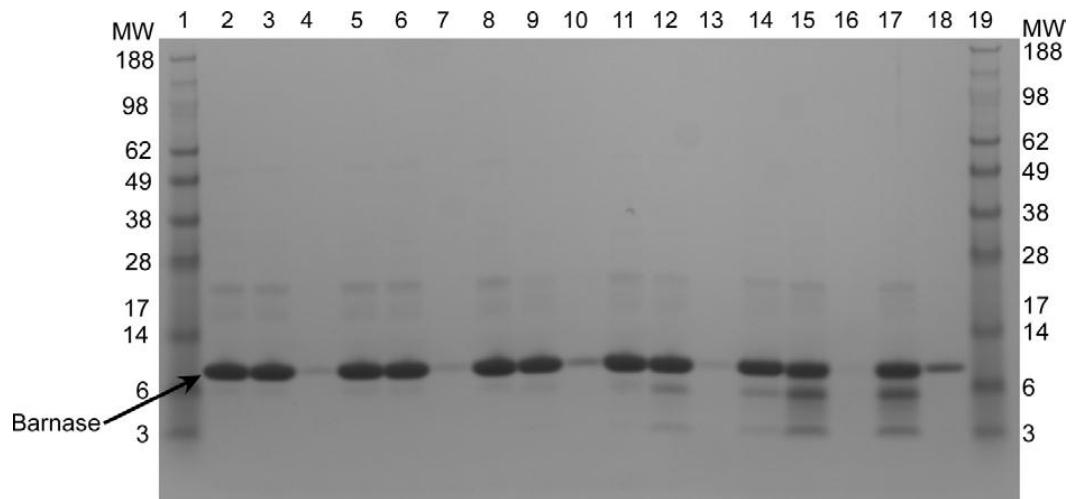


图 14: SDS—PAGE 检测 Barnase 蛋白热稳定性

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: 4°C孵育的 Barnase 蛋白 (5 μ g)

泳道 3: 25 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (5 μ g)

泳道 4: 25 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀 (5 μ g)

泳道 5: 未离心的 25 °C孵育的 Barnase (5 μ g)

泳道 6: 37 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (5 μ g)

泳道 7: 37 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀 (5 μ g)

泳道 8: 未离心的 37 °C孵育的 Barnase (5 μ g)

泳道 9: 55 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (5 μ g)

泳道 10: 55 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀 (5 μ g)

泳道 11: 未离心的 55 °C孵育的 Barnase (5 μ g)

泳道 12: 75 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (5 μ g)

泳道 13: 75 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀 (5 μ g)

泳道 14: 未离心的 75 °C孵育的 Barnase (5 μ g)

泳道 15: 95 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (5 μ g)

泳道 16: 95 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀 (5 μ g)

泳道 17: 未离心的 95 °C孵育的 Barnase (5 μ g)

泳道 18: 4°C孵育的 Barnase 蛋白 (0.5 μ g)

泳道 19: 分子量标记

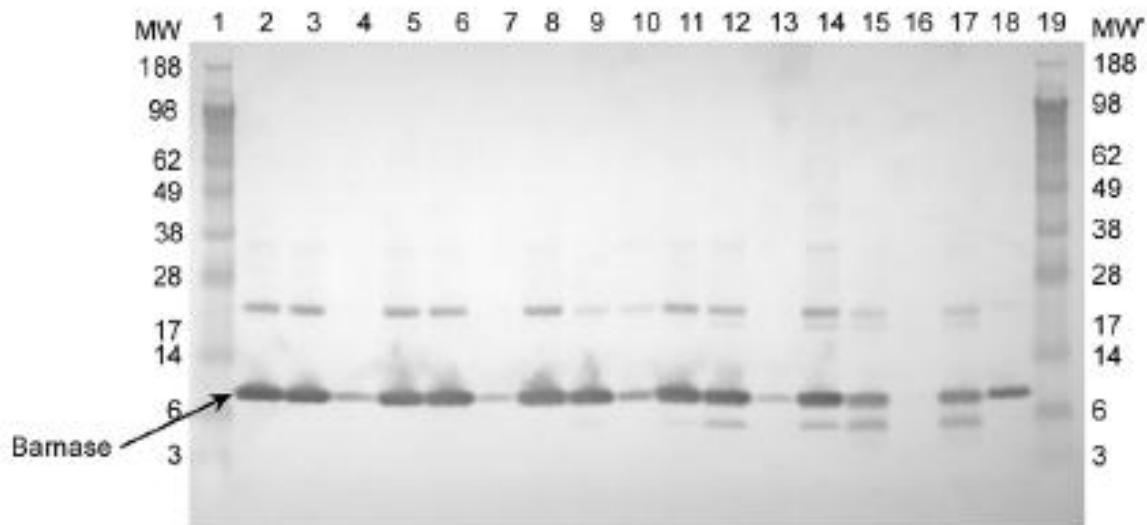


图 15: Western 杂交检测 Barnase 蛋白热稳定性

泳道 1: 分子量标记

泳道 2: 4°C孵育的 Barnase 蛋白 (250 ng)

泳道 3: 25°C孵育的 Barnase 离心后的上清液(250ng)

泳道 4: 25 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀(250ng)

泳道 5: 未离心的 25 °C孵育的 Barnase(250ng)

泳道 6: 37 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液(250ng)

泳道 7: 37 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀(250ng)

泳道 8: 未离心的 37 °C孵育的 Barnase(250ng)

泳道 9: 55 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液 (250ng))

泳道 10: 55 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀(250ng)

泳道 11: 未离心的 55 °C孵育的 Barnase(250ng)

泳道 12: 75 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液(250ng)

泳道 13: 75 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀(250ng)

泳道 14: 未离心的 75 °C孵育的 Barnase(250ng)

泳道 15: 95 °C孵育的 Barnase 离心后的上清液(250ng)

泳道 16: 95 °C孵育的 Barnase 离心后的沉淀(250ng)

泳道 17: 未离心的 95 °C孵育的 Barnase(250ng)

泳道 18: 4°C孵育的 Barnase 蛋白(25ng)

泳道 19: 分子量标记

Barstar 蛋白

通过 SDS-PAGE 和 Western 杂交来评估 Barstar 蛋白的热稳定性。分别在 4°C, 25 °C, 37 °C, 55 °C, 75 °C 和 95°C 条件下将 Barstar 蛋白孵育 30 min, 然后利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交进行检测。4 °C 条件下孵育的 Barstar 蛋白在本研究中用作对照。在本研究中每个温度处理下均有两个重复样品 (除 4 °C 条件外), 孵育完成后, 将其中一个样品进行离心, 离心后的上清液和沉淀均进行 SDS-PAGE 和 Western 杂交; 另一个样品重复不需离心, 直接进行 SDS-PAGE 和 Western 杂交。

Barstar 蛋白在 25 °C, 37 °C 和 55 °C 绝大部分的 Barstar 蛋白依然在上清液中。在 75 °C 和 95°C 条件下处理 30 min 后, 仅有一小部分蛋白形成了沉淀, 大部分还是留在上清液中。此外, 在 95°C 处理下 Barstar 蛋白形成了多聚体, 且多聚体也是溶解在上清液中的。这表明在 95°C 热处理后, Barstar 蛋白可以形成可溶的多聚体, 最初的蛋白结构在 95 °C 条件下热处理不稳定。

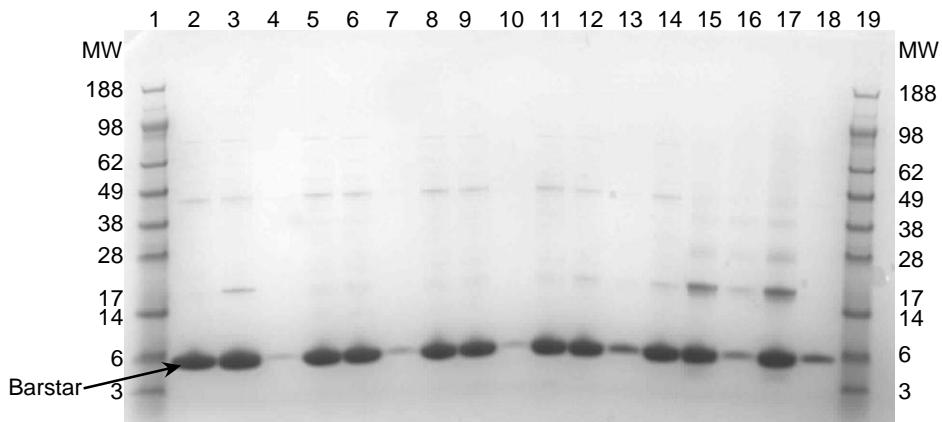


图 16: SDS—PAGE 检测 Barstar 蛋白热稳定性

- | | |
|--|---|
| 泳道 1: 分子量标记 | 泳道 11: 未离心的 55 °C 孵育的 Barstar (5 μg) |
| 泳道 2: 4°C 孵育的 Barstar 蛋白 (5 μg) | 泳道 12: 75 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (5 μg) |
| 泳道 3: 25 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (5 μg) | 泳道 13: 75 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (5 μg) |
| 泳道 4: 25 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (5 μg) | 泳道 14: 未离心的 75 °C 孵育的 Barstar (5 μg) |
| 泳道 5: 未离心的 25 °C 孵育的 Barstar (5 μg) | 泳道 15: 95 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (5 μg) |
| 泳道 6: 37 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (5 μg) | 泳道 16: 95 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (5 μg) |
| 泳道 7: 37 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (5 μg) | 泳道 17: 未离心的 95 °C 孵育的 Barstar (5 μg) |
| 泳道 8: 未离心的 37 °C 孵育的 Barstar (5 μg) | 泳道 18: 4°C 孵育的 Barstar 蛋白 (0.5 μg) |
| 泳道 9: 55 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (5 μg) | 泳道 19: 分子量标记 |
| 泳道 10: 55 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (5 μg) | |

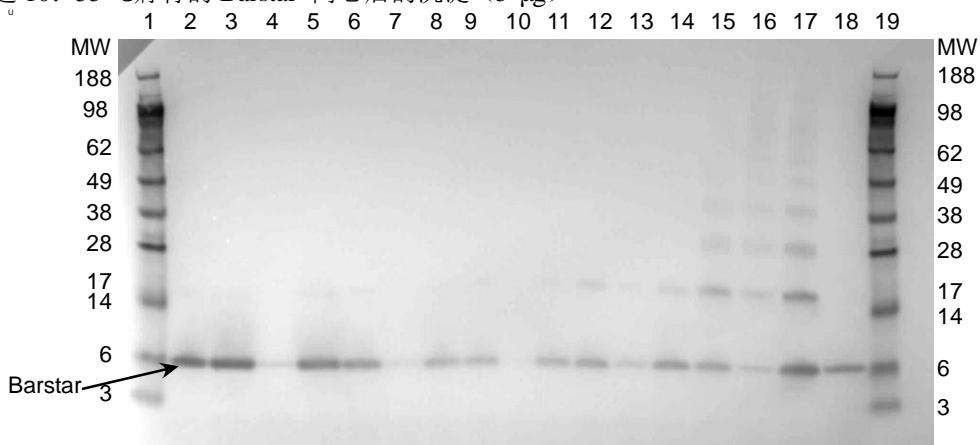


图 17: Western 杂交检测 Barstar 蛋白热稳定性

- | | |
|--|---|
| 泳道 1: 分子量标记 | 泳道 11: 未离心的 55 °C 孵育的 Barstar (250 ng) |
| 泳道 2: 4°C 孵育的 Barstar 蛋白 (250 ng) | 泳道 12: 75 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (250 ng) |
| 泳道 3: 25 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (250 ng) | 泳道 13: 75 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (250 ng) |
| 泳道 4: 25 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (250 ng) | 泳道 14: 未离心的 75 °C 孵育的 Barstar (250 ng) |
| 泳道 5: 未离心的 25 °C 孵育的 Barstar (250 ng) | 泳道 15: 95 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (250 ng) |
| 泳道 6: 37 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (250 ng) | 泳道 16: 95 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (250 ng) |
| 泳道 7: 37 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (250 ng) | 泳道 17: 未离心的 95 °C 孵育的 Barstar (250 ng) |
| 泳道 8: 未离心的 37 °C 孵育的 Barstar (250 ng) | 泳道 18: 4°C 孵育的 Barstar 蛋白 (25ng) |
| 泳道 9: 55 °C 孵育的 Barstar 离心后的上清液 (250 ng) | 泳道 19: 分子量标记 |
| 泳道 10: 55 °C 孵育的 Barstar 离心后的沉淀 (250 ng) | |

iii) 体外模拟胃液消化

PAT/bar 蛋白

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/bar 蛋白 (由 bar 基因编码, 大肠杆菌表达) 的可消化性。这一方案与国际推荐草案一致。

在大约 37°C 下, 将测试蛋白溶液或参比蛋白溶液用模拟的人体胃液 (pH1.2 的胃蛋白酶溶液) 孵育, 在 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min 这几个时间点取样进行分析。通过 SDS-PAGE 和 Western 杂交印迹, 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。免疫杂交检测所用的单克隆抗体能直接检测 PAT/bar 蛋白。相应的对照包括: pH1.2 无胃蛋白酶存在的测试蛋白溶液, 无测试蛋白的模拟的人体胃液, 含 10 倍稀释的测试蛋白的 10% 的上样对照 (以证实蛋白质染色程序的灵敏度)。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) 和已知可被缓慢消化的参比蛋白卵清蛋白 (OVA)。

参照蛋白 HRP 能够快速被分解, 参照蛋白 OVA 被缓慢分解, 这与 ILSI 的循环验证结果是一致的。这些质量控制程序表明了该试验中所用试剂和试验程序是可以检测蛋白模拟胃液消化的。

PAT/bar 蛋白在模拟的人体胃液中被极快速降解, 即在 pH 1.2、胃蛋白酶存在时, 用模拟的胃液孵育不到 0.5 min, 90% 以上的 PAT/bar 蛋白被降解 (图 18~19)。

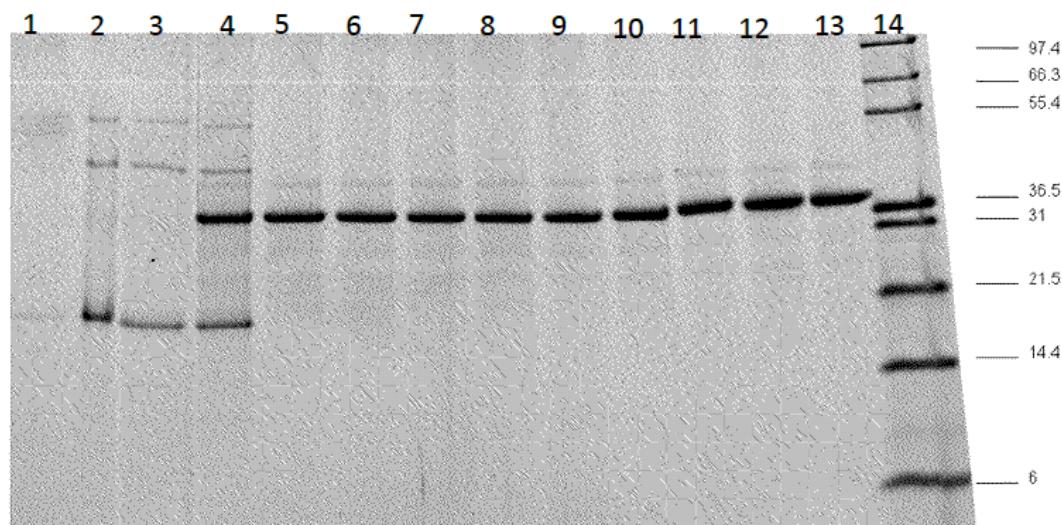


图 18: PAT/bar 蛋白在模拟人体胃液中消化后的考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE

泳道设计如下:

- 泳道 1: 稀释 10 倍的 PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
泳道 2: PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
泳道 3: PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
泳道 4: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
泳道 5: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0.5 分钟
泳道 6: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 2 分钟
泳道 7: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 5 分钟

泳道 8: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 10 分钟

- 泳道 9: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 20 分钟
泳道 10: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 30 分钟
泳道 11: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
泳道 12: 仅有模拟胃液消化 0 分钟
泳道 13: 仅有模拟胃液消化 60 分钟
泳道 14: 分子量标记 (单位为: kDa)

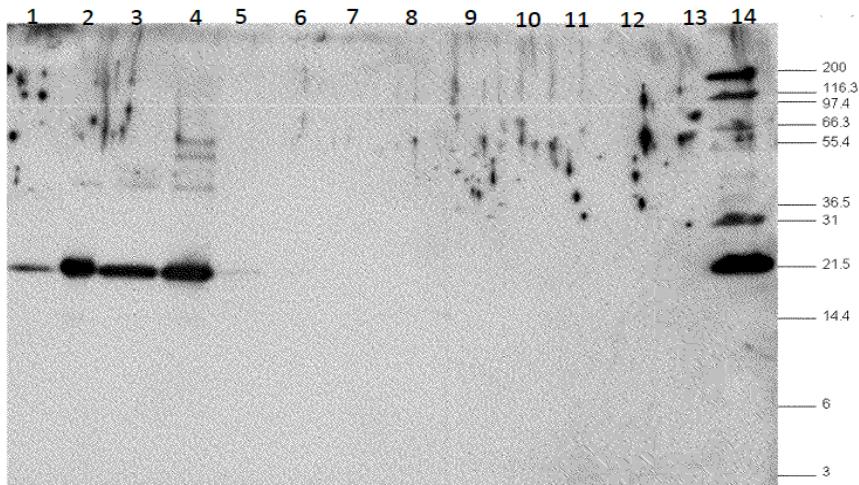


图 19: PAT/bar 蛋白在模拟人体胃液中消化后的 Western 杂交

泳道 1: 稀释 10 倍的 PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下
消化 0 分钟

泳道 2: PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟

泳道 3: PAT/bar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 60 分钟

泳道 4: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0 分钟

泳道 5: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0.5 分钟

泳道 6: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 2 分钟

泳道 7: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 5 分钟

泳道 8: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 10 分钟

泳道 9: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 20 分钟

泳道 10: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 30 分钟

泳道 11: PAT/bar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 60 分钟

泳道 12: 仅有模拟胃液消化 0 分钟

泳道 13: 仅有模拟胃液消化 60 分钟

泳道 14: 分子量标记 (单位为: kDa)

Barnase 蛋白

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 Barnase 蛋白 (由大肠杆菌表达) 的可消化性。

在大约 37°C 下, 将测试蛋白溶液或参比蛋白溶液用模拟的人体胃液 (pH1.2 的胃蛋白酶溶液) 孵育, 在 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min 这几个时间点取样进行分析。通过 SDS-PAGE 和 Western 杂交印迹, 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。免疫杂交检测所用的多克隆抗体能直接检测 Barnase 蛋白。相应的对照包括: pH1.2 无胃蛋白酶存在的测试蛋白溶液, 无测试蛋白的模拟的人体胃液, 含 10 倍稀释的测试蛋白的 10% 的上样对照 (以证实蛋白质染色程序的灵敏度)。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) 和已知可被缓慢消化的参比蛋白卵清蛋白 (OVA)。

参照蛋白 HRP 能够快速被分解, 参照蛋白 OVA 被缓慢分解, 这与 ILSI 的循环验证结果是一致的。这些质量控制程序表明了该试验中所用试剂和试验程序是可以检测蛋白模拟胃液消化的。

在 pH 1.2、胃蛋白酶存在时, 用模拟的胃液孵育不到 0.5 分钟, Barnase 蛋白在模拟的人体胃液中被快速降解 (图 20~21)。

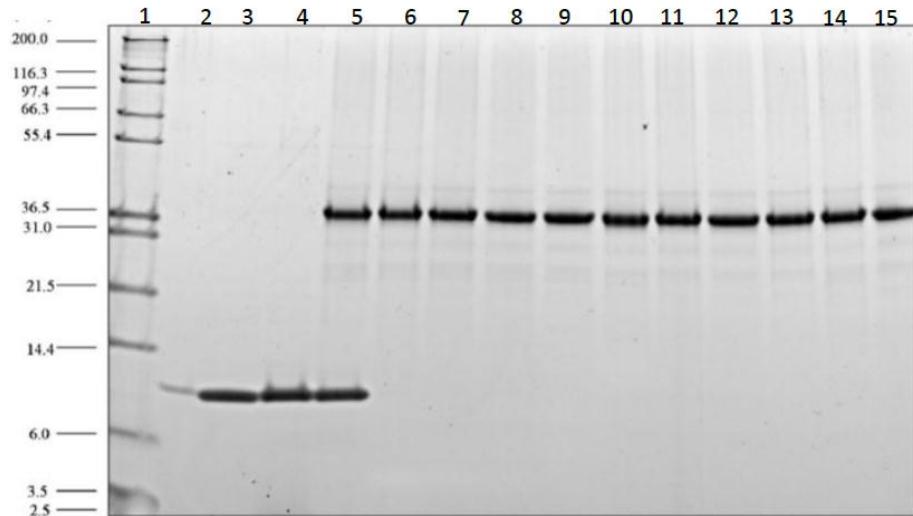


图 20: 考马斯亮蓝染色的 Barnase 蛋白模拟胃液消化的 SDS-PAGE

泳道 1: 分子量标记 (单位为: kDa)
 泳道 2: 稀释 10 倍的 Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 3: Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 4: Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
 泳道 5: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 6: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0.5 分钟
 泳道 7: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 1 分钟
 泳道 8: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 2 分钟

泳道 9: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 5 分钟
 泳道 10: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 10 分钟
 泳道 11: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 20 分钟
 泳道 12: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 30 分钟
 泳道 13: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
 泳道 14: 仅有模拟胃液消化 0 分钟
 泳道 15: 仅有模拟胃液消化 60 分钟

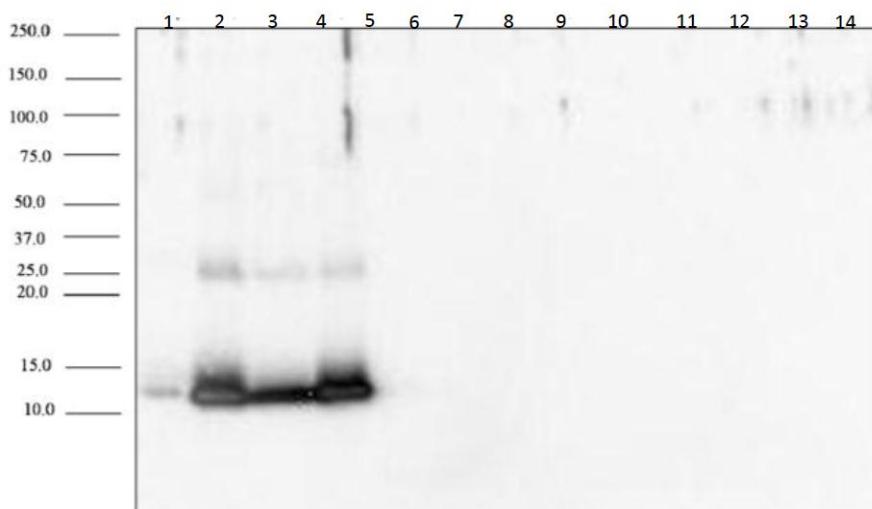


图 21: Barnase 蛋白模拟胃液消化的 Western 杂交

泳道 1: 稀释 10 倍的 Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 2: Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 3: Barnase 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
 泳道 4: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0 分钟
 泳道 5: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0.5 分钟
 泳道 6: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 1 分钟
 泳道 7: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 2 分钟

泳道 8: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 5 分钟
 泳道 9: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 10 分钟
 泳道 10: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 20 分钟
 泳道 11: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 30 分钟
 泳道 12: Barnase 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 60 分钟
 泳道 13: 仅有模拟胃液消化 0 分钟
 泳道 14: 仅有模拟胃液消化 60 分钟

Barstar 蛋白

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 Barstar 蛋白 (由大肠杆菌表达) 的可消化性。

在大约 37°C 下, 将测试蛋白溶液或参比蛋白溶液用模拟的人体胃液 (pH1.2 的胃蛋白酶溶液) 孵育, 在 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min 这几个时间点取样进行分析。通过 SDS-PAGE 和 Western 杂交印迹, 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。免疫杂交检测所用的多克隆抗体能直接检测 Barstar 蛋白。相应的对照包括: pH1.2 无胃蛋白酶存在的测试蛋白溶液, 无测试蛋白的模拟的人体胃液, 含 10 倍稀释的测试蛋白的 10% 的上样对照 (以证实蛋白质染色程序的灵敏度)。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) 和已知可被缓慢消化的参比蛋白卵清蛋白 (OVA)。

参照蛋白 HRP 能够快速被分解, 参照蛋白 OVA 被缓慢分解, 这与 ILSI 的循环验证结果是一致的。这些质量控制程序表明了该试验中所用试剂和试验程序是可以检测蛋白模拟胃液消化的。

在 pH 1.2、胃蛋白酶存在时, 用模拟的胃液孵育不到 0.5 min Barstar 蛋白在模拟的人体胃液中被快速降解。

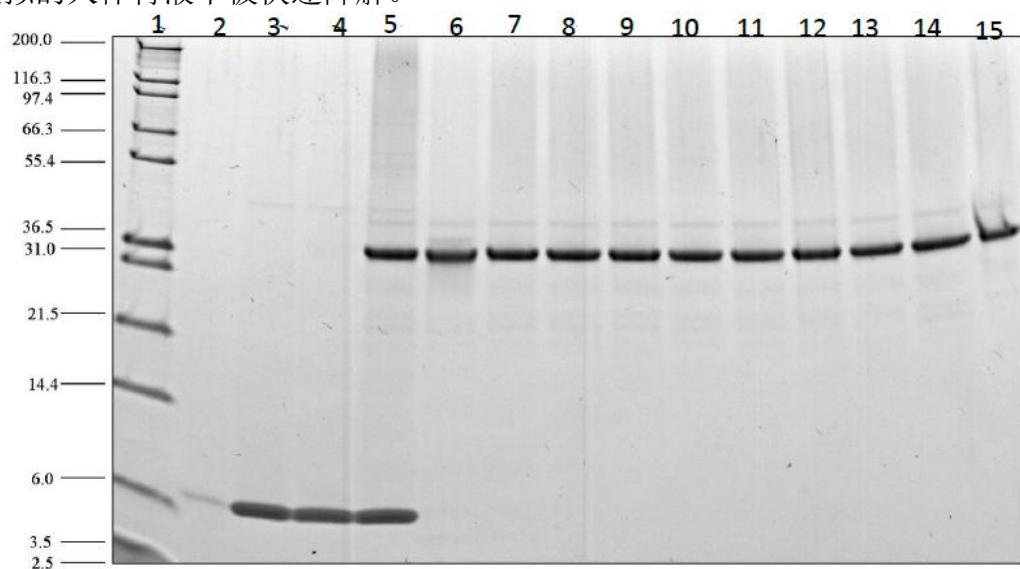


图 22: 考马斯亮蓝染色的 Barstar 蛋白模拟胃液消化的 SDS-PAGE

泳道设计如下:

泳道 1: 分子量标记 (单位为: kDa)

泳道 2: 稀释 10 倍的 Barstar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟

泳道 3: Barstar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 0 分钟

泳道 4: Barstar 蛋白无胃蛋白酶条件下消化 60 分钟

泳道 5: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0 分钟

泳道 6: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 0.5 分钟

泳道 7: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 1 分钟

泳道 8: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 2 分钟

泳道 9: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 5 分钟

泳道 10: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 10 分钟

泳道 11: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 20 分钟

泳道 12: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 30 分钟

泳道 13: Barstar 蛋白有胃蛋白酶条件下消化 60 分钟

泳道 14: 仅有模拟胃液消化 0 分钟

泳道 15: 仅有模拟胃液消化 60 分钟

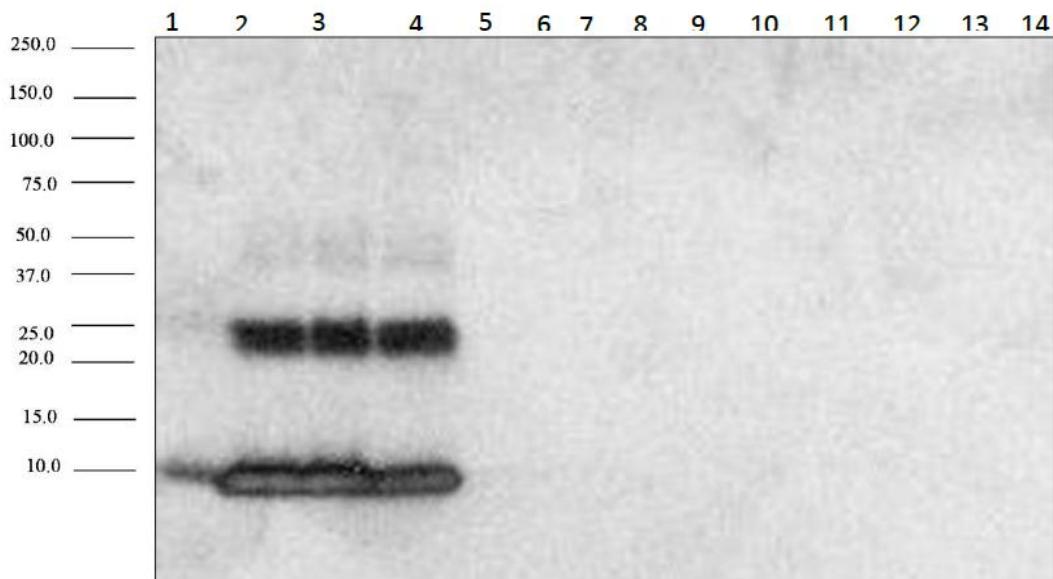


图 23: Barstar 蛋白模拟胃液消化的 Western 杂交

泳道设计如下:

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

3.3.3 抗营养因子;

2003 年~2004 年, 由中国疾病预防控制中心开展了转基因油菜和非转基因油菜对照的抗营养因子检测。检测结果如下:

表 15: 转基因油菜和非转基因油菜抗营养因子检测

样品名称	Ms1Rf1	非转基因对照	检测方法
检测编号	20040094	20040095	
硫代葡萄糖苷 ($\mu\text{mol/g 饼}$)	46.41	31.48	ISO09167-1992、 NY414-2000
芥酸 (%)	1.34	1.62	GB/T17377-1998

3.3.4 营养成份：

为了了解 Ms1Rf1 油菜的营养成分和非转基因对照是否存在差异。拜耳作物科学公司于 1991~1993 年对不同产地和不同加工程序的多批 Ms1Rf1 油菜及其亲本 Ms1 和 Rf1 进行了成分分析。

对不同地区种植的转基因油菜和非转基因油菜受体以及其他常规油菜种植品种进行了成分分析，包括：菜籽油的含量，蛋白、脂肪酸、胆固醇、碳水化合物、生育酚、矿物质、叶绿素、抗营养因子芥酸和硫代葡萄糖苷，以及脂肪酸和硫代葡萄糖苷的组成进行了比较。结果显示，转基因油菜与非转基因油菜在营养成分不存在差异。

表 16：Ms1Rf1 和非转基因油菜籽成分分子（一）-----菜籽油含量（%）

	Drakkar	Ms1	Rf1	Ms1Rf1
1991 (11 个地区)	35.1-45.0	40.7-44.5	—	—
1992 (4 个地区)	37.8-44.3	35.2-43.0	36.3-43.7	35.6-43.0
1993 (8 个地区)	39.3-49.0	39.3-47.8	38.4-48.6	38.2-47.4
1994 (6 个地区)	39.0-53.0	39.0-51.2	38.2-51.9	38.8-51.4

表 17：Ms1Rf1 和非转基因油菜籽成分分子（二）-----脂肪酸含量（%）

种类	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OSR	3-6	<0.5	1-3	50-66	18-28	6-14	<0.5
Drakkar	3.6-4.8	0.3-0.5	0.9-2.3	58.7-71.5	15.2-20.2	5.4-10.5	0.3-0.9
Ms1	3.7-4.7	0.4-0.5	0.9-2.2	59.6-68.4	15.0-21.9	6.7-10.6	0.3-0.9
Rf1	3.8-4.5	0.5	1.5-2.2	62.1-67.9	14.3-18.1	7.2-10.9	0.5-0.7
Ms1Rf1	3.8-4.4	0.4-0.5	0.9-2.3	56.4-67.4	15.9-21.5	7.2-13.2	0.4-0.7
种类	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1	
OSR	1	traces	<0.5	<1	traces	traces	
Drakkar	1.0-1.4	<0.1-0.5	0.2-0.5	<0.1	0.1-0.9	<0.1-0.2	
Ms1	1.0-1.4	<0.1-0.9	0.2-0.3	<0.1	0.1-0.4	<0.1-0.2	
Rf1	1.1-1.4	<0.05	0.2-0.3	<0.1	-	-	
Ms1Rf1	1.1-1.4	-	0.2-0.3	<0.1	-	-	

OSR 为普通油菜，Drakkar 为亲本油菜

表 18: Ms1Rf1 和非转基因油菜籽成分分子 (三) -----蛋白质含量 (%)

	Drakkar	Ms1	Rf1	Ms1Rf1
1991 (11 个地区)	22.4-31.1	22.8-27.4	—	—
1992 (4 个地区)	25.3-30.9	25.8-30.8	25.3-31.5	25.3-31.6
1993 (8 个地区)	23.6-28.9	24.0-27.5	24.0-28.0	24.0-28.0
1994 (6 个地区)	17.3-26.3	19.4-26.3	17.3-27.0	18.6-26.4

表 19: Ms1Rf1 和非转基因油菜籽成分分子 (四) -----硫代葡萄糖苷 (μmol/g)

种类	烯烃	吲哚	其它
Drakkar	3.5-18.5	1.5-26.0	0.5-6.8
Ms1Rf1	4.4-16.7	1.7-19.2	0.4-2.3

表 20: Ms1Rf1 和非转基因油菜籽成分分子 (五)

油菜籽油 种类	p-茴香胺值	叶绿素 (ppm)	生育酚 (mg/100g)	固醇类 (mg/100g)	磷
混合粗制油					
Drakkar	—	4.33	68.9	584.4	322
Ms1Rf1	—	4.21	80.1	599.8	433
除味液态油					
Drakkar	1.79	0.00	21.4	357.6	—
Ms1Rf1	1.31	0.00	21.2	408.8	—
除味加氢油					
Drakkar	0.75	0.00	26.9	523.5	—
Ms1Rf1	0.50	0.00	27.2	348.1	—

3.3.5 抗生素抗性；

像大多数其它蛋白一样，NPTII 酶在消化道迅速被降解，而且，实验还显示食入这种酶不会影响氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素的使用效果 (Fuchs *et al.*, 1993 a&b)。这个细致的毒性实验通过 NPTII 酶对临床使用某些氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素效果的影响进行判断。而且，*neo* 基因的 mRNA 在所有的组织中都没有检测出 (种子、叶、花粉、花蕾)。

参考文献:

Fuchs, R. L., Ream, J. E., Hammond, B. G., Naylor, M. W., Leimgruber, R. M., and Berberich, S. A., 1993a: Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/Technology* 11, 1543-1547.

Fuchs, R. L., Heeren, R. A., Gustafson, M. E., Rogan, G. J., Bartnicki, D. E.,

Leimgruber, R. M., Finn, R. F., Hershman, A., and Berberich, S., 1993(b): Purification and characterization of micobially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. Bio/Technology 11, 1537-1542.

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响。

人类消费的油菜产品主要是菜籽油。由于 Ms1Rf1 菜籽油中并不能检测到外源蛋白，因此不会通过食用含有 Ms1Rf1 菜籽油而接触到 PAT/bar 蛋白，因此不会对人体和食用安全性造成影响。

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。

Ms1Rf1 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 Ms1Rf1 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油菜是一致的。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，Ms1Rf1 油菜应该属于安全等级 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。

将 Ms1Rf1 转基因油菜中重要油菜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 Ms1Rf1 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 Ms1Rf1 的成分分析结果和引入的基因，不认为加工过程会导致 Ms1Rf1 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。

由于经济性食用油的质量要求不允许存在油提取纯化过程中的任何蛋白质，需要在油加工过程中通过一些步骤保证去除酶类物质。考虑到我们不能在转基因油菜种子中检测到新引入的蛋白质，或只能检测到痕量 PAT/bar 蛋白，并且由于油菜种子在工业加工过程中经受的极端条件（如，高温），在油菜籽中存在完整蛋白或酶活性的可能性几乎不存在。安万特作物科学公司对油菜种子按照仿效欧洲和加拿大工业规程的步骤提取的不同组分进行了研究，以便监测转基因序列和蛋白的存在。数据显示，在油菜籽饼中只能检测到痕量的 PAT/bar 蛋白，在粗制油中没有检测到油菜籽粕萃取成分。转基因序列只能在油菜籽饼、萃取法制造的油菜籽粕和过滤残余物中检测到。核酸序列在精制过程中继续分解。油中的几种成分如脂肪酸或叶绿素可以影响油的稳定性。由于菜籽油没有由于基因改造而发生变化，从转基因油菜和传统非转基因油菜获得菜籽油没有稳定性方面的差别。

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。

转基因油菜 Ms1Rf1 与其产品在环境安全性方面与非转基因对照没有差异，它们对环境均不造成负面影响。已经对 PAT/bar 蛋白进行了深入透彻的研究，其功能特异，不具有毒性或致敏性。插入的外源基因并不改变农艺性状或籽粒成分（营养素和抗营养因子）等油菜总体性质。因此常规油菜与转基因油菜 Ms1Rf1 的产品在环境安全性方面没有差异。

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。

前文所涉研究表明，油菜 Ms1Rf1 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 Ms1Rf1 油菜表达的 PAT/*bar* 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/*bar* 蛋白不致毒、不致敏，且对酸不稳定，经加工后蛋白含量更少甚至检测不到。因此转基因油菜 Ms1Rf1 及其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 Ms1Rf1 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

bar 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

bar 基因编码的 PAT/*bar* 蛋白氨基酸序列

1 MDPERRPADI RRATEADMMPA VCTIVNHYIE TSTVNFRTEP QEPQEWTDDL VRLRERYPWL
61 VAEVDGEVAG IAYAGPWKAR NAYDWTAEST VYVSPRHQRT GLGSTLYTHL LKSLEAQGFK
121 SVVAVIGLPN DPSVRMHEAL GYAPRGMLRA AGFKHGNWHD VGFWQLDFSL PVPPRPVLPV
181 TEI

barnase 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

barnase 基因编码的 BARNASE 蛋白氨基酸序列

1 MVPVINTFDG VADYLQTYHK LPDNYITKSE AQALGWVASK GNLADVAPGK SIGGDIIFSNR
61 EGKLPGKSGR TWREADINYT SGFRNSDRIL YSSDWLIYKT TDHYQTFTKI R

barstar 基因核苷酸序列

商业保密信息，在公开版本已删除

barstar 基因编码的 BARSTAR 氨基酸序列

1 MKKAVINGEQ IRSISDLHQT LKKELALPEY YGENLDALWD CLTGWVEYPL VLEWRQFEQS
61 KQLTENGAES VLQVFREAKA EGCDITIILS

2. 目的基因与载体构建的图谱

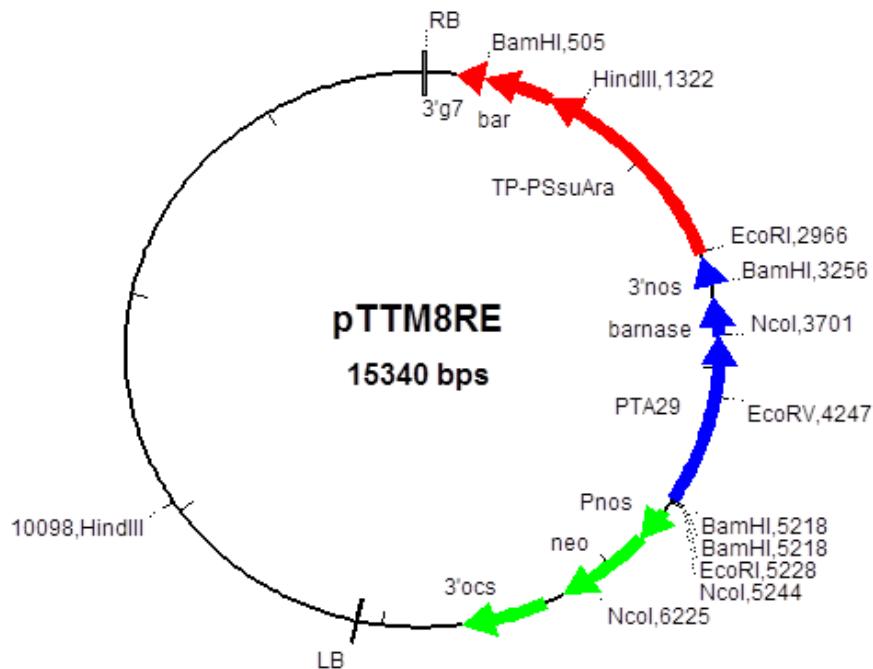


图6-1¹: Ms1转化用质粒pTTM8RE图谱

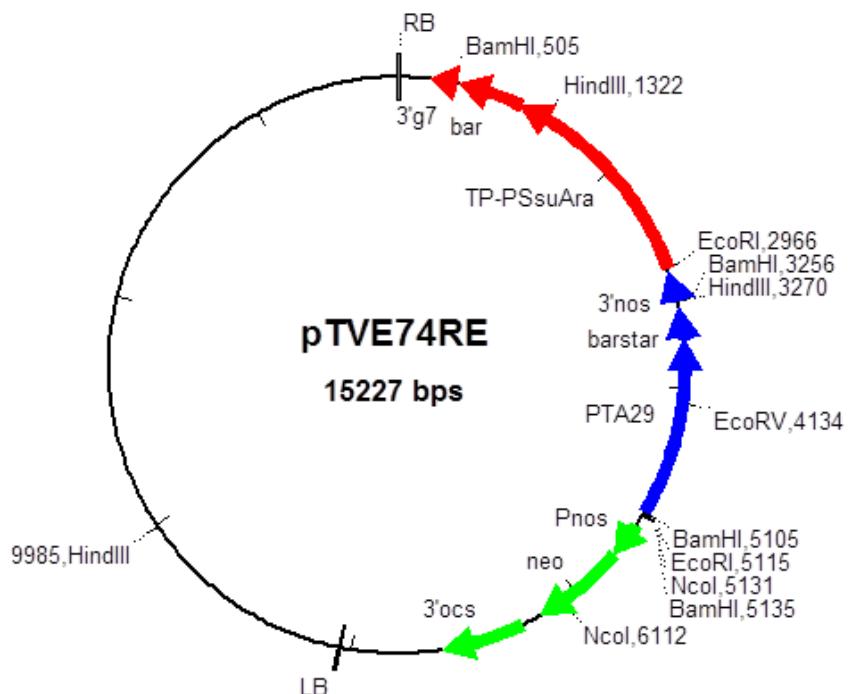


图6-2: Rf1转化用质粒pTVE74RE图谱

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: Ms1 转化用质粒 pTTM8RE 的 T-DNA 遗传元件描述

核苷酸的位置 (bp)	方向	说明
1-25		来自于 pTiB6S3 右边界的 TL-DNA 重复序列。
26-283		右边界重复序列处 TL-DNA 的残余序列。接合位点位于 TL-DNA 的 <i>Hpa</i> I 限制性酶切位点处。
284-290		人工合成多接点序列
502-291	逆时针	含多聚腺苷酸信号的一个 212 bp 的 <i>Eco</i> R V- <i>Cla</i> I 双酶切片段, 来自于 pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3' 端非翻译区 (3'g7)
503-523		人工合成多接点序列
1075-524	逆时针	源自吸水链霉菌 (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) 的 <i>bar</i> 基因的编码序列
2966-1076	逆时针	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子 (PssuAra)。这一启动子片段含有 atS1A 起始密码子 ATG 上游的 1.7 kb 片段以及靶向叶绿体的转运肽序列 (1240-1076)
2967-2995		人工合成多接点序列
3256-2996	逆时针	一个 260 bp 的 <i>Taq</i> I 酶切片段, 该片段来自于 pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的 3' 端非翻译区 (3' nos), 并含有植物多聚腺苷酸信号。
3257-3272		人工合成多接点序列
3273-3367		解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 的 <i>barnase</i> 基因 3' 端非编码区序列
3704-3368	逆时针	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) <i>barnase</i> 完整蛋白的编码区。
5214-3705	逆时针	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>) 的花药特异表达基因 TA29 的启动子区域。该 PTA29 启动子包括了 ATG 启始密码子的上游 1.5kb 的序列。
5215-5250		人工合成多接点序列
5251-5655	顺时针	土壤农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) (Pnos) pTiT37 质粒的 T-DNA 上的胭脂碱基因启动子。
5656-6633	顺时针	编码新霉素磷酸转移酶 II 的 <i>neo</i> 基因序列。这一序列与 Beck 等 (1982) 描述的大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> Tn5 序列一致。 <i>neo</i> 编码序列的 ATG 起始密码子已经替代为 Reiss 等 (1984) 所述的接头序列。 <i>neo</i> 编码序列下游存在 171 bp 的 Tn5 序列。
6634-7509	顺时针	章鱼碱合成基因 (3'ocs) 3' 端非编码区序列, 这一序列与 706 bp 的章鱼碱合成酶基因的 <i>Pvu</i> II 片段一致。已经从 Tn5 序列的 <i>Sma</i> I 酶切位点中

		克隆了这一 <i>Pvu</i> II 片段。另外还有 169 bp 的 Tn5 序列位于 3'ocs 片段下游。
7510-7513		人工合成多接点序列
7514-8202		TL-DNA 左边界的重复序列的残余序列。接合区域是在 TL-DNA 的前面 <i>Bgl</i> II 位点上。
8203-8227		PTiB6S3 质粒的 TL-DNA 的左边界重复序列

表 6-2: Rf1 转化用质粒 pTVE74RE 的 T-DNA 遗传元件描述

核苷酸的位置	方位	说明
1-25		PTiB6S3 右边界 TL-DNA 重复序列。
26-283		右边界重复序列处 TL-DNA 的残余序列。接合区位于 TL-DNA 的 <i>Hpa</i> I 限制性酶切位点处。
284-290		人工合成的多聚接头序列
502-291	逆时针	含多聚腺苷酸信号的一个 212 bp 的 <i>Eco</i> R V- <i>Cla</i> I 双酶切片段, 来自于 pTiB6S3 质粒 TL-DNA 基因 7 的 3'端非编码序列 (3'g7)
503-523		人工合成的多聚接头序列
1075-524	逆时针	源自吸水链霉菌 (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) 的 <i>bar</i> 基因的编码序列
2966-1076	逆时针	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>) atS1A 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基的启动子 (PssuAra)。这一启动子片段含有 atS1A 起始密码子 ATG 上游的 1.7 kb 片段以及靶向叶绿体的转运肽序列 (1240-1076)
2967-2995		人工合成的多聚接头序列
3256-2996	逆时针	一个 260 bp 的 <i>Taq</i> I 酶切片段, 该片段来自于 pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的 3' 端非编码序列 (3' nos), 并含有植物多聚腺苷酸信号。
3257-3276		人工合成的多聚接头序列
3277-3316		解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 的 <i>barstar</i> 基因 3'端非编码序列
3589-3317	逆时针	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) <i>barstar</i> 成熟蛋白的编码区。
5100-3590	顺时针	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> 的花药特异性基因 TA29 的启动子区域。PTA29 启动子含 ATG 起始密码子上游的 1.5 kb 的序列。
5101-5136		人工合成的多聚接头序列
5137-5541	顺时针	根瘤土壤农杆菌 <i>Agrobacterium tumifaciens</i> pTiT37 质粒 T-DNA 的烟酰碱合成酶基因的启动子 (Pnos); Depicker et al. (1982) 对 Pnos 启动子的核苷酸序列进行了描述。

5542-6519	顺时针	编码新霉素磷酸转移酶 II 的 <i>neo</i> 基因序列。这一序列与 Beck 等 (1982) 描述的大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> Tn5 序列一致。 <i>neo</i> 编码序列的 ATG 起始密码子已经替代为 Reiss 等 (1984) 所述的接头序列。 <i>neo</i> 编码序列下游存在 171 bp 的 Tn5 序列。
6520-7395	顺时针	章鱼碱合成基因 (3'ocs) 3'端未翻译序列, 章鱼碱合成酶基因的 3' 端非翻译区 (3' ocs)。这一序列与 706 bp 的章鱼碱合成酶基因的 <i>Pvu</i> II 片段一致 (Gielen et al., 1984)。已经从 Tn5 序列的 <i>Sma</i> I 酶切位点中克隆了这一 <i>Pvu</i> II 片段。另外还有 169 bp 的 Tn5 序列位于 3' ocs 片段下游。
7396-7399		人工合成的多聚接头序列
7400-8089		左边界重复序列处的 TL-DNA 残余序列。接合区位于 TL-DNA 的前一 <i>Bgl</i> II 酶切位点处。
8090-8114		PTiB6S3 质粒的 TL-DNA 的左端重复序列 (Gielen et al. (1984) The EMBO Journal 3:835-846)。

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 插入序列的 PCR 分析方法;

3.2 Southern 杂交检测插入拷贝数;

3.3 蛋白表达稳定性检测;

3.4 插入稳定性检测;

3.1 插入序列的 PCR 分析方法

Ms1

利用高保真 PCR 反应体系, 对 Ms1 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得两条具有重叠区域的 PCR 扩增片段, 将两个片段进行拼接获得 Ms1 的全长插入序列 (图 6-3), 将该序列与质粒 pTTM8RE T-DNA 进行比对, 发现 Ms1 含有 8150 bp 的外源插入序列: *bar* 基因表达盒 (P_{SsuAra}-*bar*-3'g7) 和 *barnase* 基因表达盒 (P_{Ta29}-*barnase*-3'nos), 不含质粒骨架序列 (图 6-4)。

利用连接介导 PCR (Ligation-mediated PCR) 方法获得了 Ms1 插入序列的左右侧翼序列。

商业保密信息，在公开版本已删除

图 6-3: 转化体 Ms1 插入序列扩增片段示意图

商业保密信息，在公开版本已删除

图6-4: 转化体Ms1插入序列及侧翼序列

Rf1

利用 2 条具有重叠的 PCR 片段测定了转基因油菜 Rf1 的基因插入位点的 DNA 序列，包括插入的 DNA 序列和两边的侧翼序列（图 6-5），然后将 2 个片段进行拼接，获得完整的插入及侧翼序列，将该序列与质粒 pTVE74RE T-DNA 进行比对，发现 Rf1 插入序列大小为 8084 bp（图 6-6），不含有骨架序列。利用反向 PCR 方法分析了 Rf1 插入序列的左右边界序列。

商业保密信息，在公开版本已删除

图 6-5: 转化体 Rf1 插入序列扩增片段示意图

商业保密信息，在公开版本已删除

图6-6: 转化体Rf1插入序列及侧翼序列

3.2 Southern 杂交检测插入拷贝数

Ms1

利用单酶切或双酶切的方法对 Ms1 油菜基因组 DNA 进行酶切消化后, 与涵盖整个质粒 pTTM8RE T-DNA 的 DNA 片段为探针 (*bar*, pSSuAra, pTA 29 和 *neo*), 进行 Southern 杂交。杂交结果与预期杂交结果一致(图 6-7)。表明在 Ms1 基因组 DNA 中仅含有单一拷贝的 T-DNA 插入。

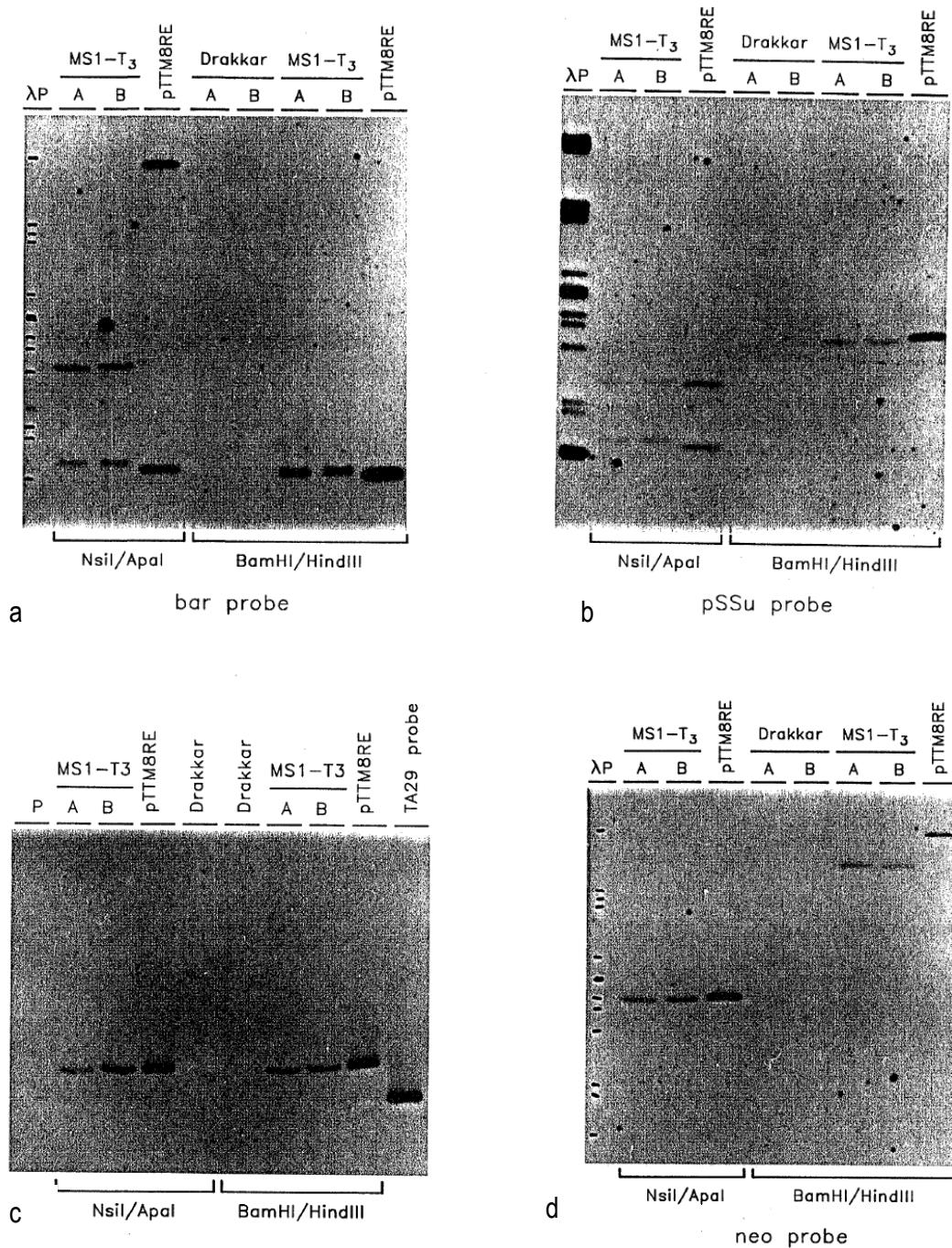


图 6-7: 转基因油菜 Ms1 的基因组 DNA 与探针 (*bar*, pSSu, PTA29, *neo*) 的杂交图

Rf1

为了鉴定质粒载体 pTVE74RE 的 T-DNA 插入序列的整合拷贝数，将总的植株 DNA 用琼脂糖凝胶电泳分离后用两种不同的 DNA 探针进行杂交。一个片段包括的是限制性酶切位点间核苷酸序列信息 (*barstar* 编码序列) 和 T-DNA 右侧边界序列，另一个包括限制性酶切位点间核苷酸序列 (*neo* 编码序列) 和左侧边界 (图 6-8, A)。

从图 6-8, A 的分析中不能判断重复边界序列末端外侧的质粒序列是否也被转入植物染色体组中。针对这一点，从相应植株中提取的总 DNA 用相同的酶消化后另外与质粒 pTVE74RE 边界重复序列末端外侧的核苷酸序列 (图 6-8 中探针命名为: +RB 和 +LB) 杂交。

结果

Southern 印记杂交结果如下 (图 6-8 A 和 B)。

图 6-8, A 包括两个部分 (左和右)，显示了 *barstar* 探针 (见图 6-8, 左) 和 *neo* 探针 (见图 6-8, 右) 的杂交结果。分析了三个独立的植株 (1, 2, 3) 及一个非转化对照 (-)。与 *barstar* 探针 (I) 杂交时期望结果是覆盖右边界至少 3.6 kb 大小序列的片段。杂交结果显示在所有转基因植株中都有一条大约为 10 kb 的条带，在非转化对照中不存在。与 *neo* 探针 (II) 杂交时期望结果是覆盖左边界至少 4.4 kb 大小序列的片段。杂交模式的分析结果显示在所有转基因植株中都有一条大约为 5 kb 的条带，在非转化对照中不存在。因此这个分析结果显示在转基因品种 Rf1 中只包含一个拷贝的转化载体 T-DNA。

图 6-8, B 包含两个部分 (左和右)，显示了右侧边界重复序列外侧的质粒序列探针 (左) 和左侧边界重复序列外侧的质粒序列探针 (右) 的杂交结果。用了两个独立的植株 (图 6-8, A 中 1 和 2)。胶上用相应探针 (+RB 和 +LB) 的片段作为阳性对照。结果显示，Rf1 的两个泳道 1, 2 均无杂交条带。图 6-8, A 上在 T-DNA 边界重复外侧序列的泳道，检测到与预期的同样大小的条带。

结论

在上述实验结果中总结得出以下结论：

- Southern 印记杂交分析得出植物染色体组的基因整合模式；
- 在 Rf1 中整合了单一拷贝的外源基因；
- 质粒骨架序列没有随同 T-DNA 插入到植物基因组中；嵌合基因在边界重复序列之间。

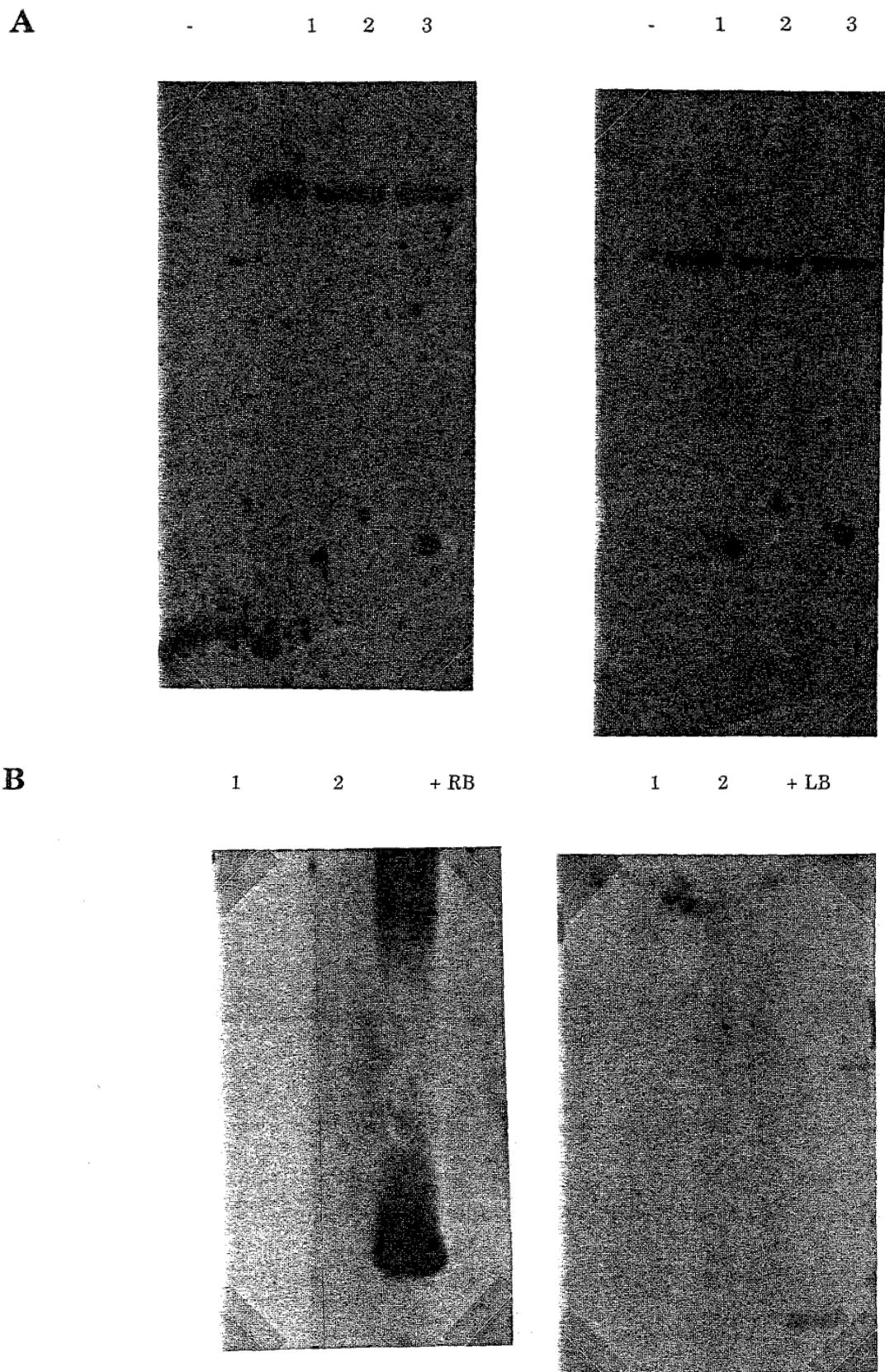


图 6-8: Rf1 southern 杂交结果

3.3 蛋白表达稳定性检测

为了验证 *PAT/bar* 蛋白在不同的世代中稳定表达，利用分光光度法对不同世代的 Ms1 和 Rf1 油菜基因组进行了 *PAT/bar* 蛋白检测。

实验材料：不育系和育性恢复系油菜的不同世代。具体如下：

植物材料	备注
Ms1 后代：	
T ₁ (B91-4)	Ms1-T ₁
T ₃ (B91-4)	Ms1-T ₃
B91-4 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Ms1-BC ₄
B91-4 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Ms1-BC ₄
Rf1 后代：	
S ₁ (B93-101)	Rf1-S ₁
S ₃ (B93-101)	Rf1-S ₃
B93-101 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Rf1-BC ₃ (B6907)
B93-101 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Rf1-BC ₃ (B6923)

实验方法：

PAT/bar 通过消耗乙酰辅酶 A (AcCoA) 将草铵膦乙酰化，辅酶 A (CoA) 的游离巯基基团可以与 Ellman 试剂 (5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)) 发生反应。在此反应期间会生成黄色产物，可以通过监测黄色产物随时间的变化来检测 *PAT/bar* 蛋白的活性。

PAT/bar 蛋白检测

溶液：

0.4 mg DTNB/mL 100 mM TRIS/C1 pH = 7.5

9.75 mg PPT/ mL miQ

20.2 mg AcCoA/ mL miQ

测量：

968 uL DTNB

2 uL PPT

20 uL AcCoA

10 uL sample

在 412 nm 下检测光密度值 (OD)，在 25 °C 时绘制标准曲线 (包含除样品外的所有溶液)。1 个单位被定义为在 25 °C 时 412 nm 下每分钟增加 1 OD。

结果和结论

经证实引入 *bar* 基因没有在乙酰转移酶活性背景上增加特定的 *PAT/bar* 蛋白活性。这与预期相符，由于 PSSuAra 启动子只在绿色组织中指导表达。

表 6-3: *PAT/bar* 蛋白在不同世代的表达情况

样品	mg prot/ml	PAT/ <i>bar</i> U/ml	μg PAT/ <i>bar</i>	μg PAT/ <i>bar</i> /mg prot
Ms1 T ₁ A	2.8	0.50	2.9	1.1
Ms1 T ₁ B	2.8	0.34	2.0	0.7
	3.5	0.35	2.1	0.5
Ms1 T3 A	2.5	0.22	1.3	0.5
Ms1 T3 B				
Ms1-BC ₄ (93B0498) A	3.4	0.51	3.0	0.9
Ms1-BC ₄ (93B0498) B	3.6	0.64	3.8	1.1
Ms1-BC ₄ (B4973) A	2.9	0.82	4.8	1.6
Ms1-BC ₄ (B4973) B	2.7	0.67	3.9	1.5
Rf1-S ₁ A	1.7	0.54	3.2	1.9
Rf1-S ₁ B	3.6	0.77	4.5	1.2
Rf1-S ₃ A	4.8	1.15	6.8	1.4
Rf1-S ₃ B	3.6	0.69	4.1	1.1
Rf1-BC ₃ (B6907) A	3.8	1.01	5.9	1.6
Rf1-BC ₃ (B6907) B	2.9	0.64	3.8	1.3
Rf1-BC ₃ (B6923) A	2.4	0.75	4.4	1.8
Rf1-BC ₃ (B6923) B	3.0	0.75	4.4	1.5
Drakkar (对照)	2.8	0.00	0.00	0.00

a) 用 Biorad 的 Dc 蛋白检测法 (Lowry 法) 测定蛋白浓度, 用 BSA 作为标准物质。

b) ug PAT/*bar* 是通过具体酶活 170 U/mg PAT/*bar* 估计而来的。

PAT/bar 蛋白的检测结果清楚地表明在不同的油菜世代中, 外源基因的表达量是稳定的。

3.4 插入稳定检测

为了分析 Ms1 和 Rf1 转基因油菜后代的 *barnase* 和 *barstar* 嵌合基因构建体的整合以及遗传稳定性。实验方法是基于 Southern 印记杂交的分子分析。

植物材料

为了证明整合基因构建体的稳定性，用后代的植株做分子分析。对于雄性不育和育性恢复系，每个转化体的稳定性分析利用了 4 个世代的分子检测。每个后代用两个独立的植株来进行分析。用非转基因 Drakkar 作为阴性对照。

植物材料

植物材料	备注
Ms1 后代:	
T ₁ (B91-4)	Ms1-T ₁
T ₃ (B91-4)	Ms1-T ₃
B91-4 的 BC ₄ 加拿大 SOSR2	Ms1-BC ₄
B91-4 的 BC ₅ 欧洲 SOSR6	Ms1-BC ₅
Rf1 后代:	
S ₁ (B93-101)	Rf1-S ₁
S ₃ (B93-101)	Rf1-S ₃
B93-101 的 BC ₃ 加拿大 SOSR2	Rf1-BC ₃ (B6907)
B93-101 的 BC ₃ 欧洲 SOSR6	Rf1-BC ₃ (B6923)

实验方法

按照 Dellaporta *et al.* (1983) 的方法从相应植物组织中提取总 DNA，然后用 EcoRV 酶消化，该酶在 T-DNA 片段上有单一酶切位点，定位于 TA29 启动子片段。与 TA29 启动子片段杂交后，两个期望杂交条带是覆盖转化 DNA 整合位点左右两侧方向的染色体组 DNA 片段。这意味着对于雄性不育植株，片段大小为 9 kb 和 13kb，对于育性恢复基因植株，片段大小为 10 kb 和 5kb。T-DNA 的线性示意图见图 6-9 (pTTM8RE) 和图 6-10 (PTVE74RE)。

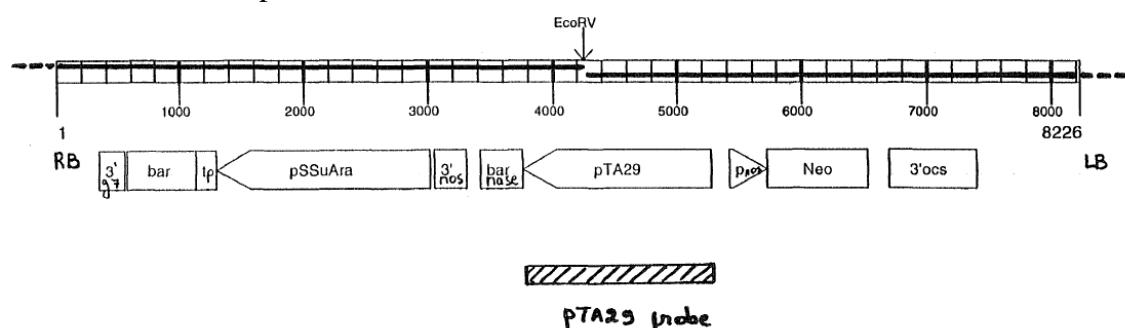


图 6-9: Southern 杂交的线性示意图 (Ms1)

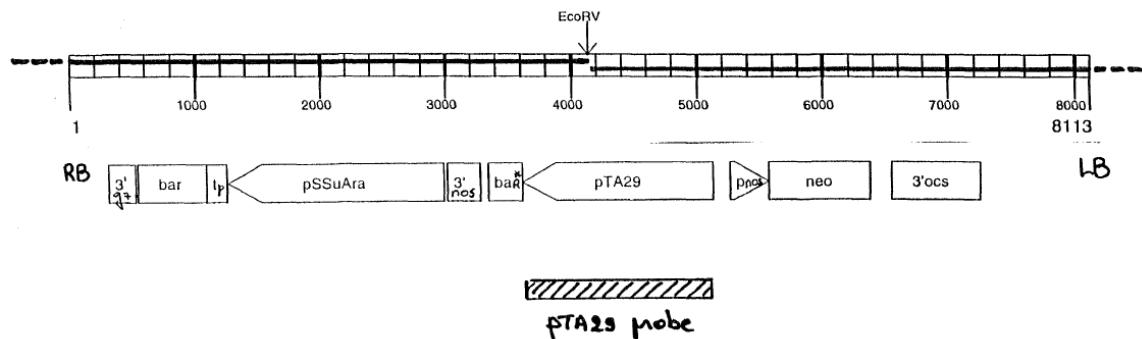


图 6-10: Southern 杂交的线性示意图 (Rf1)

结果与结论

图 6-9 和 6-10 为 pTTM8RE 和 PTVE74RE 相应 T-DNA 边界重复序列间的 DNA 片段的图示。图示显示了转化 DNA 上的 Eco RV 酶切位点, 作为探针的 TA29 启动子片段和预期的杂交条带大小。

用 TA29 探针对雄性不育基因植株不同世代(T1, T3, BC4 和 BC5)及育性恢复基因植株不同世代(S3, S3, BC3)进行的 Southern 印记杂交放射自显影结果显示于图 6-11。在各个世代都鉴定到了预期的杂交结果。

总之, 本研究的分析结果证明在不同世代及不同遗传背景下 T-DNA 的插入稳定遗传。

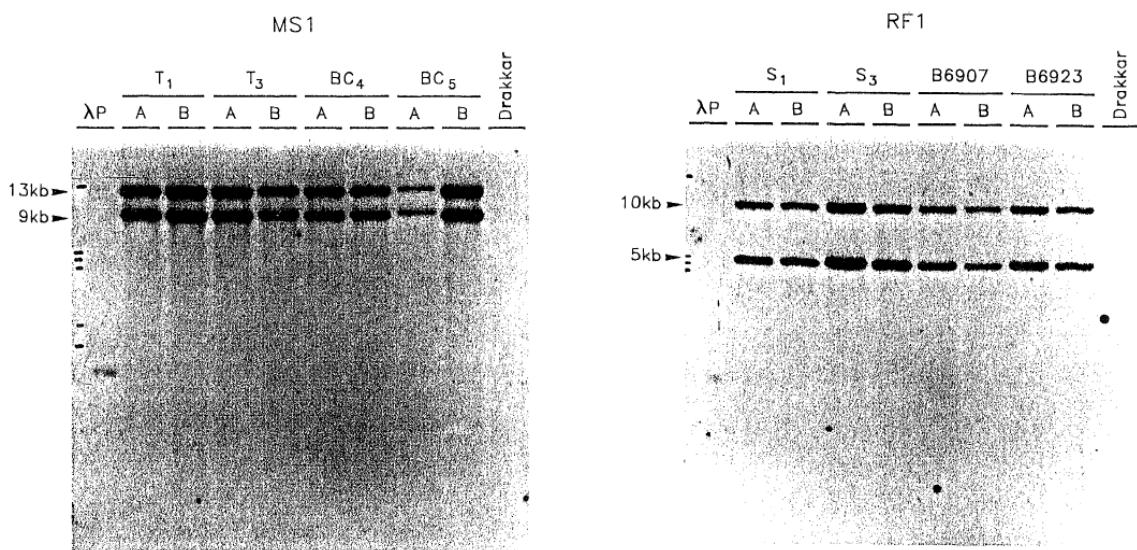


图 6-11: Ms1Rf1 遗传稳定性的 southern 杂交结果

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

转基因油菜 Ms1Rf1 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，进行撰写的。具体如下。

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

转基因油菜 Ms1Rf1 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，进行撰写的。

转基因油菜 Ms1Rf1 对生态环境和食品安全性的综合评价报告

一、摘要

Ms1Rf1 是通过将雄性不育系 Ms1 和育性恢复系 Rf1 常规的杂交获得的。根据对受体生物（油菜）、遗传操作的类型和 Ms1Rf1 环境和食用/饲用的安全性评价，认为来源于 Ms1Rf1 的油菜可作为食品或饲料，或者在食品或饲料产品中安全消费。

受体生物（油菜）作为食用和饲用材料已经被人类安全使用了数百年，因此，油菜的安全等级为 I。

雄性不育系 Ms1 和育性恢复系 Rf1 的遗传操作均为农杆菌介导的转化。通过这一转化过程，将外源基因成功转入常规油菜基因组中，从而赋予植株抗除草剂的特性。这些遗传元件已经被广泛的应用，安全的应用历史表明外源蛋白对人类或动物无害。基因操作对受体生物安全等级的影响为类型 2，为不影响受体生物安全性的基因操作。

Ms1Rf1 安全等级为 I 级。Ms1Rf1 和常规油菜间存在的唯一差异是：在油菜 Ms1Rf1 中存在 PAT/bar 蛋白，但该蛋白只占总蛋白质的一小部分，不是油菜的主要营养成分。对 Ms1Rf1 和商业化的油菜进行了田间比较，没有发现作物间存在显著的差异，除 Ms1Rf1 拥有抗草铵膦除草剂性状外。对 Ms1Rf1 油菜和常规油菜重要营养成分的比较也表明两者实质等同，不产生对营养或健康影响方面的顾虑。

Ms1Rf1 具有很好的安全性，并且为农民提供了控制杂草的新途径，减少了劳动力的使用，给农民带来了经济利益，同时，也给农业的可持续性发展带来了好处。

二、背景介绍

拜耳作物科学公司在不同的国家和不同的油菜生长季节对油菜 Ms1Rf1 的安全性进行了评价。并在美国和加拿大获得了商业化种植的批准。

2002 年，为了保证油菜贸易的顺畅，拜耳作物科学公司向中国农业部首次提交了 Ms1Rf1 油菜安全证书申请，按照农业部反馈，拜耳作物科学公司在国内进行了安全评价检测。

环境安全评价检测试验由中国农业科学院油料作物研究所开展的，检测时间为 2002 年 9 月到 2003 年 11 月，检测报告见附件 2 和 3。

食用安全评价试验是由中国疾病控制预防控制中心营养与食品安全所开展的，检测报告见附件 4~5。

三、受体生物学特性

油菜属于十字花科芸苔属。在欧洲认为对油菜的驯化发生在中世纪早期，荷兰早在 16 世纪就有油菜的商业化种植记载。尽管菜籽油在亚洲已经被广泛的食用，但是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的重要食用油。虽然美国，南非和澳大利亚可以成功的种植油菜，且近几年的年产量也急剧增加，但是现在主要的油菜产地国家还是中国，印度，欧洲和加拿大。

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。气温和土湿影响其生长发育和产量。春油菜的生育期从发芽到成熟为 90 天到 110 天不等。

四、基因操作

油菜 Ms1 和 Rf1 均是通过农杆菌介导的转化方法获得的。Ms1 的 T-DNA 含有 2 个基因表达盒：*bar* 基因表达盒 (P_{SsuAra}-*bar*-3'g7) 和 *barnase* 基因表达盒 (P_{ta29}-*barnase*-3'nos)，*bar* 基因编码 PAT/bar 蛋白，使得 Ms1 具有草铵膦除草剂抗性，*barnase* 基因在花药绒毡层特异性表达，引起花粉失活，从而引起雄性不育。Rf1 的 T-DNA 含有 2 个基因表达盒：*bar* 基因表达盒 (P_{SsuAra}-*bar*-3'g7) 和 *barstar* 基因表达盒 (P_{ta29}-*barstar*-3'nos)，*bar* 基因编码 PAT/bar 蛋白，使得 Rf1 具有草铵膦除草剂抗性，*barstar* 编码 Barstar 蛋白，在花粉中特异表达，抑制 Barnase 蛋白活性，从而使得植株育性恢复。

pTTM8RE 和 pTVE74RE 质粒均携带有产生抗生素卡那霉素 kanamycin 抗性的选择性标记基因 *neo* (PNos-*neo*-3'ocs)。*neo* 基因编码新霉素磷酸转化酶 II neomycin phosphotransferaseII (APH(3')II) (NPTII)，可以产生对氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素如卡那霉素 kanamycin，geneticin(G418) 和新霉素 neomycin 的抗性，用于转化体的筛选。

五、遗传稳定性

利用 southern 杂交检测了至少 3 个不同世代的插入稳定性，结果表明外源基因在不同世代均是稳定存在的。利用 Western 杂交检测了不同生长时期的不同组织的外源蛋白的表达量，*barnase* 和 *barstar* 基因分别特异性表达在油菜转化子 Ms1 和 Rf1 花粉囊胚周围的绒毡层细胞，两个基因在叶、种子和花粉中都没有表达。嵌合 *bar* 基因不会在除了绿色组织之外的器官中表达。*bar* 基因产物 (mRNA 或蛋白或蛋白活性) 可以在叶、绿色花蕾中检测到，种子中也有痕量存在。*neo* 基因由弱组成型启动子操纵。其 mRNA 在各种组织中都检测不到存在，只在叶组织中可以检测到 NPTII 活性阳性信号。利用分光光度计方法对来自于不同世代的组织进行了外源蛋白 PAT/bar 的检测，结果表明 PAT/bar 蛋白在不同的世代中稳定表达。

六、环境安全评价

6.1 生存竞争能力

根据拜耳作物科学公司研究报告发现转基因油菜 Ms1Rf1 和非转基因油菜相比，在活力，芽率，成苗率等农艺性状不存在显著差异。

2002 年冬天，由中国农业科学院油料作物研究所在冬油菜和春油菜区分别进行了休眠性检测。结果表明：在冬油菜区休眠期不存在差异，且休眠性与埋藏深度没有关系。而在春油菜区，品种间不存在休眠性差异，但是休眠性受埋藏深度影响明显。原因是春油菜区在试验期间雨水少，空气相对湿度小，气温低。因此深层土壤含水量小，土温低，种子不宜萌发或腐烂。种子在深层土壤易处于休眠状态。

此外，中国农业科学院油料作物研究所对转基因油菜在荒地的适合度与非转基因对照以及当地的种植品种对照进行了比对，结果表明所有测试油菜品种的适合度都小于 0.3，表明这些品种在自然条件下种群很难扩大。

6.2 基因漂移

1. 垂直基因漂移

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，这意味着杂交种和他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% 杂种种子），且这些杂交种能产生少量的种子和可育的后代。即便基因转移能够发生，可能的融合基因 *barstar-bar* 或 *barnase-bar* 也不存在任何优势，因为在自然界中缺乏抗草铵膦性状选择压力。

2. 水平基因漂移

由于植物和微生物之间的 DNA 同源性很低，因此植物向微生物发生基因转移即使发生也是在进化时间上需要几千年的时间。即使这样的转移可能发生，*bar* 基因转移至微生物中也并不会造成风险，因为 *bar* 本身就是来自于微生物中。

3. 国内异交率检测结果

2002 年 7 月到 2003 年 9 月由华中农业大学在冬油菜区和春油菜区开展了油菜异交率的检测。检测结果表明：在田间自然授粉条件下，转基因抗除草剂油菜 Ms1Rf1 与中国的甘蓝型油菜品种间存在一定的异交率，与白菜型油菜及其变种和芥菜型油菜间也存在一定比例的天然异交率。而在芸苔属的黑芥和甘蓝及其变种、其它属的白芥、新疆野油菜、诸葛菜、芥菜、菘蓝和萝卜为转基因油菜的花粉受体时，未检测到杂种植株。

6.3 对靶标生物和非靶标生物的影响

田间试验中未发现对有益生物（例如蜜蜂或蚯蚓）具有有害或伤害现象。此外，由于油菜中引入的基因或基因表达的酶都没有显示出任何毒性，因此不认为转基因油菜会对有益生物造成伤害作用或显著影响。

2002年7月到2003年10月由华中农业大学在冬油菜区和春油菜区均开展的对生物多样性进行了检测。试验采用随机区组排列，试验中除了转基因油菜和非转基因油菜对照外，还包括当地对照品种。在油菜的生长周期中，共进行4次田间调查，调查采用5点取样法，系统调查各小区的所有昆虫类型和数量。

检测结果表明无论在春油菜区还是在冬油菜区，在油菜的生长苗期，抽薹期，花期，结荚期、成熟期供试的转基因油菜Ms1Rf1植株上的小菜蛾、蚜虫、潜叶蝇、茎象甲，其它害虫和害虫天敌的发生数量与当地的对照品种和非转基因对照品种之间基本无明显差异。在同样的试验条件下，该转基因油菜品种田间节肢动物生物多样性指数----SHANNON-WIENER指数与当地的对照品种和非转基因对照品种之间基本无明显差异。

七、食用安全

7.1 营养学评价

为了了解Ms1Rf1油菜的营养成分和非转基因对照是否存在差异。拜耳作物科学公司于1991~1993年对不同产地和不同加工程序的多批Ms1Rf1油菜及其亲本Ms1和Rf1进行了成分分析。

对不同地区种植的转基因油菜和非转基因油菜受体以及其他常规油菜种植品种进行了成分分析，包括：菜籽油的含量，蛋白、脂肪酸、胆固醇、碳水化合物、生育酚、矿物质、叶绿素、抗营养因子芥酸和硫代葡萄糖苷，以及脂肪酸和硫代葡萄糖苷的组成进行了比较。结果显示，转基因油菜与非转基因油菜在营养成分不存在差异。

2003年~2004年，由中国疾病预防控制中心开展了转基因油菜和非转基因油菜对照的抗营养因子检测。硫代葡萄糖苷和芥酸的检测结果均在公开发表的参考数值范围内，且Ms1Rf1中上述抗营养因子的含量与非转基因对照具有很好的一致性。

综上所述，Ms1Rf1在营养成分上与非转基因对照具有实质等同性。

7.2 毒理学评价

利用与已知毒素同源性比对，小鼠的急性毒性研究对油菜中PAT/bar, Barnase, 和 Barstar蛋白进行了毒理学评价，均无发现上述蛋白有毒蛋白的特性。在公共数据库中与毒性蛋白和已知过敏原进行生物信息学分析，急性经口饲喂2000mg/kg体重的PAT/bar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。

2003年，由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所开展的Ms1Rf1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Ms1Rf1粉掺入饲料（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Ms1Rf1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。

7.3 致敏性评价

利用与已知过敏原同源性比对，外源蛋白的热稳定性分析和体外模拟胃液的消化性评估了外源蛋白的过敏性评价。结果表明：所有蛋白与已知过敏原均无同源性。在 90°C 热处理 60 min 后，*bar* 基因编码的 PAT/*bar* 蛋白的条带没有明显变化；55°C 热处理后，Barnase 蛋白开始降解；在 95°C 热处理后，Barstar 蛋白可以形成可溶的多聚体，最初的蛋白结构在 95 °C 条件下加热是不稳定的。在 pH 1.2、胃蛋白酶存在时，用模拟的胃液孵育不到 0.5 min PAT/*bar*, Barnase 和 Barstar 蛋白在模拟的人体胃液中均被快速降解。

7.4 抗生素抗性

Ms1 和 Rf1 种含有选择性标记基因 neo，编码新霉素磷酸转化酶 II neomycin phosphotransferaseII (APH(3')II) (NPTII)，可以产生对氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素如卡那霉素 kanamycin, geneticin(G418)和新霉素 neomycin 的抗性，用于转化体的筛选。像大多数其它蛋白一样，NPTII 酶在消化道迅速被降解，而且，实验还显示食入这种酶不会影响氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素的使用效果 (Fuchs *et al.*, 1993 a&b)。这个细致的毒性实验通过 NPTII 酶对临床使用某些氨基糖苷 aminoglycoside 类抗生素效果的影响进行判断。而且，neo 基因的 mRNA 在所有的组织中都没有检测出（种子、叶、花粉、花蕾）。

八、非预期效应

田间试验中未发现对有益生物（例如蜜蜂或蚯蚓）具有有害或伤害现象。此外，由于油菜中引入的基因或基因表达的酶都没有显示出任何毒性，因此不认为转基因油菜会对有益生物造成伤害作用或显著影响。

人类消费的油菜产品主要是菜籽油。由于 Ms1Rf1 菜籽油中并不能检测到外源蛋白，因此不会通过食用含有 Ms1Rf1 菜籽油而接触到 PAT/*bar* 蛋白，因此不会对人体和食用安全性造成影响。

九、生产应用前景及拟采取的安全监控措施

Ms1Rf1 为拜耳作物科学公司开发的抗除草剂草铵膦的油菜已在经过多年的安全评价后在加拿大和美国进行了商业化种植，给农民和环境都带来了很多好处。油菜的抗除草剂草铵膦的特性，给油菜的种植者带来了经济受益，同时对于环境的保护也起到了积极作用，所有这些益处有利于农业的可持续发展。

作为 Ms1Rf1 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。

十、总结

根据对受体生物（油菜）、遗传操作的类型和 Ms1Rf1 环境和食用/饲用的安全性评价，我们认为来源于 Ms1Rf1 的油菜可作为食品或饲料，或者在食品或饲料产品中安全消费。

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 Ms1Rf1 是由拜耳作物科学公司通过农杆菌介导的转

化获得的，该产品在于 1995 年获得在加拿大上市批准。含 Ms1Rf1 的油菜可以为农民提供灵活、简便和经济的杂草防除方法，并为油菜杂交种产业提供新型的杂交系统，带来更多的经济效益。拜耳作物科学公司在中国申请 Ms1Rf1 油菜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 Ms1Rf1 的开发商，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 Ms1Rf1 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 Ms1Rf1 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

技术报告；商业保密资料

国内检测报告

附件 1：转基因油菜环境安全检测报告（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：转基因油菜环境安全检测报告（对生物多样性影响检测）——华中农业大学

附件 4：转基因油菜 Ms1Rf1 及其产品食用安全检测报告（抗营养因子检测）——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 Ms1Rf1 食品安全检测报告（大鼠 90 天喂养）——中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

拜耳作物科学公司内部报告

附件 6：Ms1 和 Rf1 分子特性鉴定报告

附件 7：Ms1 插入序列和插入位点分析

附件 8：Rf1 插入序列和插入位点分析

附件 9：雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 和 Rf2 中新基因的表达水平检测

附件 10：雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 的农艺性状评估

附件 11：PAT/bar 蛋白与已知毒素和过敏原的氨基酸序列同源性检索

附件 12：PAT/bar 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 13: PAT/*bar* 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 14: *bar* 基因的产物 PAT/*bar* 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 15: Barnase 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: Barstar 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 17: *bar* 基因的产物 PAT/*bar* 蛋白的热稳定性试验

附件 18: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barnase 蛋白的热稳定性

附件 19: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barstar 蛋白的热稳定性

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）

12.1 加拿大食品检验署批准文件；

12.2 加拿大农业部批准文件；

12.3 加拿大卫生部批准文件

加拿大食品检验署

加拿大

植物卫生和生产分部
植物生物安全办公室

决定文件 ***DD95-04***:

对植物基因系统公司 (PGS) 油菜新杂交系统环境安全性的决定

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) 生物学以及 Pro94-04 具有新性状的用于家畜饲料的植物评估准则草案指导下达成的对管理决定的解释说明。

加拿大农业和农业食品部 (AAFC)，特别是植物生物技术办公室和植物卫生和生产分部饲料处已经对植物基因系统公司 (PGS) 提交的关于一种新油菜杂交系统的信息进行了评估。这种杂交系统包含两个亲本的转基因系 MS1 和 RF1，以及这两个转基因系的杂交品种 MS1xRF1。AAFC 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，并且认为这种植物实质上等同于目前批准的可用作家畜饲料的油菜。

因此可认为，将 **MS1, RF1, MS1xRF1**，和其它源于 **MS1, RF1, MS1xRF1**，但具有或不具有任何其它导入的新性状的油菜品种自由投放入环境是安全的。

在饲料成分符合饲料法规的条件下，使用这种杂交系统品种生产的饲料可得到批准。

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或饲料处：

植物卫生和生产分部
加拿大食品检查署
59 Camelot Drive
Nepean, 安大略, KIA 0Y9
电话: (613)225-2342
传真: (613) 228-6629



Canadian Food
Inspection Agency

Agence canadienne
d'inspection des aliments

Canada

Plant Health and Production Division,
Plant Biosafety Office

*Decision Document DD95-04:
Determination of Environmental Safety of
Plant Genetic Systems Inc. (PGS) Novel Hybridization
System for Canola (*Brassica napus* L.)*

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. \(Canola/Rapeseed\)](#), and the proposed guidelines [Pro94-04 Guidelines for the Assessment of Plants with Novel Traits as Livestock Feed](#).

Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), specifically the Plant Biotechnology Office and the Feed Section of the Plant Health and Production Division, has evaluated information submitted by Plant Genetic Systems Inc. (PGS). This information is in regard to a novel canola hybridization system comprising two transgenic parental lines, MS1 and RF1, and their hybrid MS1x RF1. AAFC has determined that those plants with novel traits do not present altered environmental interactions when compared to currently commercialized canola varieties in Canada and are considered substantially equivalent to canola currently approved as livestock feed.

Unconfined release into the environment of MS1, RF1, MS1xRF1, and other *B. napus* lines derived from them, but without the introduction of any other novel traits, is therefore considered safe.

Feed use of varieties produced using this hybridization system is approved provided that the feed ingredients produced conform to the *Feeds Regulations*.

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

加拿大农业部
食物生产和检验局
植物产品部
59 Camelot Drive
Nepean, 安大略 K1A 0Y9
1995 年 4 月 28 日
Plant Genetic Systems Inc.
法规事务部
Jozef Plateaustraat
22-B 9000 Gent
比利时

3625-6-10P2

亲爱的 Rüdelsheim 博士：

我们已经审阅了贵公司关于将植物遗传系统中新的杂交系统双低油菜 canola 无限制田间释放和将其用作家畜饲料的申请。新的双低油菜包括转 MS1 和 RF1 双低油菜品种系 (*Brassica napus*)，和他们的杂交后代 MS1 × RF1。这些植株携带雄性不育基因、育性恢复基因、抗草铵膦除草剂基因和可选择标记基因。

基于你们提供的资料，转化植株 MS1、RF1 和 MS1 × RF1 的无限制释放不产生任何环境安全方面的担忧，因而被加拿大政府批准。该杂交系统本身对繁育而成的转基因品种系没有安全性或营养组成的问题。这些杂交品种系在加拿大被批准用作家畜饲料成分是基于来自转化植株生产而成的饲料成分符合食品条例明细表 IV4 中列出的双低油菜种子、双低油菜制品和双低油菜油的要求。注明 1995 年 4 月 28 日封存字样的决议文件将公开出版，它解释了我们形成决议的基本原理。

关于 MS1、RF1 和 MS1 × RF1、所有的其它来自相同转化植株的双低油菜 *B. napus* 品种以及所有它们的后代的批准是基于这些品种不进行种间杂交，使用目的相似，这些转化植株没有出现任何额外的新性状。对于目前用相同的遗传结构导入的其它双低油菜 *B. napus* 品种的批准是基于其在潜在的环境影响和家畜安全方面同 MS1 或 RF1 基本相当。

不管何时，贵公司发现了由于转化植株的田间释放产生关于环境风险（包括对动物和或人类健康的风险）的任何新信息，应必须立即报告本办公室。

请注意：虽然确定这些具有新性状的植物品种的环境安全性是这类品种商业化的关键步骤，其它一些要求仍需说明，包括加拿大卫生部提供的食物安全性评估，和加拿大农业和农用食品部的品种注册书。我们将通知该决议的省办事处。

你诚挚的，

Glenn Hansen

主任

抄送：地方联系人，EC, HC, 种子项目官员，品种处，饲料处，主任，植物保护，附件 (DD95-04)

 Agriculture and
Agri-Food Canada

Agriculture et
Agro-alimentaire Canada

Food Production
and Inspection Branch

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

Plant Products Division
59 Camelot Drive
Nepean, Ontario K1A 0Y9

Your file Votre référence

April 28, 1995

Our file Notre référence

Dr. Patrick Rüdelsheim
Plant Genetic Systems Inc.
Regulatory Department
Jozef Plateaustraat
22 - B 9000 Gent
Belgium

3625-6-10P2

Dear Dr. Rüdelsheim:

We have reviewed your application for unconfined field release and for livestock feed use of Plant Genetic Systems novel hybridization system for canola, that involves the transformed MS1 and RF1 canola lines (*Brassica napus*), and their hybrid MS1xRF1. These plants have been transformed with genes that confer nuclear male sterility, male fertility restoration, tolerance to the herbicide glufosinate ammonium, and a selectable marker.

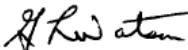
On the basis of the information provided to us, the unconfined release of MS1, RF1 and MS1xRF1 should not pose any concern to environmental safety, and is therefore authorized in Canada. The hybridization system does not in itself raise any concerns regarding the safety or nutritional composition of lines derived from it. These hybrid lines are therefore approved for use as livestock feed ingredients in Canada, provided that the feed ingredients produced therefrom conform to the definitions for canola seed, canola meal or canola oil as listed in Schedule IV of the Feeds Regulations. The enclosed Decision Document, dated April 28, 1995, which explains the rationale behind our decision, will be made publicly available.

The present authorization relates to MS1, RF1 and MS1xRF1, all other *Brassica napus* 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. The present authorization letter also relates to other *B. napus* varieties transformed with the same genetic construct, provided that the resulting lines can be shown to be substantially equivalent to MS1 or RF1 in terms of their potential environmental impact and livestock safety.

If at any time, your company becomes aware of any new 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 still need to be addressed, including a food safety assessment by Health Canada, and Variety Registration by Agriculture and Agri-Food Canada. We will inform provincial agencies of this decision.

Yours sincerely,



Glenn Hansen
Director

cc. Provincial Contacts, EC, HC, Seed Program Officers, Variety Section, Feed Section, Director, Plant Protection. Enclosure (DD95-04)

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

加拿大卫生部

FD/OFB-094-251-A

1999 年 10 月

新食品信息-食品生物技术
油菜 MS1/RF1 的授粉控制系统

加拿大卫生部已经通知植物基因系统 N.V.，同意将转基因油菜品种 MS1、RF1 或由它们衍生的杂交品种 (PGS1) (所开发的这些品种可抗除草剂、特别是草氨酸) 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 MS1 和 RF1 进行了全面评估。这些准则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检查而做出的。

如需更多信息，请与我们联系：

食品生物技术办公室

电话：(613) 941-5535

食品理事会

传真：(613) 952-6400

卫生保健分部

加拿大卫生部

Tunney 牧场

渥太华，安大略省 KIA012

NOVEL FOOD INFORMATION - FOOD BIOTECHNOLOGY**POLLINATION CONTROL SYSTEM FOR CANOLA, MS1/RF1**

Health Canada has notified Plant Genetic Systems N.V. that it has no objection to the food use of the transgenic canola lines MS1, RF1 or hybrids derived therefrom (PGS1), which have been developed to be tolerant to phosphinothricin containing herbicides, specifically glufosinate ammonium. The Department conducted a comprehensive assessment of MS1 and RF1 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	Telephone:	(613) 941-5535
Food Directorate	Facsimile:	(613) 952-6400
Health Protection Branch		
Health Canada		
Tunney's Pasture		
Ottawa, Ontario K1A 0L2		

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）

拜耳作物科学公司内部报告

附件 6: Ms1 和 Rf1 分子特性鉴定报告

附件 7: Ms1 插入序列和插入位点分析

附件 8: Rf1 插入序列和插入位点分析

附件 9: 雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 和 Rf2 中新基因的表达水平检测

附件 10: 雄性不育系 Ms1 及育性恢复系 Rf1 的农艺性状评估

附件 11: PAT/*bar* 蛋白与已知毒素和过敏原的氨基酸序列同源性检索

附件 12: PAT/*bar* 蛋白对小鼠的急性口服毒性试验

附件 13: PAT/*bar* 蛋白与已知过敏原氨基酸序列的同源性检索

附件 14: *bar* 基因的产物 PAT/*bar* 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 15: Barnase 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 16: Barstar 蛋白在模拟人体胃液中的体外消化

附件 17: *bar* 基因的产物 PAT/*bar* 蛋白的热稳定性试验

附件 18: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barnase 蛋白的热稳定性

附件 19: 利用 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析 Barstar 蛋白的热稳定性

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，由此生产的油料其芥酸含量和加工油菜产品中硫甙含量均低，从而提高了品质。转入杂交系统的遗传元件已了解得非常清楚，且有非常详细的文献报道。它们可以稳定地整合到基因组中。对于引入的蛋白的特点也了解得非常清楚，它们具有非常专一的活性，并且可以稳定表达。引入的这些基因的产物不具有毒性。由 Ms1Rf1 加工的食品/饲料产品也没有毒性。转基因油菜种子及产品的成分完全和常规油菜种子及产品相似。转入的蛋白在油料中检测不到，只有痕量的 PAT 蛋白在种子中可以检测到。Ms1Rf1 来源的株系或杂交品系和常规油菜具有同样重要的意义。

根据上述评估，可以得出结论，经雄性不育系 Ms1、育性恢复系 Rf1 及其杂交品系 (Ms1Rf1) 加工的食品和饲料产品与目前商品化的油菜产品实质上是等同的。此外，提供的数据显示，遗传背景（不仅局限于传统的杂交育种技术）或草铵膦的施用都不会影响产品质量的标准参数。并且没有资料显示食品/饲料的使用或成分的变化与引入的杂交系统相关。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

源自 Ms1Rf1 的转基因油菜的安全等级均为一级。BARNASE 蛋白、BARSTAR 蛋白、PAT 蛋白，在油料产品中都不会检测到，只有痕量的 PAT 蛋白会在油菜原产品中被检测到。在田间比较来自 Ms1Rf1 杂交的油菜与常规油菜品种的区别，发现除了农业转基因油菜抗除草剂草铵膦和具有雄性不育性状外，两者没有明显的差别。Ms1Rf1 油菜与常规的油菜相比，在重要的营养成分方面也基本相当，不必担心它对营养和健康有不利影响。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

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。