

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 *cry3Bb1* 基因抗虫玉米 MON 863 进口用作加工原料  
的安全证书

申请单位: 孟山都远东有限公司

地 址: 北京朝阳区工体北路甲 2 号, 盈科中心 IBM 大厦 916 室

邮政编码: 100027

填报日期: 2003 年 12 月 31 日

中华人民共和国农业部制



## 孟山都公司文件

© 2003 孟山都公司 版权所有

本提交材料受著作权法保护。本提交材料只限于由孟山都公司提交的农业转基因生物安全行政主管部门使用，并且只能用于转基因产品检测目的。没有孟山都公司的事先书面同意，任何出于其它目的使用本提交材料将被严格禁止。孟山都公司提交本提交材料给相关行政主管部门并不表示孟山都公司批准任何个人或实体获得任何权利对本提交材料中涉及的知识产权进行授权许可或使用。

## 填 写 说 明

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

## 相关技术报告目录（技术报告为商业保密资料）

### 申请书下册（技术报告 1~18）

- 报告 1 转 *cry3Bb1* 基因“抗虫”玉米 MON 863 生态风险评估报告（中国农业科学院植物保护研究所）
- 报告 2 MON 863 玉米食用安全性评价报告（中国疾病预防控制中心营养与食品安全所）
- 报告 3 转 *cry3Bb1* 基因 MON 863 抗虫玉米及其产品食用安全性评价报告（中国疾病预防控制中心营养与食品安全所）
- 报告 4 玉米 MON 863 的分子生物学分析（孟山都研究报告，MSL-17152）
- 报告 5 抗食根虫玉米 MON 863 中插入 DNA 的序列确定及 PCR 分析（孟山都研究报告，MSL-17108）
- 报告 6 抗根虫玉米 MON 863 多世代间遗传稳定性的分子生物学分析（孟山都研究报告，MSL-17063）
- 报告 7 来自 1999 试验田种植的 MON 863 玉米样品组织中 B.t. Cry3Bb1.11098 和 NPTII 蛋白水平（孟山都研究报告，MSL-17181）
- 报告 8 1999 年美国田间试验中收集的抗玉米根虫玉米 MON 863 的秸秆和籽粒的成分分析（孟山都研究报告，MSL-17669）
- 报告 9 2000 年美国和加拿大田间试验中 MON 863 玉米农艺学比较（孟山都公司总结）
- 报告 10 2000-2001 年田间试验中对含有 MON 863 转化事件的抗根虫玉米杂交种进行的对非靶标生物生态评价（孟山都研究报告，MSL17531）
- 报告 11 大肠杆菌和 MON 863 产生的 Cry3Bb1 蛋白的特性和等同性分析
- 报告 12 SB-2001-085 研究[大肠杆菌产生的变异蛋白 Cry3Bb1 (LOT 6962478) 对小鼠的急性口服毒性研究]报告总结（孟山都研究报告，MSL-17382）
- 报告 13 利用过敏原、毒素和公共蛋白数据库对转基因玉米 MON863 产生的 Cry3Bb1 蛋白的生物信息学评价（孟山都研究报告，MSL-17140）
- 报告 14 从大肠杆菌和玉米转化事件 MON 863 中纯化的 Cry3Bb1 蛋白的体外消化性分析（孟山都研究报告，MSL17292）
- 报告 15 Cry3Bb1.11098 (Q349R) 蛋白在模拟肠道消化液中的离体消化性评价（孟山都研究报告，MSL-17530）
- 报告 16 MSL-16597 报告的修正：经热处理后的转基因抗虫玉米 MON 863 和 MON 853 品系的 Cry3Bb1.11098 和 Cry3Bb1.11231 蛋白的免疫检测（孟山都研究报告，MSL-17223）
- 报告 17 以 PUB-PEA 泛素为内标，对 1: 200 种子库的玉米 MON 863 的转化事件特异性 ENDPOINT TAQMAN PCR (BQ-QC-10602-01)
- 报告 18 推荐的用于保丰抗根虫玉米 MON 863 的实时定量 TAQMAN® PCR 的推荐步骤

## 目 录

一、申请表 .....	6
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
1 受体植物的安全性评价 .....	8
2 基因操作的安全性评价 .....	19
3 转基因植物的安全性评价 .....	43
4 转基因植物产品安全性评价 .....	60
六、相关附件资料 .....	61
1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列 .....	61
2. 目的基因与载体构建的图谱 .....	62
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 .....	62
4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术 .....	73
5. 各试验阶段审批书的复印件 .....	73
6. 各试验阶段的安全性评价试验总结报告 .....	73
7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告 .....	73
8. 食品安全性的综合评价报告 .....	73
9. 该类转基因植物国内外生产应用概况 .....	83
10. 田间监控方案 .....	74
11. 审查所需的其它相关资料 .....	84
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 .....	86
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 .....	96
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见 .....	98
八、本单位审查意见 .....	105
九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见 .....	100

## 商业保密资料声明

本申请书包含了许多属于孟山都公司开发并拥有的商业保密资料。这些商业保密资料是由孟山都公司投入巨大的人力物力，经过长时间的研究获得，包括研究路线的制定、各种表达调控元件的 DNA 序列、遗传操作策略和各种安全评价的数据等资料。孟山都公司目前只向世界各国农业转基因生物行政主管部门提交这些商业保密资料用于安全评价和审批的目的，而从未公开发表或向公众提供。一旦孟山都公司的竞争对手获得这些资料，竞争对手将会以很少人力物力投入在很短的时间内看发出类似 MON863 的相应产品，这对孟山都公司来说是不公平的。孟山都公司在中国国内外面临着许多技术实力很强的竞争对手。因此，孟山都公司依据《农业转基因生物安全评价管理办法》第三章第二十七条的有关规定以及本申请书的填写说明，要求对本申请书的商业保密资料进行保密。

# 一、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>cry3Bb1</i> 基因抗虫玉米 MON 863 进口用作加工原料的安全证书					
	项目来源	孟山都远东有限公司					
转基因生物概况	类别	动物 <input type="checkbox"/> 植物 <input checked="" type="checkbox"/> 微生物 <input type="checkbox"/> (选√)					
	转基因生物名称		转 <i>cry3Bb1</i> 基因抗虫玉米 MON 863				
	受体生物	中文名	玉米	学名	<i>Zea mays L.</i>		
		分类学地位	禾本科、玉蜀黍族、玉蜀黍属、玉米种	品种(品系)名称	Hi-II	安全等级	I
	目的基因 1	名称	<i>cry3Bb1</i>	供体生物	<i>Bacillus thuringensis</i>		
		生物学功能	编码合成 Cry3Bb1 蛋白, 对鞘翅目害虫有毒杀作用				
		启动子	P-4-AsI	终止子	T-Tahsp17		
	载体 1	PV-ZMIR13		供体生物	<i>Escherichia coli</i>		
	*标记基因 1	名称	<i>nptII</i>	供体生物	<i>Escherichia coli</i>		
		启动子	P-35S	终止子	T-NOS 3'		
	*报告基因 1	名称	无	供体生物			
		启动子		终止子			
	调控序列 1	名称	L-wtCAB	来源	<i>Triticum aestivum</i>		
		功能	小麦叶绿素 a/b 结合蛋白 5' 端非翻译区的前导序列, 可引导成熟蛋白定位到叶绿体上				
	调控序列 2	名称	I-ract1	来源	<i>Oryza sativa</i>		
		功能	水稻肌动蛋白 1 基因 5' 端区域, 含有部分启动子、转录起始点及第一内含子, 可能参与表达调控				
转基因方法	基因枪法		基因操作类型		2		
转基因生物品系(株系)名称		MON 863	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			

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

- 注：1. 申请农业转基因生物实验研究的，“受体生物品种（品系）名称、目的基因启动子和终止子、载体、标记基因、报告基因、调控序列、转基因生物品系（株系）”栏目不用填写。  
 2. 如果“标记基因”或“报告基因”已删除，应在表中标注。  
 3. 申请人指所申请项目的安全监管具体负责人。

## 二、项目内容摘要

孟山都公司利用基因枪法将 *cry3Bb1* 基因转入玉米植物基因组 DNA 中，开发了抗玉米根虫为害的玉米品系 MON 863。MON 863 可以表达经修饰的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 亚种 *kumamotoensis*, *B.t.*) 来源 Cry3Bb1 蛋白，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。

抗玉米根虫的转基因玉米 MON 863 是在玉米细胞中插入了编码修饰过的苏云金芽孢杆菌 Cry3Bb1 蛋白的基因。产生 Cry3Bb1 蛋白的植物能抵抗鞘翅目类昆虫和玉米根虫的危害。MON 863 中表达的 Cry3Bb1 蛋白与野生型相比有 7 个氨基酸的差异，可以同时提高抗玉米根虫的生物活性和植物中的蛋白表达量。

借助于基因枪法，将含有 *cry3Bb1* 基因的表达盒导入玉米受体自交系 Hi-II 中，同时导入的还有一个用于转化体筛选的选择标记，*nptII* 基因。经过连续世代的选择，最终得到 MON 863。通过 PCR、Southern 杂交等分子生物学分析，证明了插入表达盒的完整性，以及插入为单一位点的单拷贝插入，并且证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。而质粒中其余部分（质粒骨架）并未整合到植物基因组内。外源 DNA 插入玉米基因组时也没有发生植物遗传物质的删除。MON 863 中整合的遗传表达及调控元件可见表 1。Southern 杂交分析和子代分离数据证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。此外，多年多点的 ELISA 分析也证明了 Cry3Bb1 蛋白能够稳定表达。

表 1. MON863 中插入的表达调控元件及检测结果

遗传元件	玉米 MON 863 基因组 检测结果
转基因插入物数	1
<i>cry3Bb1</i> 盒拷贝数	1
<i>nptII</i> 盒拷贝数	1
<i>4-AS1 + wtCAB + ract 1</i>	完整
<i>cry3Bb1</i> 编码序列	完整
<i>tahsp17 3'</i> 端转录终止子	完整
<i>35S</i> 启动子	完整
<i>nptII</i> 编码序列	完整
<i>NOS 3'</i> 端转录终止子	完整
质粒骨架	无

*B.t.* 来源的 Cry 抗虫蛋白从 1958 年开始在美国开始商业化应用，用于生产具有杀虫活性的微生物来源的产品 (EPA, 1988)。大量的安全性研究已经证明，来源于 *B.t.* 蛋白的杀虫剂对哺乳动物的毒性极低 (McClintock 等, 1995)。模拟胃肠液消化试验表明，在模拟胃液中，全长 Cry3Bb1 蛋白 15s 之内就迅速降解。在模拟肠液中，全长 Cry3Bb1 蛋白会迅速降解为一个较短的稳定片段 (57 kDa)。研究表

明，包括 Cry1、Cry2、Cry3 和 Cry4 在内的所有 *B.t.* δ-内毒素家族蛋白均存在蛋白水解后从原毒素转变成为活性毒素的现象 (Rukmini *et al.*, 2000)。当暴露于胰蛋白酶或类胰蛋白酶昆虫中肠蛋白酶时，Cry 蛋白会降解成一个稳定的“胰蛋白酶核” (Höfte and Whiteley, 1989)。此外，这一现象也在其它 Cry3Bb1 变体蛋白 (Leach *et al.*, 2001b) 和其他 Cry3 蛋白 (Carroll *et al.*, 1989; Keck *et al.*, 1993) 中观察到。在急性口服试验中，大肠杆菌产生的 Cry3Bb1 变体蛋白以 400、1100 或 3200 mg/kg 体重的量喂食雌雄小鼠后无不良反应。因此，大肠杆菌产生的 Cry3Bb1 蛋白通过小鼠急性口服毒性实验得到的无可观察效应水平值 (NOEL) 至少为 3200 mg/kg，该数值是试验的最高检测剂量。2003 年中国疾病预防控制中心营养与食品安全所进行的大鼠 90 天的全食品喂养试验结果也表明，MON 863 玉米不会对大鼠体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理组织产生不良作用。

2000~2001 年北美田间试验和 2002~2003 年在吉林省、河北省和山东省进行的环境安全性检测结果均显示，抗虫玉米 MON863 在种苗萌发、表型特征（穗长、株高、根倒伏百分率、茎倒伏百分率、下垂穗百分率、持绿）、生长（种苗生活力、株高）、雄穗、花粉和丝生长长度单位及产量上，与常规玉米植株没有显著性差别。除了对靶标害虫的抗性外，MON 863 在虫害或病害的敏感性或耐性方面相对于非转基因对照没有改变，表明抗虫基因的导入并没有增强受体原有的生存竞争能力，不会增加其杂草化趋势。

在抗虫玉米 MON 863 上市之前，孟山都公司按照包括美国农业部动植物检疫局和美国食品与药品管理局在内的美国法规监管机构的有关法规要求对 MON 863 进行了大量的安全性检测，其中环境安全评价涵盖了对环境的影响、杂草化潜势、对非靶标生物的影响、遗传物质转移、生存竞争能力、适应性等，食用及饲用安全评价包括转入基因的分子生物特性分析、蛋白毒性及致敏性评价、营养成份的分析比较、毒理试验等，试验结果表明，MON 863 在环境安全、营养组成、食品安全等方面和其亲本 Hi-II 及常规玉米品种没有区别。

MON 863 于 2002 年在美国首先获得美国农业部 (USDA)、美国食品与药品管理局 (FDA) 的相关批准允许上市，随即获得美国环保署 (EPA) 关于商业化种植的许可，后又在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。自商业化应用以来，并没有发现 MON 863 玉米对环境或食用饲用安全产生不良影响的报道。

### 三、工作目的和意义

作为一种多用途的作物，玉米可用来生产食品、饲料和燃料。近年来，由于发展中国家的经济增长和发达国家对替代燃料的需求，全球对玉米的需求激增。这种需求大大超过了生产的增长，从而导致全球粮食储备的减少。此外，气候变化也可能会影响作物的产量，从而进一步造成供应的不足。这些因素综合在一起，对玉米在不利生产条件下的稳产性提出了更高的要求。

无论从种植面积还是生产净值来说，玉米都是美国最重要的作物。2000 年，美国玉米种植面积超过 7950 万英亩，产量 100 亿蒲式耳，净值 184 亿美元(NCGA, 2001)。在北美玉米生产中，最具威胁的害虫之一是玉米根虫 (CRW)。玉米根虫的幼虫通过取食根而危害玉米，从而减少植物从土壤中吸收水分和营养，引起植物倒伏而不易收获 (Reidell, 1990; Spike & Tollefson, 1991)。从化学杀虫剂使用量的角度看，2000 年，美国有约 1500 万英亩玉米为防治玉米根虫而不得不使用有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯 (NASS, 2000)。根据害虫为害造成购买土壤杀虫剂和作物损失的价值，玉米根虫已被称为“百万美元害虫” (Metcalf, 1986)。

孟山都公司利用基因枪法将 *cry3Bb1* 基因转入玉米植物基因组 DNA 中，开发了抗玉米根虫为害的玉米品系 MON 863。MON 863 可以表达经修饰的苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 亚种 *kumamotoensis*, *B.t.*) 的 Cry3Bb1 蛋白质，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。

早在 1996 年转基因抗虫玉米即开始在美国大规模商业化种植，当年种植面积即达 30 万公顷，随后加拿大、西班牙和法国也迅速加入转基因玉米种植领域。

MON 863 于 2002 年在美国首先获得美国农业部 (USDA)、美国食品与药品管理局 (FDA) 的相关批准允许上市，随即获得美国环保署 (EPA) 关于商业化种植的许可，后又在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。自商业化应用以来，并没有发现 MON 863 玉米对环境或食用饲用安全产生不良影响的报道。

随着世界范围内转基因玉米种植面积不断扩大，为了不影响玉米用作加工原料的进口，或是由于转基因玉米低水平混杂带来的贸易中断风险，孟山都公司按照农业部的相关法规要求提交有关MON 863的国内外安全性评价资料，旨在请求获得转*cry3Bb1*基因的抗虫玉米MON 863进口用作加工原料的安全证书，并不用于国内种植，望予以批准。

## 四、国内外研究的相关背景材料

### 全球转基因作物发展概况

随着生物技术的发展以及各国对生物技术领域投入的加大，使得全球科学家们特别是育种家和生物技术学家能够突破传统的育种框架来培育新的植物品种。20世纪80年代后期到90年代，包括联合国粮农组织(FAO)、世界卫生组织(WHO)在内的一些国际组织开始制定关于转基因植物及其产品的安全评价规范。80年代后期，在加拿大、美国开始出现小规模的转基因植物田间试验。90年代中期，美国首次批准转基因植物大面积种植，从而揭开了转基因植物商业化应用飞速发展的序幕。目前应用最为广泛的转基因性状是耐除草剂和抗虫作物，主要转基因作物有大豆、玉米、棉花和油菜。

根据美国食品和药物管理局公布的最新资料，美国目前经过批准投入商业化应用的转基因作物品种已经达到53个。其中以玉米品种最多，共有16个，占转基因作物品种总数的30%；其次为油菜品种，共有9个，占17%。其他依次分别为番茄品种和棉花品种各6个，土豆品种4个，大豆品种3个，甜菜和南瓜品种各2个，水稻、亚麻、木瓜、罗马甜瓜和菊苣品种各1个。

根据国际农业生物工程应用技术采购管理局的资料显示，2002年全球转基因作物种植面积已达5870万公顷，比上年增加610万公顷，增长11.6%。这已经是连续第6年全球转基因作物种植面积以10%以上的速度增长。以2002年为例，全球大豆、玉米、棉花和油菜转基因作物的种植面积分别为3650万公顷、1240万公顷、680万公顷和300万公顷，各占转基因作物总面积的62.2%、21.1%、11.6%和5.1%。与2001年相比，转基因大豆面积增加320万公顷，增长9.6%；转基因玉米面积增加260万公顷，增长26.5%；转基因油菜面积增加30万公顷，增长11.1%；转基因棉花面积持平。从2002年全球四种主要转基因作物面积占当年该作物种植总面积的比例来看，以大豆最高，占51%，比2001年提高了5个百分点；棉花次之，占20%；油菜第三，占12%，比2001年增加了1个百分点；玉米占9%，比2001年提高了2个百分点。在1996至2002年间，全球转基因作物种植面积从170万公顷迅速扩大到5870万公顷，7年间增长了35倍，从而使得转基因作物成为普及应用速度最快的先进农作物技术之一。

在全球转基因作物面积迅速扩大的同时，种植转基因作物的国家也在不断增多。2002年全球有16个国家的550万~600万农民种植转基因作物，而2001年和1996年分别只有13个和6个国家种植转基因作物。2002年转基因作物种植面达百万公顷以上的国家共有4个，依次为美国3900万公顷，占全球转基因作物总面积的66.4%；阿根廷1350万公顷，占23.0%；加拿大350万公顷，占6.0%；中国210万公顷，占3.6%。这四个国家的转基因作物面积占全球转基因作物总面积的99%，另外12个国家（南非、澳大利亚、印度、罗马尼亚、西班牙、乌拉圭、墨西哥、保加利亚、印度尼西亚、哥伦比亚、洪都拉斯、法国）的转基因作物面积之和仅占全球转基因作物总面积的1%。

转基因农作物为社会经济和农民带来巨大收益。据ISAAA的报告估计，2000年全球转基因农作物的市场价值(根据种子销售价格加上应用中各种技术费用估算)

为 30 亿美元，2001 年为 38 亿美元，到 2002 年则高达 42.5 亿美元，每年增长速度在 10% 以上。根据研究估算，仅 Bt 棉花的应用可能使全球减少 33000t 杀虫剂需求，或使全球减少 40% 杀虫剂的使用。在 2001 年美国种植的 6 种转基因作物减少了 23000t 杀虫剂使用。中国种植 Bt 棉花可使农民收入每公顷增加 89.4 美元，或使全国增加 7.5 亿美元的收入。

愈来愈多的证据显示，转基因作物正在或将为全球粮食产量的安全稳定和减缓第三世界的饥饿问题发挥出潜在的作用。来自 ISAAA 乐观的谨慎预测，全球转基因作物种植面积和种植转基因作物的农民数目在 2003 年将继续增加。用于转基因产品研发的投入不断增多，更多新的生物技术产品也会在今后几年进入商业化。

### **抗虫转基因玉米的研究进展**

从种植面积和净产值来看玉米是美国第一大作物。在美国玉米产量和谷物质量都受到虫害引发的减产的巨大影响 (James, 2003 年)。

1991 年, Rupar 等报告发现了一个 B.t 新品系 (GenBank Access No.: EG4691)，它产生一个对黄瓜十一星叶甲 (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) 具有活性的晶体蛋白。Donovan 等 (1992) 分离和测序了编码这个蛋白质的基因，它被命名为 CryIIIB2 (M89794)。随后标准命名法定为 B.t 晶体蛋白 (Cry 蛋白)，从 EG4691 分离的蛋白质称为 Cry3Bb1。野生型 Cry3Bb1 存在于商业产品 Raven Oil Flowable 生物杀虫剂中，该生物杀虫剂自 1995 年起，即已在美国销售用于防治鞘翅目害虫。经鉴定，Cry3Bb1 与另一种 Cry3 蛋白——Cry3Aa4 (M30503) 大约有 67% 的氨基酸序列相同，后者在美国也已商业使用，防治马铃薯的主要害虫马铃薯甲虫 (Perlak et al., 1993)。

孟山都公司应用基因枪转化法将来源于苏云金杆菌的 *cry3Bb1* 基因和选择性标记基因 *nptII* 转入常规玉米基因组中得到抗虫玉米 MON 863。MON 863 于 2002 年在美国首先获得 FDA 和 USDA 的商业化批准，随即在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。

此外，孟山都公司同时期研发的含 *cry1Ab* 基因的生物技术产品保丰抗玉米螟玉米 (称为 MON 810) 也在美国获准商业化许可，*cry1Ab* 基因来自于苏云金杆菌 (Bt)，编码 Cry1Ab 蛋白，可以抵抗鳞翅目害虫尤其是欧洲玉米螟虫 (ECB, *Ostrinia nubilalis*) 及玉米穗虫 (CEW, *Helicoverpa zea*) 的危害。当时在美国由鳞翅目害虫为害导致的作物减产和用于虫害防治的费用每年大约十亿美元 (Mason et.al.1996)。MON 810 以及其它抗虫玉米产品的应用为玉米种植者提供了一个控制鳞翅目害虫幼虫如欧洲玉米螟和玉米穗虫的更有效的解决方案，同时降低了抗虫玉米籽粒中有害的毒枝菌素的含量水平，它通过降低害虫侵扰从而降低了产生毒枝菌素的真菌感染机会，提高了玉米食品和饲料的安全性。此外，MON 810 和其它抗虫玉米产品的应用减少了化学杀虫剂的使用。

转基因抗虫玉米带来的一系列好处使得种植者们确信，通过生物技术改良农作物品种，将继续成为生产成本效益最佳、最维持环境安全，同时能确保全球粮食供求稳定的永续途径。

## 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

受体植物为玉米，学名为 *Zea mays* L.，俗名为玉米，也称作玉蜀黍、苞米、棒子等。

##### 1.1.2 分类学地位

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

*Gramineae* (禾本科)

*Maydeae* (玉蜀黍族)

Genus *Zea* (玉蜀黍属)

*Zea mays* L. (玉米种)

ssp. *mays* (栽培玉米亚种)

##### 1.1.3 试验用受体植物品种（或品系）名称

MON 863 转基因玉米所用受体品种名为 Hi-II，是 A188 和 B73 自交系玉米的衍生后代，其亲本分别是美国明尼苏达大学和爱荷华州立大学开发的自交系。

##### 1.1.4 是野生种还是栽培种

MON 863 转基因玉米所用受体 Hi-II 是具有安全使用历史的栽培种。

##### 1.1.5 原产地及引进时间

大量研究表明，玉米很可能于 7,000 到 10,000 年前在墨西哥南部开始驯化。虽然玉米公认的起源目前还没有找到，但是墨西哥玉蜀黍很可能在玉米的遗传背景中起了重要作用。

哥伦布发现新大陆时，从智利到加拿大南部的当地文明社会正在种植玉米。哥伦布于 1492 年指出在古巴南部沿海地区有玉米种植，并在返回西班牙时把玉米引入了欧洲（Goodman, 1988）。玉米引入欧洲以后不久，玉米传遍了世界上可以种植玉米的所有地区。

对于玉米的起源，目前有四个主要的假说（OECD, 2003）：

1. 来自于墨西哥玉蜀黍（又称类玉米或大刍草）：利用墨西哥玉蜀黍选育产生的玉米；
2. 三重假说：a) 玉米来自于果穗玉米；b) 利用玉米和三囊草杂交衍生的墨西哥玉蜀黍；c) 通过玉米同墨西哥玉蜀黍或者三囊草种间杂交，或者同二者同时种间杂交，进化出来的现代玉米品种（Mangelsdorf, 1974）；
3. 普通起源假说：玉米、墨西哥玉蜀黍和三囊草独立地来源于同一种常见但未知的祖先；
4. 灾难性有性突变假说：墨西哥玉蜀黍由于后来遗传有性突变，导致雌穗的发育，从而产生了现代玉米。

此外还有一些推断，如*Andropogoneae*族里的*Coix*和*Manisuris*属的遗传组成也对玉米基因组有一定贡献。这些假说已经通过研究杂交种的基因组共同性、可育性、变异性和生态学植物特性的分离进行了检验，也通过考古学证据和通过分子遗传标记的使用进行了检验。

这些假说都有许多不同的研究报道支持。但是，大多数的证据支持玉米来自于墨西哥玉蜀黍（Galinat, 1988）。墨西哥玉蜀黍的基因组类似于玉米，易于同玉米杂交，还具有几个类似于玉米的植物生态学特性，这些证据证明玉米极有可能起源于墨西哥玉蜀黍。

玉米何时被引入中国还无定论。公元 1511 年安徽省《颍州志》物产中所列珍珠禾被认为是我国玉米的最早记载（中国作物遗传资源，1994）。山东农科院主编的《中国玉米栽培学》（1986 年）中认为《颍州志》中的珍珠禾应属高粱的一个品种。我国最早记载玉米的古籍有 1555 年河南《巩县志》、1551 年（明嘉靖 30 年）河南《襄城县志》、1555 年河南《巩县志》、1560 年甘肃《平凉府志》、1563 年《大理府志》和 1574 年的《云南通志》等。一般认为玉米是由阿拉伯人从西班牙带到麦加，由麦加经中亚西亚传入我国的西北部，再传到内陆各省；或从麦加传入印度和我国西南部，而后向其他地区传播。但是由于当时沿海地区商业发展迅速和航海事业十分发达，玉米经由海路传入东南沿海地区也是可能的。早期引进的玉米是硬粒型的，马齿型玉米是在 20 世纪 20 年代以后引入的。在 1760 年以前由云南广西一带的硬粒型地方品种经突变和选择形成了糯质玉米品种（详见《中国农业发展史》（严万英等，1992）；《中国农业科学技术史稿》（梁家勉，1989）；《中国作物栽培史稿》（唐启宇，1986）。

### 1.1.6 用途

如今，玉米在 100 多个国家有商业化种植。主要的玉米生产国是美国、中国、巴西、墨西哥、法国和印度，占全世界玉米总产量的 75%。种植玉米主要是为了获得玉米籽粒，其大多数用作动物饲料，但是也有相当大的部分制成产品用于食品、药物和工业产品等广大领域。从 2000 年开始，在河南省和中国西北地区的 3 个省玉米被用来提炼燃用酒精。应用范围现已扩大到东北、河北、山东、江苏等许多地区。

#### 食品：

玉米籽粒中胚乳约占 82%、胚约占 12%、皮层约占 5%（其中 2.2%由粗纤维构成）、尖端约占 1% (Earle et al., 1946; Perry, 1988)。人类对玉米的消费方式主要是加工食品或食品成分，只有很少的比例直接食用籽粒 (Watson, 1988)。用于食品和工业目的的玉米籽粒大多数 (77%) 通过湿磨粉方式进行加工。在籽粒湿磨的过程中，胚芽可以被提取用于生产玉米油，但更重要的产品是淀粉。

将胚芽部分同胚乳分离，经压榨可分离出玉米油，可用于制造人造黄油、烹调油和烤炸油，供人类食用。玉米油尽管只占整个植物油市场的一小部分，但其含有的多不饱和脂肪酸却具有重要的营养和保健作用。玉米油在冷藏温度下具有良好的香味、色泽、稳定性和澄清度。因为含有亚麻脂肪酸和维生素 E，被认为是一种高级植物油。这种精制油 50%左右用于烹饪油和沙拉油，25%用于生产人造奶油，25%用于其他目的，压榨后的胚芽可以用作饲料。

将玉米胚乳磨粉，然后离心处理，可以将淀粉从玉米渣分离出来。约 40% 的淀粉作为食品直接消费或者用于其他工业目的，约 60% 转化为各种甜味剂 (White and Pollack, 1995)。淀粉可以转化成多种甜味剂和发酵产品，包括高果糖玉米糖浆和乙醇。玉米淀粉也可以作为一种食品组成成分，如乳制品和冰激凌、面糊食品、烤制食品、汤料、酱油和浓汤、沙拉、肉、禽和鱼制品、糖果和饮料等等。

在食品加工业里，TD 系统法得到了最广泛的采用，常见的产品是粗磨谷粉、粗粉、面粉、油和饲料 (OECD, 2002)。

#### 饲料产品：

玉米籽粒里含有的代谢能是牲畜饲料里使用的各种谷物中最易于代谢的能量 (Ensminger et al., 1990)。玉米籽粒里有大约 83% 的碳水化合物，以淀粉、戊聚糖、糊精、糖、纤维素和半纤维素的形式存在。碳水化合物中淀粉的含量最高，能提供大部分能量。纤维包括纤维素和半纤维素，可以被反刍动物消化吸收。玉米籽粒中油的含量大约为 4%，玉米油含有大量的 18:2 亚麻酸，这是猪和家禽必需的多聚不饱和脂肪酸之一。与其他谷物籽粒相比，玉米籽粒中蛋白质含量相对较低，约占籽粒干重的 10%，但是由于玉米在动物饲料中所占比例较高，所以玉米是饲料中某些必需氨基酸的来源，如玉米籽粒是甲硫氨酸的良好来源，但不是赖氨酸和色氨酸的来源。甲硫氨酸和赖氨酸是以玉米为主要饲料成分的家禽、猪和其他牲畜中两个最重要的限制性氨基酸 (NRC, 2001)。

玉米面筋粉、淀粉渣和蒸馏干酒糟，作为湿法和干法磨粉的副产品，是牲畜饲料的重要成分。玉米淀粉渣和面筋粉是湿法磨粉的副产品，可掺入动物饲料中。面筋里蛋白质含量较高 (60%)，是类胡萝卜素的重要来源。它通常用于牛、鱼、家禽、宠物和其他动物饲料，主要用在家禽的日粮里。玉米淀粉渣（湿的或者干的）是极好的饲料，其淀粉和油含量低，可消化纤维含量高，是蛋白质 (20%) 的重要来源，主要用于奶牛和肉牛的日粮里。

除籽粒外，玉米还可用于青贮饲料，而青贮饲料作为重要的适口性能源，是饲养场和奶牛场的一种主要的饲草成分 (Newcomb, 1995)。

#### 1.1.7 在国内的应用情况

玉米在中国的农业生产结构中起着重要的作用，是优良的饲料、重要的工业原料和优质的粮食作物。中国是世界上主要玉米生产国之一，玉米分布在北纬 $50^{\circ}\sim 20^{\circ}$ 间自东北至西南一个狭长的地带，包括14个省、市、自治区。中国玉米带可分为6个产区：I. 北方春播玉米区；II. 黄淮海夏播玉米区；III. 西南山地玉米区；IV. 南方丘陵玉米区；V. 西北灌溉玉米区和VI. 青藏高原玉米区（详见1.3.1部分和Error! Reference source not found.）。其中，前3个产区占玉米播种总面积的80%。

历史上，玉米单独或与其他谷类粮食一起制作各种中国人喜食的食品（如玉米饼、面包、蛋糕等）。鲜玉米（包括普通玉米和甜糯玉米）可直接食用。在过去的20年间，玉米成为最重要的饲料作物之一。玉米作为原材料可生产300多种工业产品或作为制药原料。玉米的最终用途也在迅速变化；玉米正越来越多地用于大型养猪场和家禽场，而不再仅仅是一种粮食作物或者农家院养猪养鸡的饲料

（Rozelle and Carter, 2001）。中国大约75%的玉米用于动物饲料，其余的用于人类消费和工业用途。80年代在中国的市场经济改革和调整（Tuan and Peng, 2001）极大地促进了畜牧业的发展，也因此提高了玉米作为饲料的需求量（Rozelle and Carter, 2001）。

### 1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响

玉米原产于墨西哥，早在公元前2,700年就作为粮食作物进行种植（Salvador, 1997）。几百年来，一直是动物饲料和人类的主食。玉米籽粒及其加工成分可以在各种食品和动物饲料产品里。食用玉米时发生的过敏反应极为少见；研究最多的是同脂类传递蛋白质有关的课题（Pastorello *et al.*, 2000）。此外，玉米籽粒中不含毒素和致敏蛋白（Watson, 1982; White and Pollak, 1995）。

尽管玉米在全世界广泛种植，但是人们并不认为它会成为永久性杂草或者难于防治的杂草。由于玉米雌性花序（果穗）会限制种子的传播，因此玉米在野生环境里的生存竞争能力很差。

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

### 1.1.9 从历史上看，受体植物演变成有害植物（如杂草等）的可能性

玉米是起源于西半球为数不多的主要作物物种之一。虽然目前还没有找到公认的玉米起源，但极有可能墨西哥玉蜀黍在玉米的遗传背景里起了重要的作用。玉米从野生物种驯化成依靠人类耕作才能生存的栽培物种，经历了很长的时间。与杂草不同，由于玉米雌性花序（果穗）能限制种子的传播，玉米很难在野生环境里存活，因此栽培玉米不具有杂草倾向。

### 1.1.10 是否有长期安全应用的记录

如前所述，玉米原产于墨西哥，早在公元前2700年就作为粮食作物进行种植（Salvador, 1997）。长期以来，玉米一直是人类和动物的主要食物来源，具有长期的安全使用历史。

## 1.2 受体植物的生物学特性

### 1.2.1 是一年生还是多年生

玉米是雌雄同株异花的一年生禾本科栽培植物。

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

根据 OECD (2002)，玉米里有几个为人熟知的抗营养因子，包括植酸、丁布 (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H)-one (DIMBOA))、棉子糖、胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂。

玉米籽粒中的植酸能螯合矿物营养元素，包括钙、镁、钾、铁和锌，使单胃动物在生理学上不能消化吸收这些营养元素 (Liener, 2000)。人们同时认为植酸对于动物，特别是非反刍动物，是一种重要的抗营养因子，因为它能降低磷的生物学有效性。因此在饲料加工过程中人们通常会向猪和家禽饲料中额外添加植酸酶，以提高磷的利用率。

丁布 (DIMBOA) 属于一组代谢物，即氧肟酸和酚类化合物，通常可以在谷类植物中发现。DIMBOA 里的葡萄糖苷即：DIMBOA-glc，是在玉米最初发育阶段存在于地上部绿色组织和根部组织里的这类化合物中最重要的一种 (Cambier *et al.*, 2000)。DIMBOA-glc 在受伤的植物组织里，利用酶去除葡萄糖苷，变成 DIMBOA，后者对昆虫有毒性 (OECD, 2002)。

棉子糖是一种低分子量的碳水化合物，由于食用后它能产生气体造成肠胃气胀，人们认为它是一种抗营养因子 (Maynard *et al.*, 1979)。此外，玉米里还有低量的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的抑制因子，不过通常人们认为这两个因子都不会对营养产生重要影响 (White and Pollak, 1995)。

除了上述这些抗营养因子外，没有报道表明玉米种含有其它有毒物质。

### 1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏原存在的部位及其致敏的特性

玉米不是常见的过敏反应食品，目前很少有关食用玉米产品后发生过敏反应的报道 (OECD, 2002)。过去的 7 年中，在美国只有两例相关报道 (Pauls and Cross, 1998; Tanaka *et al.*, 2001)。Jones *et al.* (1995) 认为，许多对籽粒表现过敏的人实际上是对花粉过敏，这些人中有大约 80% 的人进行食物攻击试验时没有产生临床过敏症状。此外，在曾经对籽粒产生过敏反应的人中，虽然多数会对小麦蛋白质发生过敏反应 (~75%)，但对玉米籽粒产生过敏反应的人极少，一百多位病人中不到 6 位向该小儿科过敏反应专科中心报告发生了过敏反应。

来自于意大利的一份最新报告 (Pasini *et al.*, 2002) 表明，有一些过敏病人出现的食品过敏反应，同食用包括玉米粥在内的玉米产品出现的过敏反应症状相一致，其中来自拿波里的 6 位病人轻度食品攻击试验结果呈阳性 (Pasini *et al.*, 2002)。但是，上述意大利研究中所报告的病人，通常对杂草、prunidae 类植物产生的花粉、籽粒及香料等，都会发生多重过敏反应。多重过敏反应使得临幊上识别特定病例

的致敏原时具有不确定性；由于过敏反应之间或多或少潜在的交叉作用，使得皮试诊断和离体 IgE 结合试验更为复杂。目前，还没有足够的证据来了解在意大利或地中海地区玉米产品过敏反应流行的特点，也还没有来自于世界其他地区关于玉米食品过敏反应的报告实例。这表明，由于食用玉米及其衍生产品，对人类造成过敏反应的风险很可能是很低的。

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

玉米是有性繁殖作物，是自交、杂交均亲合的物种（Wilkes, 1972, 1989）。花粉的传播方式主要是风媒传粉（OECD, 2003b），虫媒传粉较少。自花授粉使同一植株内遗传特征趋向纯合，而异花授粉能结合不同植株的遗传特点，这一自交、杂交的概念和由此产生的产量效应是现代玉米杂交育种的理论基础。有生命力的花粉可以传播的距离取决于风的特点、湿度和温度等。

#### **1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率**

玉米是风媒授粉、自交亲合、杂交可育的物种（Wilkes, 1972, 1989）。有生命力的花粉可以传播的距离取决于风的特点、湿度和温度。除了某些爆裂玉米品种和杂交种因为一个配子体遗传因子（在染色体 4 上的 Ga<sup>s</sup>、Ga 和 ga 等位基因系列）影响其受精以外，玉米与近缘种间可以进行杂交授粉。

玉米和墨西哥玉蜀黍具有遗传可亲合性。在墨西哥和危地马拉，它们在距离较近、其它条件良好时，可以自由杂交。但墨西哥玉蜀黍的自然分布仅局限于沿着墨西哥和危地马拉西部崖坡的季节性干燥的、夏季有雨的亚热带地区和墨西哥中部高原地区（Wilkes, 1972; Gonzalez and Corral, 1997）。玉米和摩擦禾属可杂交，但极为不易。并且杂交种具有高度的不育性，在遗传学上也不稳定（Mangelsdorf, 1974）。Galinat (1988) 的研究进一步说明，由于摩擦禾属和玉米染色体数目不同，添加一个多余的摩擦禾属染色体到玉米基因组的几率是很低的，因此染色体间的交换率极低。

#### **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）**

玉米是可育植物，在自然条件下具有授粉、受精和结实能力。理论上任何传递的花粉均有产生种子的潜力。但有许多因素可以引起玉米的雄花不育，如高温、干旱、辐射、化学药物处理以及营养元素缺乏等。

#### **1.2.7 全生育期**

玉米自播种至成熟经历了营养生长（V）和生殖生长（R）阶段（Kumudini and Tollenaar, 1998）。这个过程可进一步分为许多阶段：

**苗期（VE~V5）：**由于中胚轴迅速生长，玉米出土。随后，胚叶开始通过胚芽鞘尖长出来，50% 以上玉米苗高 2~3 cm 以上称为出苗。苗期是以生根、长叶、茎节分化为主的营养生长阶段，一般历时 20~35 天不等。

**拔节期至抽雄期 (V6~VT):** 玉米生长点位于地面以上，茎迅速伸长使玉米拔节。拔节是由玉米由营养生长转向营养生长与生殖生长并进的时期。至最后一片叶长出，随后雄穗出现，玉米达到最大株高。一般历时 27~30 天。

**吐丝期 (R1):** 当花丝在苞叶外面可见，抽丝即告开始，在这一阶段胚珠外观白色，内部清晰可见，含有很少的液体，胚不可见。在抽丝前后的二周是玉米植株的生命周期里对环境逆境最敏感的阶段。在这一阶段，在逆境条件下常见籽粒败育。败育造成的籽粒数目的减少会造成严重减产。

**水泡期 (R2):** 吐丝后大约 10~14 天，水泡期即开始。其特点是籽粒的穗轴上有淡白色的水泡状籽粒，里面的胚乳含有透明的液体，而胚形状较小但可以分辨出来。花已经完成了授粉受精功能，开始干枯。

**乳熟期 (R3):** 花丝形成后大约 18~22 天，籽粒外观为黄色，随着淀粉在胚乳里开始积累，其内为乳状白色液体。此时通过解剖，胚易于辨认。乳熟期穗粒数已经确定，籽粒中干物质的积累是影响产量的主要因素。

**蜡熟期 (R4):** 花丝形成后大约 24~28 天，随着淀粉在胚乳内持续积累，使籽粒内部乳状液体变稠，形成“团样”液体，蜡熟阶段即告开始。

**凹陷期 (R5):** 花丝形成后大约 35~42 天，全部或部分籽粒顶部开始凹陷，在籽粒的凹陷端附近，出现了一条明显的水平线，它是成熟籽粒液体（乳）区和固体（淀粉）区的分界线，称作“乳线”。随着籽粒的成熟，“乳线”将向着籽粒的基部（穗轴方向）移动。当浆线在籽粒的顶部和基部之间达到 50% 时，籽粒即为 40~45% 含水量，并且已经达到了其最终干物质重的 95%。

**完熟期 (R6):** 花丝形成后大约 55~65 天，籽粒的干物质达到最大值，籽粒即达到生理性成熟。在籽粒的乳线消失后不久，籽粒基部形成黑层，就达到了完熟期阶段。黑层首先在果穗顶部籽粒出现，随后基部籽粒逐步产生。黑层出现后籽粒的平均含水量为 30~35%，但可以随着环境条件的不同而有所变化。

## 1.2.8 在自然界中生存繁殖的能力，包括越冬性、越夏性及抗逆性等

玉米经过长期的驯化，使种子成为唯一繁殖器官，并需要人类的帮助使其继续世代繁衍或者空间传播 (Gould, 1968; OECD, 2002)。在自然生境里，玉米是非侵袭性的物种，并且已经丧失了其在野生条件下存活的能力 (Gould, 1968)。同杂草植物相比，玉米有雌性花序（果穗），穗轴被苞叶包裹。于是，一般不能发生单粒种子的传播。

玉米不具无性繁殖能力，种子不具休眠特性。玉米种子的存活取决于温度、湿度、基因型、果皮保护和种子成熟度等。温度降到 0°C 以下会影响萌发，因此低温是种子生产期间的主要风险。高于 45°C 的温度也会对种子的生活力产生不良影响 (Shaw, 1988)。水分在玉米的生长季节是限制性因素，尤其在玉米的开花期和灌浆期，水分不足可以导致授粉困难或胚胎败育 (Claassen and Shaw, 1970)。

虽然在上一生长季节洒落的玉米可以越冬并有可能在下年萌发，但是它不能像杂草一样长期存活。在许多农田系统里，常见的玉米自生苗很容易去除。因此离开人工栽培管理，玉米不能长期持续繁殖（Gould, 1968）。

### 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

玉米在中国分布很广，南起海南岛，北到北纬 50° 的黑龙江，东起台湾及沿海各省，西到新疆、青藏高原，都有玉米种植。东北及西南高寒山区为春播玉米，黄淮海流域为夏播玉米，在广西、海南等省可一年两季种植。根据各地气候条件、生产条件和种植制度，从东北到西南的狭长区域内，形成了中国玉米的主要种植区，即北方春播玉米区、黄淮海夏播玉米区、西南山地玉米区、南方丘陵玉米区、西北灌溉玉米区和青藏高原玉米区。

**北方春播玉米区：**为我国主要玉米主产区，占全国播种总面积的 39.2%，占全国总产的 43.8%。该区包括黑龙江、吉林、辽宁、宁夏，内蒙古、山西大部，河北、陕西和甘肃北部。生态条件和生产条件都适合玉米生长，地势平坦，土壤肥沃，光照充足，无霜期 130~170 天，年降雨量 400~800 mm (60% 降雨在 6~9 月间)。属于一年一熟制地区。

**黄淮海夏播玉米区：**为我国玉米的主产区，占全国播种总面积的 32.7%，占全国总产的 35.5%。该区包括山东和河南、河北大部、山西中南部、陕西关中地区和江苏徐淮地区，是玉米的集中产区。水资源丰富，黄河、淮河和海河横穿该区，年降雨量为 500~900 mm (70% 降雨在夏季)，灌溉面积达 50%，属于一年两熟制地区。

**西南山地玉米区：**也属于我国的玉米主产区，占全国播种总面积的 18.4%，占全国总产的 13.4%。该区包括四川、云南和贵州省、陕西南部、广西西部高原地区、湖南、湖北和甘肃部分地区。山地占该区的 90%，地形复杂。无霜期为 240~330 天，降雨量为 800~1200 mm。该区种植的玉米易受生物和非生物胁迫（如干旱和病虫害）的危害。属于一年一熟或一年多熟制地区。

**南方丘陵玉米区：**该区面积广大，包括广东、海南、浙江、江苏和安徽南部、广西东部、湖南和湖北省。该区主要种植水稻，玉米面积较小，只占全国播种面积的 3.2%，产量只占全国总产的 2.2%。该区位于热带和亚热带地区，无霜期 220~360 天，降雨量 1000~1800 mm，适合玉米生长。属于一年三熟或一年四熟制地区。

**西北灌溉玉米区：**该区为干旱地区，降雨量低于 200 mm，包括新疆、河西走廊、宁夏河套地区。这一地区的作物主要靠灌溉。无霜期 130~180 天。玉米播种面积占全国播种面积的 3%。属于一年一熟制地区。

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

#### 1.3.2 生长发育所要求的生态环境条件，包括自然条件和栽培条件的改

## 变对其地理分布区域和范围影响的可能性

玉米生长发育理想的生态条件包括充足的土壤含水量、能促进种子萌发和出土的最佳土壤温度和充足的土壤养分。玉米生产的最佳时期是最热月份的等温线在 21~27°C 之间，无霜期在 120~180 天之间。15 cm 的夏季降雨量约为无灌溉条件下玉米生产的降雨下限，玉米生长期间的降雨量虽无上限，但过多的降雨会导致减产。

温度是玉米生长的一个关键因素。温度降到 0°C 以下会影响种子的萌发，因此低温是种子生产期间的主要风险。高于 45°C 的温度也会对种子的生活力产生不良影响 (Shaw, 1988)。在玉米达到生殖生长阶段（抽穗至开花期）后，持续的高温会减少花粉的活力和产量。水分在玉米的生长季节是限制性因素，尤其在玉米的开花期和灌浆期，水分不足可以导致授粉困难或胚胎败育 (Claassen & Shaw, 1970)。

因此，通过调整栽培措施，如人工灌溉等，可以扩大玉米的种植区域和范围。

### 1.3.3 是否为生态环境中的组成部分

经过长期的人工栽培和驯化，玉米早已成为农业生态系统中一个重要组成部分。正如在 1.1.7 节里讨论的那样，玉米早在 16 世纪就来到了中国，是早期的欧洲传教士带来的。目前，玉米在中国的多数省份都有种植（见 1.3.1 部分）。如在 1.2.8 部分中所指出的，玉米不能在非人工栽培条件下生存。

### 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

如上所述，某些墨西哥玉蜀黍物种可以同玉米杂交产生可育后代，但是墨西哥玉蜀黍只生长在墨西哥和危地马拉 (Sánchez-González & Ruiz-Corral, 1997)。摩擦禾属的某些物种可以同玉米杂交，但极为不易。并且杂交种具有高度的不育性，不具有遗传学稳定性 (Mangelsdorf, 1974)。此外，玉米没有杂草特性和杂草化倾向，不能有效地侵袭现有的生态系统。因此，生态环境的改变将不可能对玉米产生过多的生态效应，如演化为侵袭性杂草或造成稀有物种濒于灭绝等。

玉米是一种异交作物。如在 1.3.1 中提到的，中国各个地区都有玉米的种植。预计玉米和其他作物或植物的生态学关系不会由于生态环境的变化而发生改变。

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

在生态系统中，玉米同土壤内外的其他生物有一定的生态学关系。玉米根系由于其同诸多微生物群体，如细菌、真菌、放线菌 (Vega-Segovia and Ferrera-Cerrato, 1996)、原生动物和螨类等有一定的关系，所以还能起到土壤调节的作用。一些有益昆虫同玉米保持生态关系；玉米同时也有一些常见的病虫害。锈病、黑粉病、

叶斑病和茎腐病等都是玉米上的常见病害，其发生情况和经济学意义因国家而异。如曲霉菌和镰刀菌等真菌也会侵染玉米，而它们产生的霉菌毒素会影响人类和牲畜的食用。虫害和干旱等逆境可以加剧真菌的侵染（Dowd, 2001）。

玉米的主要害虫来自于鳞翅目和鞘翅目昆虫。鳞翅目的幼虫如玉米螟可以取食玉米的叶片、茎和穗部。鞘翅目的幼虫如玉米根虫可以取食根部、茎、花丝和花粉，成虫可以取食叶部（Dicke and Guthrie, 1988）。

同玉米一起存在的生物与玉米的生态学关系，其任何的变化，预计将不会对人体健康或环境产生任何的负面影响。

### 1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度

玉米是栽培作物，在中国具有长期的栽培历史，对生态环境不会造成风险。

### 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

玉米具有长期的栽培历史，是中国四大主要作物之一，是重要的粮食和饲料作物，在中国普遍种植。因此不属于非通常种植的植物物种。

## 1.4 受体植物的遗传变异

### 1.4.1 遗传稳定性

玉米是高等植物中应用较广的遗传学研究和应用材料。玉米是最早在实验室中开始遗传研究的作物之一。早期人们对玉米细胞的有丝分裂、减数分裂、染色体分离与连锁和转座子效果等遗传现象都进行了广泛的研究。由于玉米在美国和世界经济中扮演着重要的角色，所以玉米的遗传学研究至今仍受到重视。大量的遗传学研究结果表明，玉米的性状通过自交和回交可以稳定遗传。

玉米进化成为自由授粉作物物种后，直到二十世纪，玉米栽培品种才成为今天意义上的异花授粉作物。哥伦布发现新大陆之前，当地的土著人利用简单的群体选择，培育了一些品种。在今天看来，他们的选育方法极为简单，但这些选择方法能十分有效地培育品种或品系，以满足他们对食物、燃料、饲料和文化的需求。随着西半球文化的发展，发现了品种间杂交育种方法，由此开始了利用植物的遗传变异来培育特定的品种。

十九世纪二十年代，科学家奠定了玉米杂交育种基础理论。人们通过进行玉米品种遗传组成的基础研究，来确定某个特定玉米品种内的自花授粉效应（Shull, 1909）。当对玉米单株连续进行 7 至 10 代的自花授粉，可以培育出纯系（即自交系），这个纯系群体中的每个植株都有相同的遗传特性。孟德尔遗传学理论对在自交过程中发生的遗传变化进行了正确解释：通过自交，使每个基因位点上的杂合等位基因逐步发生纯合，形成纯系。在纯系里等位基因的纯合，使植株的活力和生产力普遍下降。

### 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

在玉米育种过程中，育种家利用诱变、杂交等手段创造新的遗传变异，用来选育新品种。玉米在自然条件下也会产生一些遗传变异，育种家也经常有目的的选择、利用这些自然变异进行品种改良。目前未见这些遗传变异对人类或环境产生不利影响的资料。

### 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

植物有可能发生基因漂移，并通过正常有性传播实现基因渐渗，但必须具备一定条件：1) 两个亲本必须有性亲合；2) 物候学特性必须有一定重叠，即花期相遇；3) 必须有适当的花粉载体，它能在两个亲本之间传递花粉。

玉米和一年生墨西哥玉蜀黍具有遗传亲合性。在墨西哥和危地马拉，距离较近时，通过风媒传粉可以自由杂交（Wilkes, 1967; Sanchez et al., 1998）。但在中国没有墨西哥玉蜀黍。

在野生条件下，玉米同摩擦禾属物种杂交是极为困难的（Wilkes, 1972）。因为摩擦禾属植物对生境的要求类似于墨西哥玉蜀黍，所以在中国没有摩擦禾属植物。

### 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

未发现任何关于遗传物质由玉米通过种间有性杂交向其他物种传递的报道。理论上讲，遗传物质通过水平传递到其他生物是可能的，但在自然条件下，从植物向动物或者微生物的水平基因传递，在试验上目前还没有得到证实（Bertolla and Simonet, 1999）。

## 1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性

玉米的独特外观、状态和生长习性使其易于识别和监测。利用某些选择性除草剂和广谱除草剂，如草甘膦、阿特拉津、乙草胺等，可以有效控制农田系统中不想要的玉米。此外，还可以利用中耕的方法防治玉米的自生苗。

## 1.6 受体植物的其他资料

为本申请目的，没有更多的资料要提供。但更多有关玉米的其他资料可以从相关的教材、科技书籍、网站等信息渠道上获得。

### 1.7 根据上述评价，参照本办法第十一条有关标准划分受体植物的安全等级

综上所述，玉米对人体或动物没有毒性；并且不具有杂草化倾向；对环境产生负面效应或者演变成有害生物的可能性极小。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

孟山都公司利用基因枪介导的转化方法，将源于 PV-ZMIR13 质粒上含有 *cry3Bb1* 基因的 *Mlu* I 内切酶片段转入玉米植物基因组 DNA 中，开发了抗玉米根虫的玉米品系 MON 863。MON 863 可以表达经修饰的苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis* 亚种 *kumamotoensis*, *B.t.*）的 Cry3Bb1 蛋白质，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。

### 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

源自于质粒 PV-ZMIR13 的 *Mlu* I 线性化片段 PV-ZMIR13L 被用于 MON 863 玉米的转化。该线性化片段含有一个完整的 *cry3Bb1* 基因表达盒。用于转化的 DNA 片段含有两个基因表达盒：1) 受 4-AS1 植物启动子调控的 *cry3Bb1* 编码序列，小麦叶绿素 a/b 结合蛋白 (wtCAB) 的 mRNA 前导序列，水稻肌动蛋白编码基因内含子 (*ract1*)，以及小麦热休克蛋白 17.3 (*tahsp17*) 3' 端多聚腺嘌呤序列；2) 受花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子调控的 *nptIII* 编码序列，以及一个胭脂碱合酶 (NOS) 3'端多聚腺嘌呤序列。新霉素磷脂转移酶 II (Beck et al., 1982) 作为选择性标记 (Fraley et al., 1983)。借助于基因枪法介导转化受体玉米 Hi-II，通过一系列方法对转化事件 MON 863 进行分子特征鉴定，确定转化时上述 *cry3Bb1* 基因表达盒被完整地导入植物基因组中。

## 插入全长序列分析

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 1. 重叠 PCR 分析证实 MON 863 玉米中插入各元件排列方式

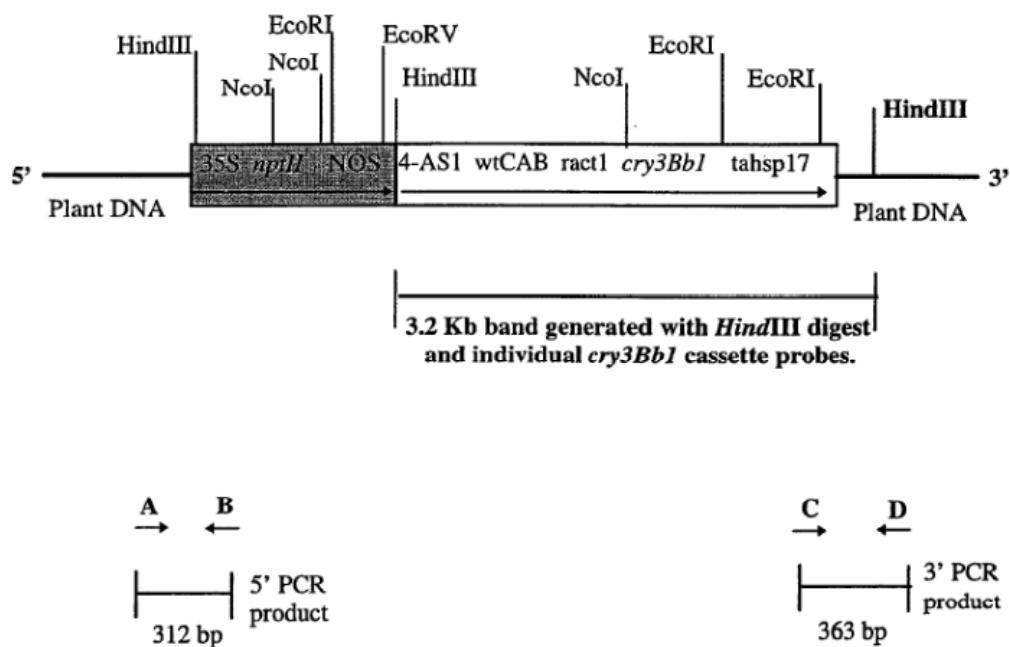


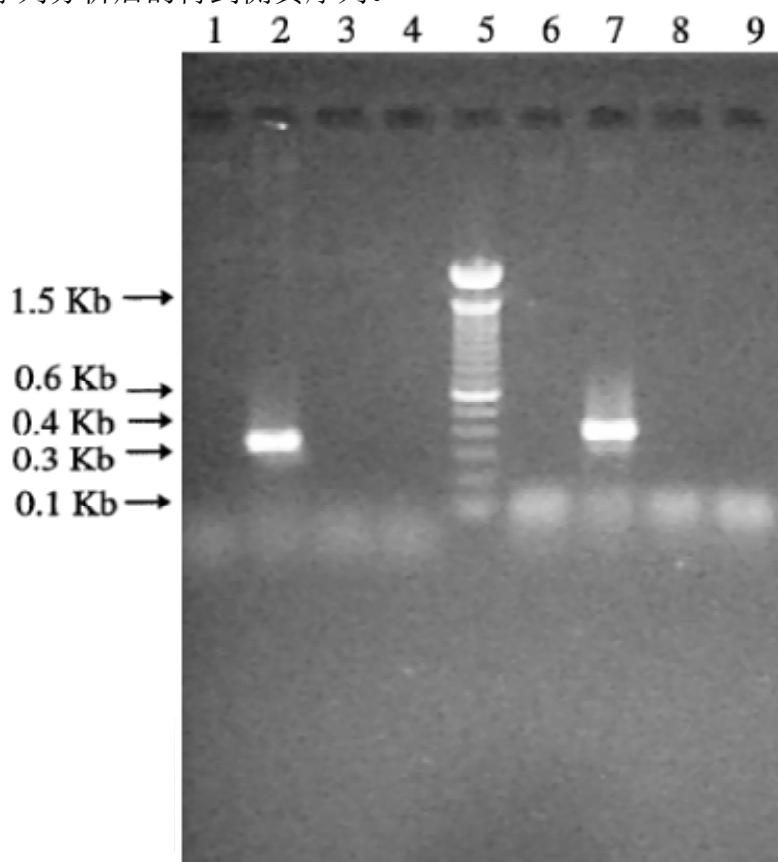
图 2. MON 863 插入及侧翼序列的酶切位点线性图

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 3. MON 863 中插入的序列全长及侧翼序列（商业保密资料）

## 5'和3'侧翼基因组序列分析

使用 PCR 和 DNA 测序分析确定插入 MON 863 基因组 DNA 5' 及 3' 端的侧翼序列。5' 和 3' 端引物对中均有一个引物位于侧翼序列，另一个引物则位于插入序列中。PCR 反应结果见图 4。MON 846、蒸馏水和不相关的转基因玉米品系都未得到预期 PCR 产物（泳道 1、3、4、6、8 和 9）。MON 863 基因组 DNA 5' 端 PCR 产生了预期的 312 bp 大小的产物，3' 端 PCR 产生预期的 363 bp 大小的产物，所得产物进行序列分析后的得到侧翼序列。



**图 4. PCR 分析 MON 863 5' 和 3' 基因组侧翼序列**

从 MON 863、对照 MON 846 和一个无关的转基因玉米品系的籽粒中提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 分析。泳道描述如下：

- 1、10 $\mu$ l MON 846 5'PCR 产物
- 2、10 $\mu$ l MON 863 5'PCR 产物
- 3、10 $\mu$ l 无关转基因玉米品系 5'PCR 产物
- 4、10 $\mu$ l 无模板对照 5'PCR 产物
- 5、Gibco BRL 100 bp DNA 分子量标准
- 6、10 $\mu$ l MON 846 3'PCR 产物
- 7、10 $\mu$ l MON 863 3'PCR 产物
- 8、10 $\mu$ l 无关转基因玉米品系 3'PCR 产物
- 9、10 $\mu$ l 无模板对照 3'PCR 产物

→ 箭头标示分子量大小 (kb)

## 2.2.2 删 除区域的大小和功能

通过对 MON 863 与常规玉米对照基因组 DNA 分别进行 PCR 和序列分析，未发现抗虫玉米 MON 863 插入位点附近发生植物基因组 DNA 的删除。

## 2.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

### 抗虫玉米转化事件 MON 863 中 *cry3Bb1* 基因的核苷酸序列（商业保密资料）

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

### 由 *cry3Bb1* 基因核苷酸序列推导的氨基酸序列

```
1  MANPNNRSEH DTIKVTPNSE LQTNHNQYPL ADNPNSTLEE LNYKEFLRMT
51 EDSSTEVLDN STVKDAVG TG ISVVGQILGV VGVPFAGALT SFYQSFLNTI
101 WPSDADPWKA FMAQVEVLID KKIEEYAKSK ALAELQGLQN NFEDYVNALN
151 SWKKTPLSLR SKRSQGRIRE LFSQAESHFR NSMPSFAVSK FEVLFLPTYA
201 QAAANTHLLL KDAQVFGE EW GYSSEDVAEF YRRQLKLTQQ YTDHCVNWYN
251 VGLNGLRGST YDAWVKFNRF RREMTLTVLD LIVLFPPFYDI RLYSKGVKTE
301 LTRDIFTDPI FLLTTLQKYG PTFLSIENSI RKPHLFDYLQ GIEFHTRLRP
351 GYFGKDSFNY WSGNYVETRP SIGSSKTITS PFYGDKSTEP VQKLSFDGQK
401 VYRTIANTDV AAWPNGKVYL GVTKVDFSQY DDQKNETSTQ TYDSKRNNNGH
451 VSAQDSIDQL PPETTDEPLE KAYSHQLNYA ECFLMQDRRG TIPFFTWTMR
501 SVDFFFNTIDA EKITQLPVVK AYALSSGASI IEGPGFTGGN LLFLKESSNS
551 IAKFKVTLNS AALLQRYRVR IRYASTTNLR LFVQNSNNDF LVIYINKTMN
601 KDDDLTYQTF DLATTNSNMG FSGDKNELII GAESFVSNEK IYIDKIEFIP
651 VQL*
```

## 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

Southern杂交、PCR分析和DNA测序等分子生物学特征方法均证实，源自于 PV-ZMIR13质粒的*Mul I*线性片段以单拷贝形式整合到玉米基因组的单个遗传位点上。此外，多个世代的分离数据也证实，MON 863中抗虫性状在后代中的分离比例符合经典的孟德尔遗传规律。综合上述数据，可推测MON 863中外源DNA序列被稳定地整合到玉米基因组中，并以经典的孟德尔分离比遗传给后代。

## 2.2.5 插入序列的拷贝数

用 Southern 杂交方法分析了插入数（玉米基因组中被整合位点的数目）、拷贝数（一个整合位点外源 DNA 片段的数目）、插入的基因表达盒的完整性、以及骨架序列是否存在与转化体中。数据显示 MON863 含有单个 DNA 插入，含有一个拷贝的 *cry3Bb1* 和 *nptII* 基因，除此之外，转化所用 DNA 片段上与完整插入片段相连或不相连的其它元件都没有在 MON 863 基因组中检出。此外，也没有检测出 MON 863 中存在 PV-ZMIR13 质粒骨架序列，包括 *ori-pUC* 和受细菌启动子调控的 *nptII* 编码区。综上，这些数据证实了 MON 863 的插入区只能编码两个预期全长蛋白：Cry3Bb1 和 NPTII。此外，对来源于 R0 自交产生的 F2 代及其产生的后两个 F2 世代基因组 DNA 的 Southern 印迹分析证实了插入 DNA 的遗传学稳定性。

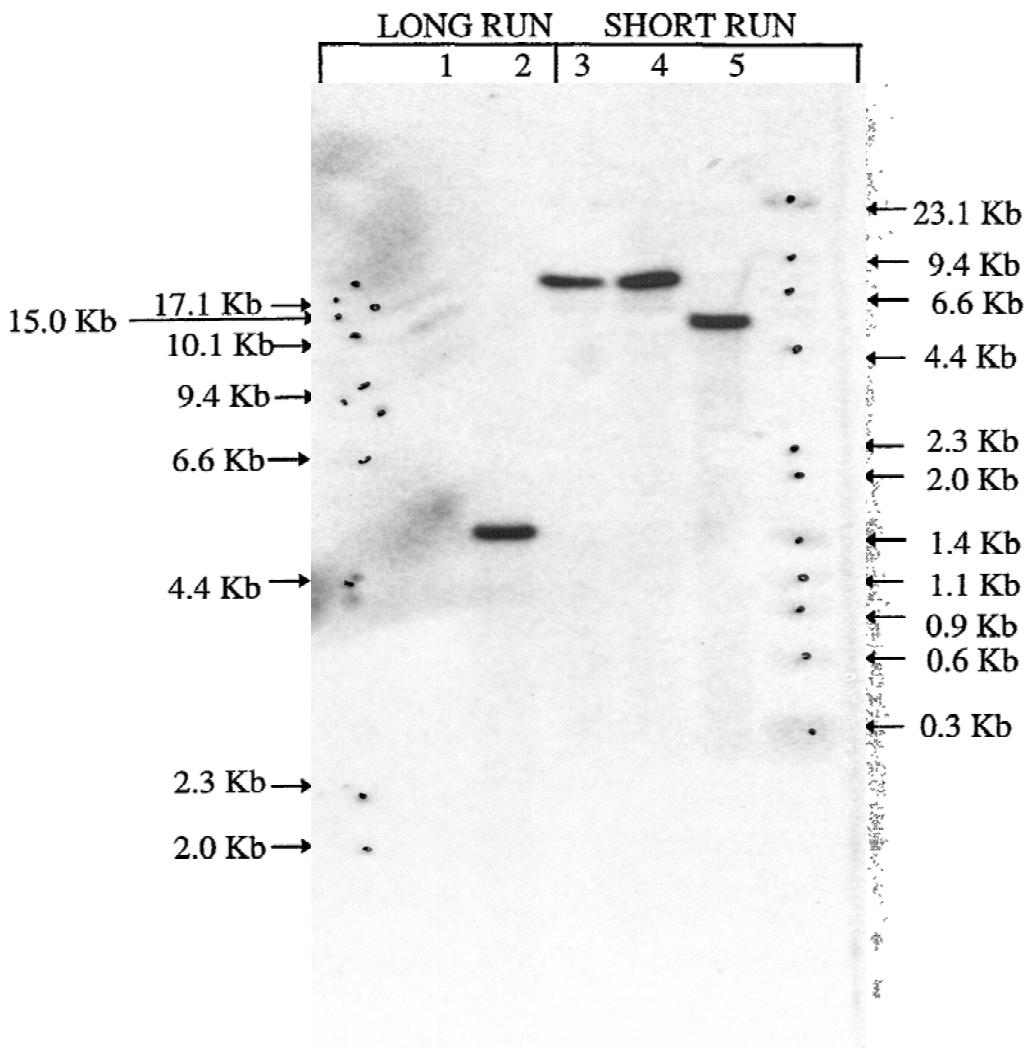
需要说明的是，MON 846 是同时与 MON 863 进行分子特征鉴定的另一转化事件，在 MON 863 的所有 Southern 杂交分析中，可将其视为阴性对照。

### 插入数的 Southern 杂交分析

测试和对照DNA用限制性内切酶*NdeI*消化，PV-ZMIR13质粒与MON 846对照DNA的混合物用*NdeI*和*EcoRV*消化。*NdeI*在质粒内部不存在酶切位点，所以需用*EcoRV*使质粒线性化，帮助其在凝胶上的迁移，使其可以作为一个精确的分子量大小估计标准。以放射性标记的转化用PV-ZMIR13L线性DNA (~4.7 kb, 图15)为探针进行杂交，结果如图5所示。对照MON 846 (第1道)作为阴性对照，没有产生可检测条带；PV-ZMIR13质粒DNA与MON 846 DNA混合物 (第3、4道)产生了预期大小的约7.3 Kb全长质粒条带；MON 863 DNA (第2、5道)产生了约5.0 kb的预期条带。因此，这一结果证实MON 863含有一个定位在约5.0 Kb *Nde I*限制性片段上的插入。

### 拷贝数的Southern杂交分析

用*EcoRV*消化测试DNA、对照DNA，以及对照DNA与PV-ZMIR13质粒混合物。以PV-ZMIR13L (图15)为探针，PV-ZMIR13质粒提供了用于转化的线性DNA片段，结果如图6所示。MON 846对照DNA (第1道)在9.3 Kb处有模糊条带，因其也出现在MON 863道 (第2、5道)中，这可能是非特异性杂交所致。MON 846 DNA与PV-ZMIR13DNA的混合物 (第3、4道)产生了预期大小的约7.3 Kb条带，代表全长线性质粒大小。因为质粒条带的存在，第3、4道没有发现非特异性杂交所致的9.3 Kb条带。MON 863 DNA (第2、5道)在3.7 Kb和9.6 Kb处产生了两条独特条带。限制性内切酶*EcoRV*只在转化所用PV-ZMIR13L片段上有一个酶切位点 (图15)，因此，对于只含一个拷贝插入DNA的事件来说，应该会产生两条边界片段的条带；如果一个事件的印迹多于两条带，则可推断有不止一个DNA片段拷贝被转化。由于本次分析中只有两条带出现，证实MON 863在一个整合基因座上只含单拷贝转化DNA片段。



**图 5. MON 863 中插入数的 Southern 杂交分析**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Nde*I 进行消化, PV-ZMIR13 质粒与 MON 846 对照 DNA 的混合物用 *Nde*I 和 *Eco*RV 消化, 以放射性标记的转化用 PV-ZMIR13L 线性 DNA 为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

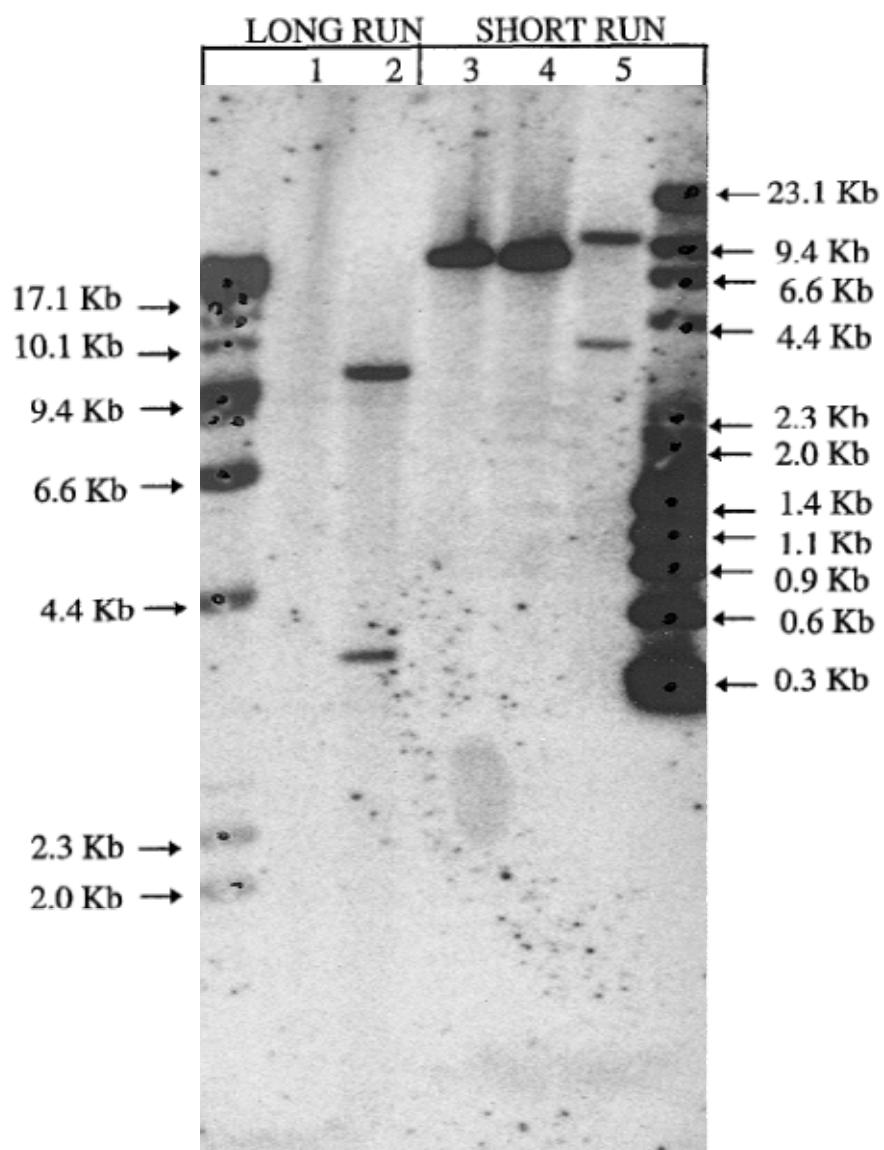


图 6. MON 863 中插入拷贝数的 Southern 杂交分析

10μg 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20μg 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Nde*I 进行消化, PV-ZMIR13 质粒与 MON 846 对照 DNA 的混合物用 *Nde*I 和 *Eco*RV 消化, 以放射性标记的转化用 PV-ZMIR13L 线性 DNA 为探针进行杂交, 沸道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
  - 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
  - 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 (0.5 拷贝)
  - 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 (1.0 拷贝)
  - 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

### cry3Bb1 表达盒的完整性分析

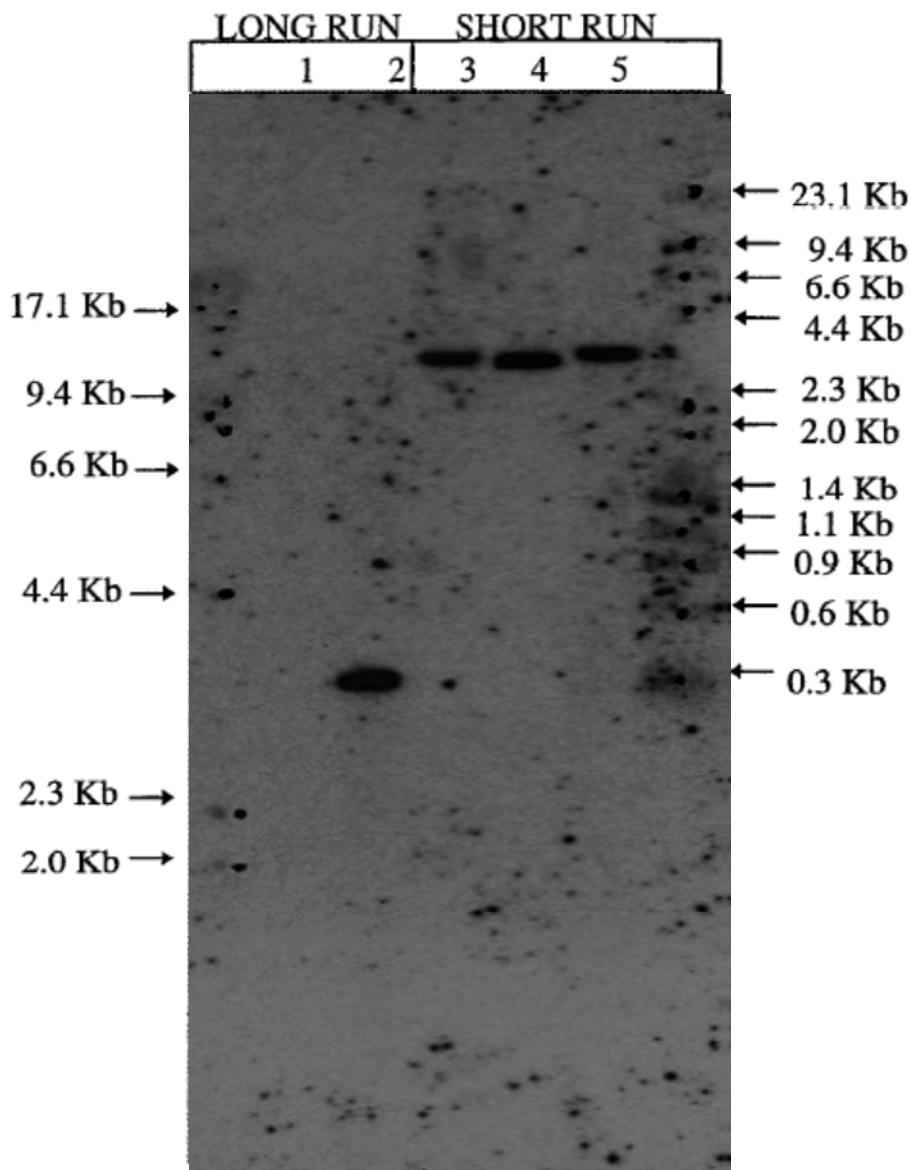
测试及对照 DNA 用限制性内切酶 *Hind*III 消化后可释放 *cry3Bb1* 表达盒。被消化的对照 DNA 摄入含有 *cry3Bb1* 表达盒的 PV-ZMIR13 上 3.0 Kb 的 *Hind*III 限制性片段，分别以 4-*AS1* 启动子-wtCAB 前导区-*ract1* 内含子、全长 *cry3Bb1* 编码序列或是 *tahsp17* 3' 多聚腺嘌呤序列为探针进行 Southern 印迹分析。

**AS1启动子-wtCAB前导区-*ract1*内含子（图7）：**MON 846对照DNA（第1道）为阴性对照，没有产生可检测的杂交条带。PV-ZMIR13 *cry3Bb1*表达盒DNA与MON 846混合物（第3、4道）产生了*cry3Bb1*表达盒大小的预期约3.0 Kb条带。MON 863 DNA（第2、5道）在约3.2 Kb处有条带，比预期条带大小稍大。基因组侧翼序列数据显示，PV-ZMIR13L的3'端有约10bp缺失，包括*Hind*III位点和一半*Mlu*I的位点；然而在插入的3'端约175 bp处有一个基因组*Hind*III位点，因此，插入的*cry3Bb1*表达盒预估大小应为约3.2 Kb。没有非预期条带检出，证实事件MON 863除包含在完整的*cry3Bb1*表达盒中的4-*AS1*启动子、wtCAB前导区和*ract1*内含子外，不含有任何其它多余的以上元件。

***cry3Bb1*编码区（图8）：**作为阴性对照，MON 846对照DNA（第1道）无可检测杂交条带。PV-ZMIR13 *cry3Bb1*表达盒DNA与MON 846混合物（第3、4道）产生了预期的约3.0 Kb条带，与*cry3Bb1*表达盒大小相符。MON 863 DNA（第2、5道）在约3.2 Kb处有条带，其大小与PV-ZMIR13L 3'端*Hind*III位点缺失的完整*cry3Bb1*表达盒相符。没有非预期条带检出，证实事件MON 863除完整的*cry3Bb1*表达盒外不含任何其它可检测的*cry3Bb1*编码区。

***tahsp17* 3' 多聚腺嘌呤序列（图9）：**作为阴性对照，MON 846对照DNA（第1道）无可检测杂交条带。PV-ZMIR13 *cry3Bb1*表达盒DNA与MON 846混合物（第3、4道）产生了预期的约3.0 Kb条带，与*cry3Bb1*表达盒大小相符。MON 863 DNA（第2、5道）在约3.2 Kb处有条带，其大小与PV-ZMIR13L 3'端*Hind*III位点缺失的完整*cry3Bb1*表达盒相符。基因组侧翼序列表明，虽然PV-ZMIR13L的3'端*Hind*III位点发生缺失，但是*tahsp17* 3'端多聚腺嘌呤序列在MON 863中仍然存在。没有非预期条带检出，证实事件MON 863除包含在完整的*cry3Bb1*表达盒中的*tahsp17* 3'端多聚腺嘌呤序列外，不含有任何其他多余的该元件。

以 4-*AS1* 启动子-wt CAB 前导序列-*ract1* 内含子、*cry3Bb1* 编码区和 *tahsp17* 3' 多聚腺嘌呤序列为探针评估 *cry3Bb1* 表达盒完整性时，可产生预期大小的条带。基因组侧翼序列数据表明 PV-ZMIR13L 的 3' 端存在大约 10bp 的缺失，包括 *Hind*III 位点和一半的 *Mlu*I 位点，但 *tahsp17* 3' 端多聚腺嘌呤序列是完整的。这些数据表明，MON 863 基因组含有单个完整的 *cry3Bb1* 表达盒。

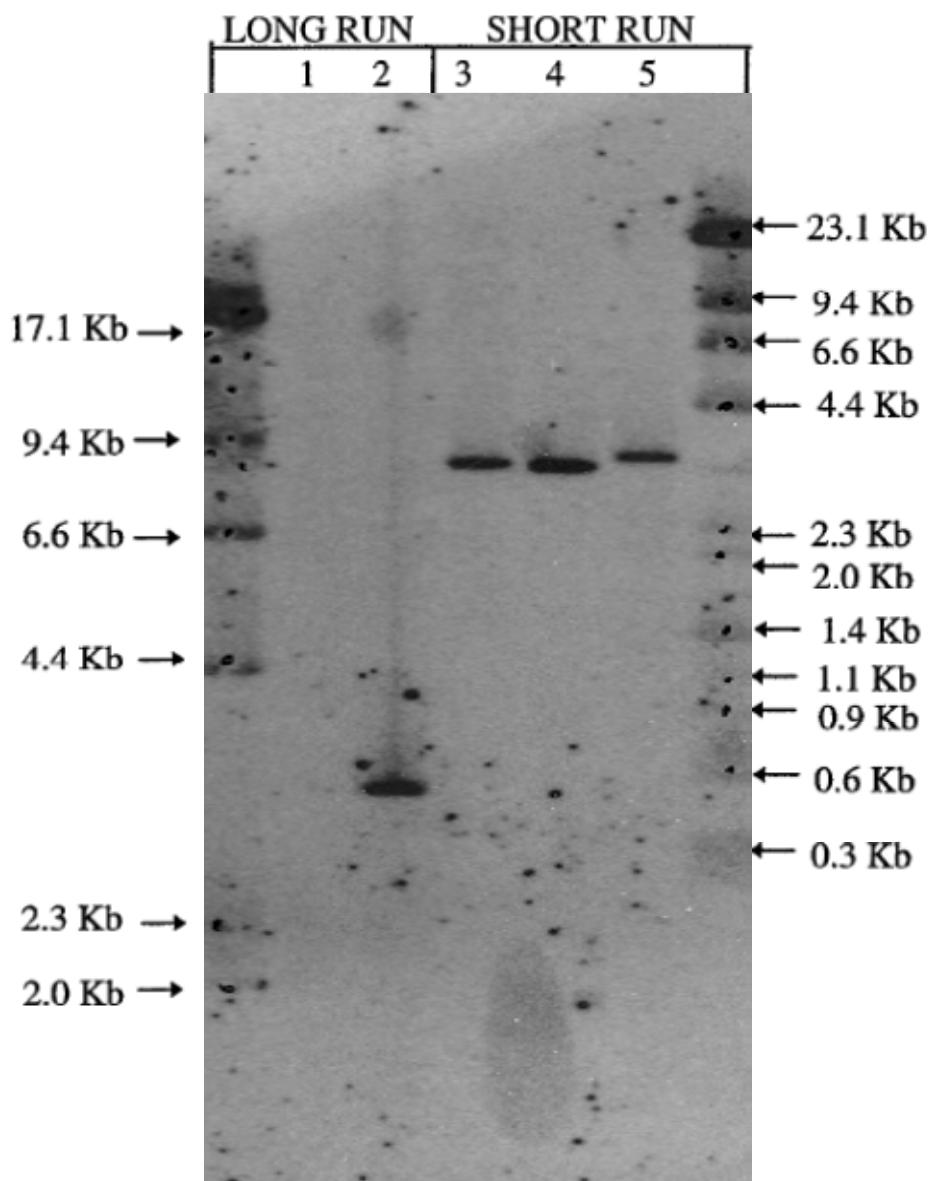


**图 7. MON 863 中 *cry3Bb1* 表达盒完整性的 Southern 杂交分析  
——AS1 启动子-wtCAB 前导区-ract1 内含子探针**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind*III 进行消化, 以放射性标记的全长 AS1 启动子-wtCAB 前导区-ract1 内含子序列为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

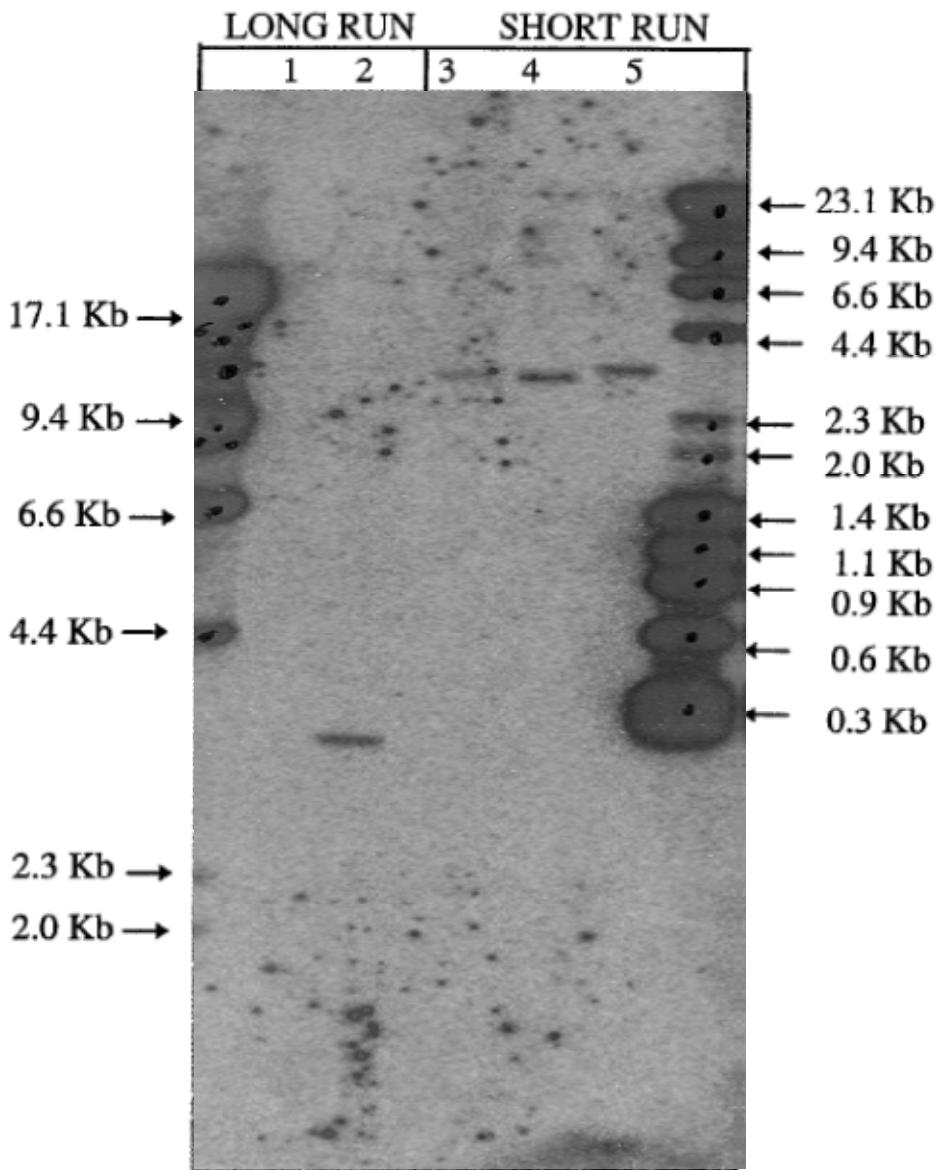


**图 8. MON 863 中 *cry3Bb1* 表达盒完整性的 Southern 杂交分析  
——全长 *cry3Bb1* 编码序列探针**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863(测试)基因组 DNA 用 HindIII 进行消化, 以放射性标记的全长 *cry3Bb1* 编码序列为探针进行杂交, 池道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)



**图 9. MON 863 中 *cry3Bb1* 表达盒完整性的 Southern 杂交分析  
——*tahsp17* 3'多聚腺嘌呤序列探针**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind*III 进行消化, 以放射性标记的 *tahsp17* 3' 多聚腺嘌呤序列为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 *cry3Bb1* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

## *nptII* 表达盒完整性

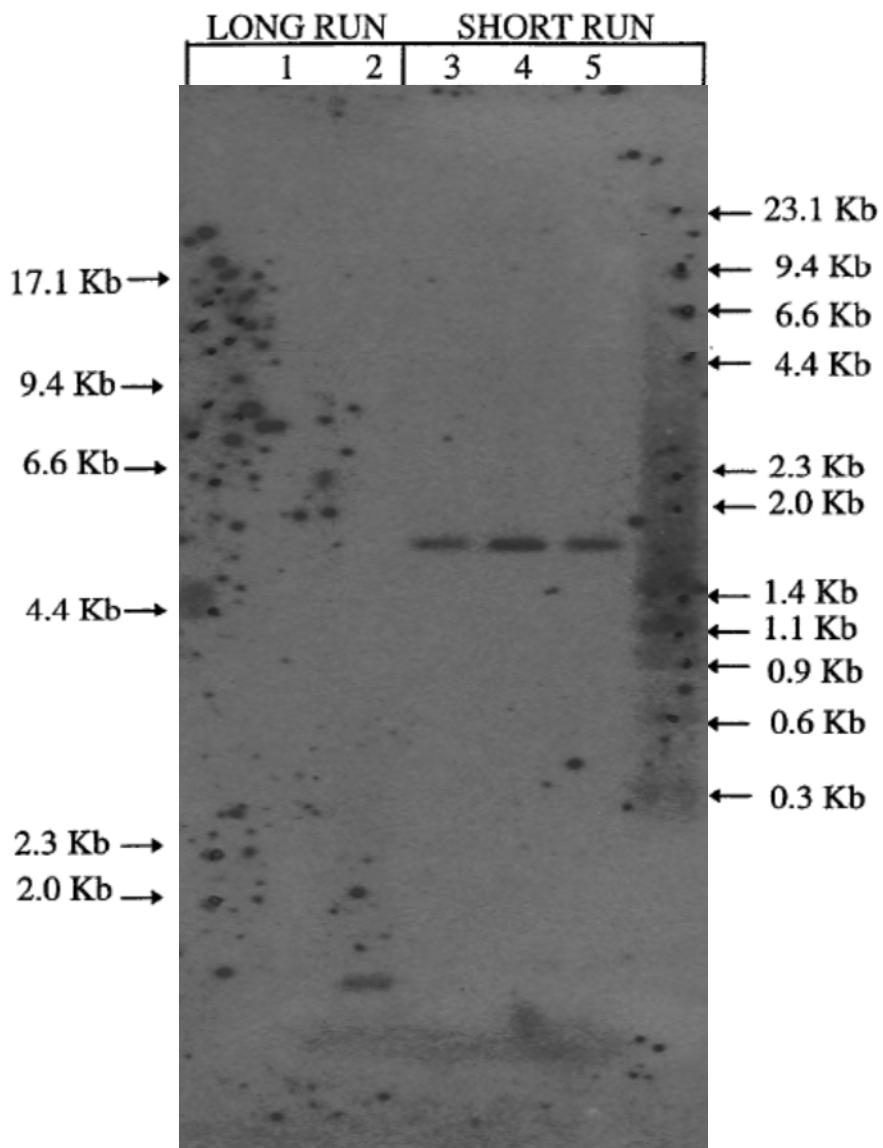
试验和对照DNA用*Hind*III消化释放*nptII*表达盒。将消化的对照DNA和1.6 Kb的PV-ZMIR13质粒*Hind*III消化片段混合，该片段含有*nptII*表达盒。分别以35S启动子、*nptII*编码区以及NOS 3'端多聚腺嘌呤序列为探针进行Southern印迹检测。

**35S 启动子（图 10）：**阴性对照 MON 846 基因组 DNA（泳道 1）中未发现可检测的杂交条带，与预期结果一致。PV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 DNA 混合 MON 846 DNA（泳道 3 和 4）在大约 1.6 Kb 位置产生预期大小的条带。MON 863 DNA（泳道 2 和 5）也在大约 1.6 Kb 位置处产生条带，和完整的 *nptII* 表达盒大小相符。未检测到非预期的条带，说明 MON 863 中除了包含在完整 *nptII* 表达盒中的 35S 启动子，不含有其它的 35S 启动子序列。

***npt II* 编码区（图 11）：**阴性对照 MON 846 基因组 DNA（泳道 1）中未发现可检测的杂交条带，与预期结果一致。PV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 DNA 混合 MON 846 DNA（泳道 3 和 4）在大约 1.6 Kb 位置产生预期大小的条带。MON 863 DNA（泳道 2 和 5）也在大约 1.6 Kb 位置处产生条带，和完整的 *nptII* 表达盒大小相符。未检测到非预期的条带，说明 MON 863 中除了包含在完整 *nptII* 表达盒中的全长 *nptII* 编码序列外，不含有其它的 *nptII* 编码序列。

**NOS 3'端多聚腺嘌呤序列（图 12）：**阴性对照 MON 846 基因组 DNA（泳道 1）中未发现可检测的杂交条带，与预期结果一致。PV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 DNA 混合 MON 846 DNA（泳道 3 和 4）在大约 1.6 Kb 位置产生预期大小的条带。MON 863 DNA（泳道 2 和 5）也在大约 1.6 Kb 位置处产生条带。在泳道 4 和 5 之间印迹底部的位置出现非特异杂交，但不影响对此印迹结果的解释。未检测到非预期的条带，说明 MON 863 中除了包含在完整 *nptII* 表达盒中的 NOS 3'端多聚腺嘌呤序列外，不含有其它的 NOS 3'端多聚腺嘌呤序列。

分别以 35S 启动子、*nptII* 编码区以及 NOS 3'端多聚腺嘌呤序列为探针检测 *nptII* 表达盒完整性时，产生预期大小的条带。从这些数据得出结论：MON 863 基因组含有单个完整的 *nptII* 表达盒，而不含任何额外的可检测的 *nptII* 表达盒元件。



**图 10. MON 863 中 *nptII* 编码区完整性的 Southern 杂交分析——35S 探针**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind*III 进行消化, 以放射性标记的 35S 启动子为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5pgPV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19pgPV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

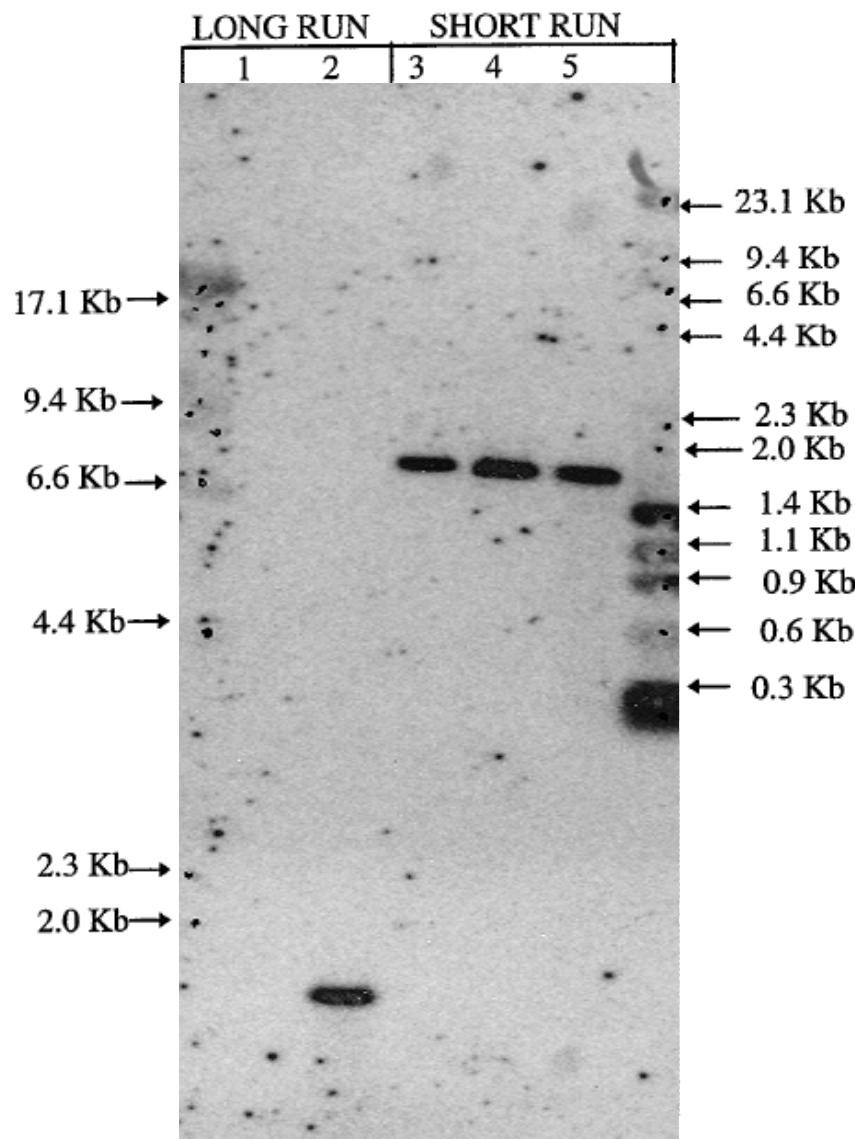
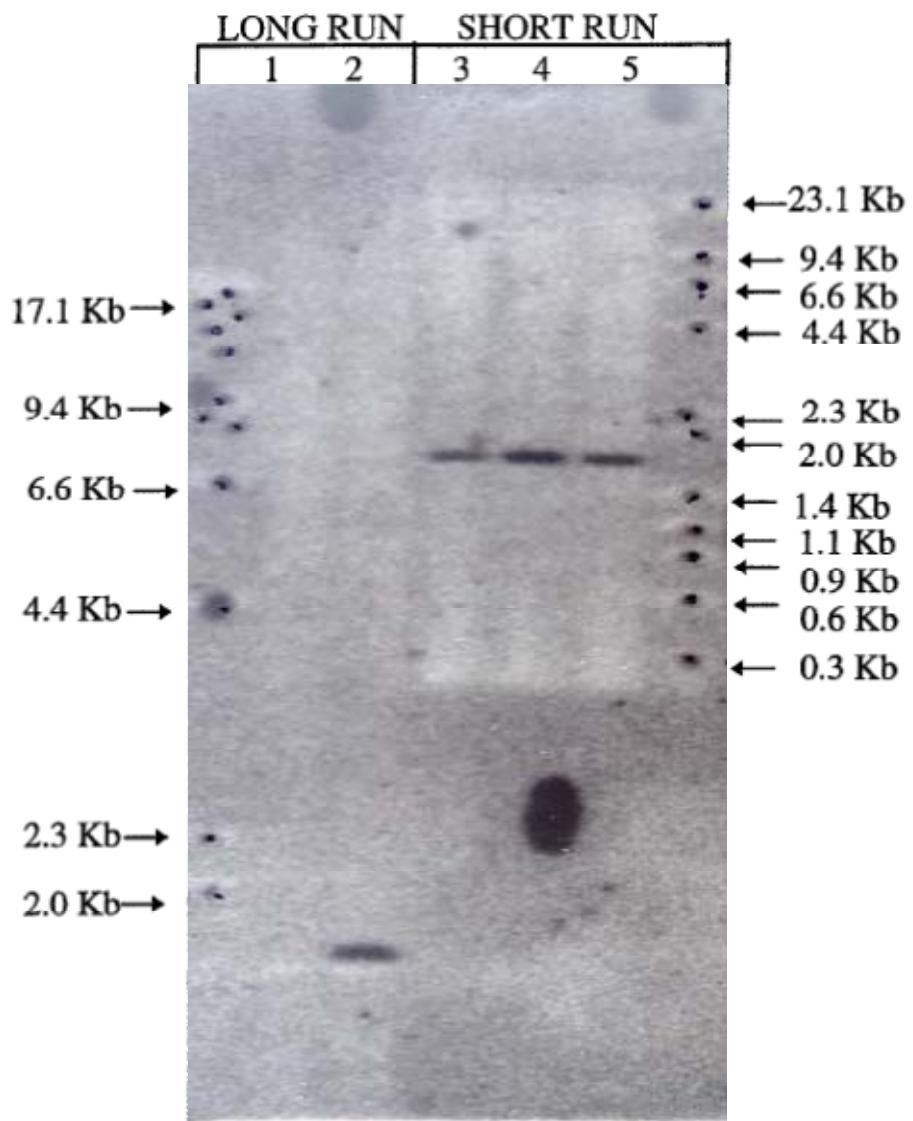


图 11. MON 863 中 *nptII* 编码区完整性的 Southern 杂交分析——*nptII* 探针

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind*III 进行消化, 以放射性标记的 *nptII* 编码区为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5pgPV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19pgPV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)



**图 12. MON 863 中 *nptII* 表达盒完整性的 Southern 杂交分析  
——NOS 3'端多聚腺嘌呤序列探针**

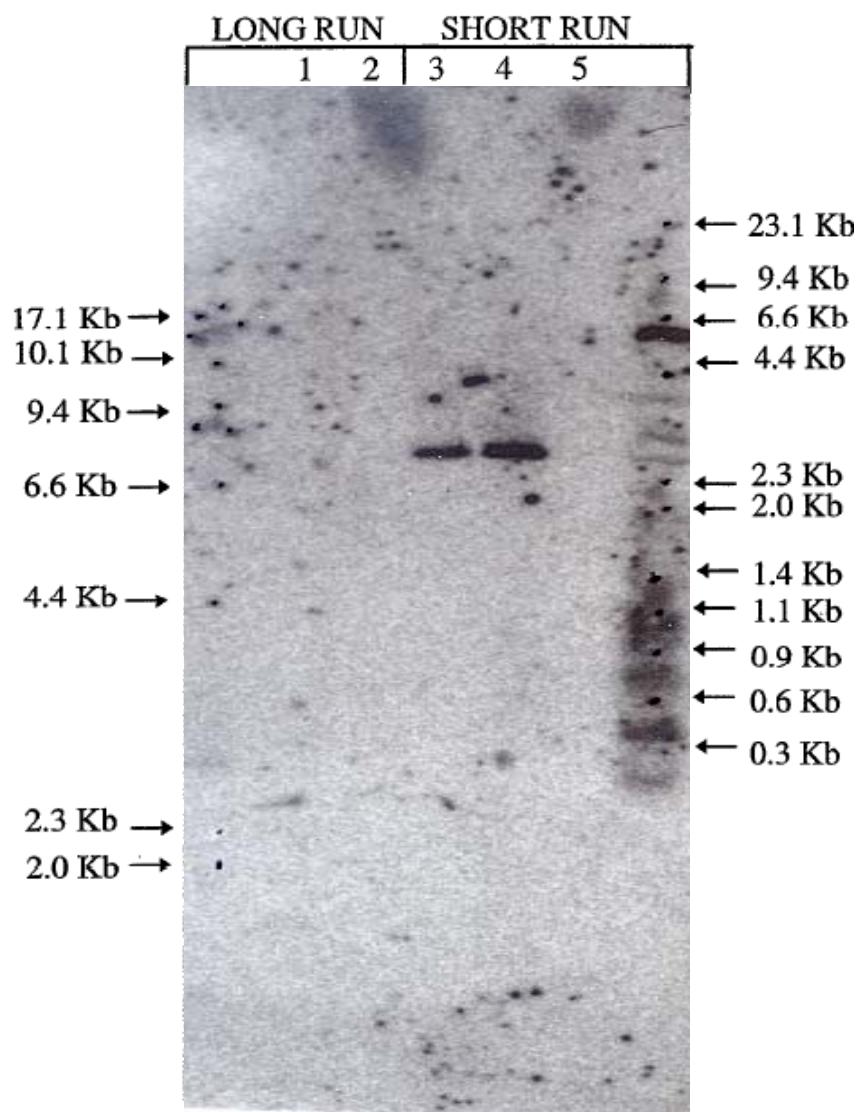
10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind*III 进行消化, 以放射性标记的 NOS 3' 端多聚腺嘌呤序列为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 *nptII* 表达盒 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头示分子量大小 (kb)

## 骨架序列分析

试验和对照 DNA 用 *Hind*III 消化。将消化的对照 DNA 和含有完整骨架序列的 2.6Kb 的 *Hind*III 消化 PV-ZMIR13 质粒片段混合。以除了 *nptII* 编码区以外的整个质粒骨架序列为探针进行 Southern 印迹检测（图 13）。阴性对照 MON 846 基因组 DNA（泳道 1）中未发现可检测的杂交条带，与预期结果一致。在大约 2.4 Kb 位置处有一片非特异性的微弱杂交信号区域扩散到泳道 1 的部分空间中，该现象不影响对此印迹结果的解释。质粒 PV-ZMIR13 骨架 DNA 混合 MON 846 对照组 DNA（泳道 3 和 4）在大约 2.6 Kb 位置产生与整个预期大小的条带。MON 863 DNA（泳道 2 和 5）未检测到杂交条带。此结果结合对 *nptII* 编码区的 Southern 印迹分析，确证 MON 863 不含任何可检测的质粒骨架序列（包括 *ori*-pUC 以及受细菌启动子调控的 *nptII* 编码区）。



**图 13. MON 863 中是否存在骨架序列的 Southern 杂交分析**

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind* III 进行消化, 以放射性标记的除了 *nptII* 编码区外的完整骨架序列为探针, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5pgPV-ZMIR13 骨架区域 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19pgPV-ZMIR13 骨架区域 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

## 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

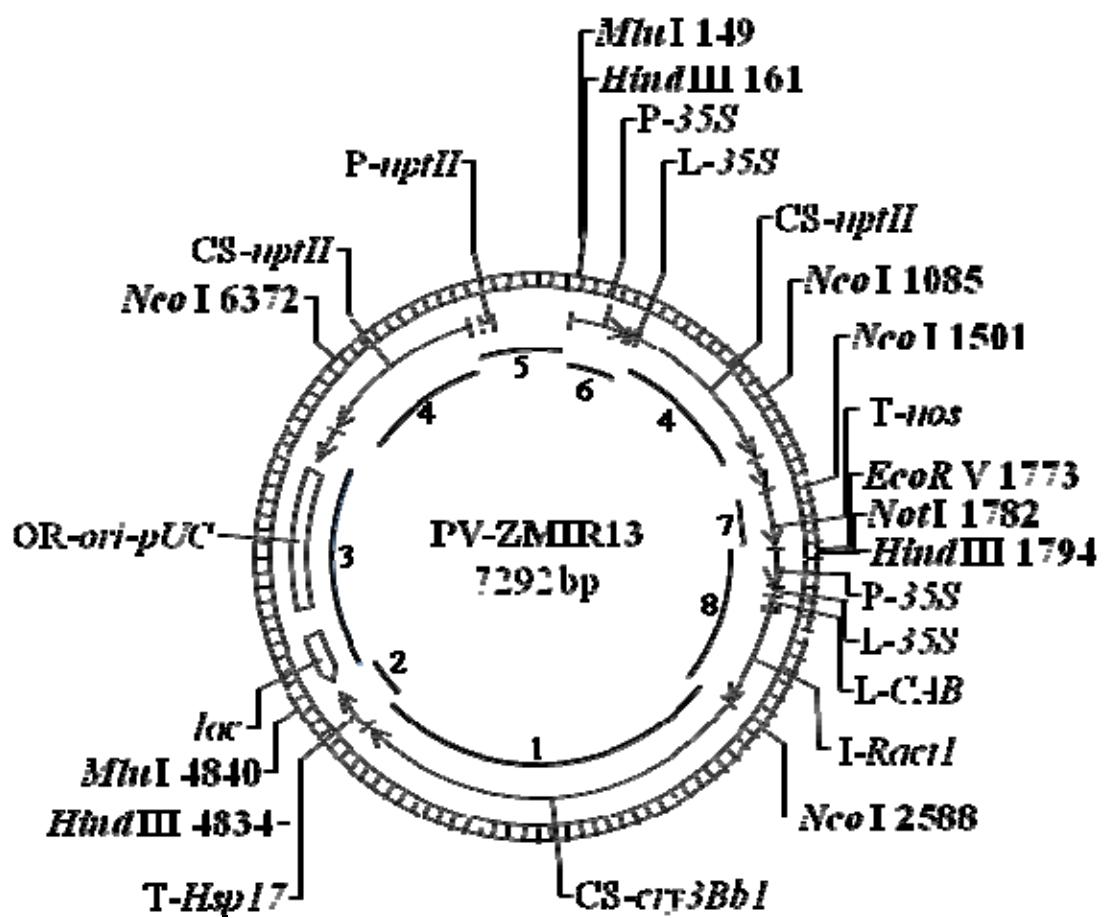
源自于质粒PV-ZMIR13的线性化片段PV-ZMIR13L被用于MON 863玉米的转化。使用*Mlu* I消化PV-ZMIR13质粒，释放出~4700 bp的线性化片段 (*Mlu* I 149~*Mlu* I 4840)，该线性化片段含有一个完整的*cry3Bb1*基因表达盒。用于转化的DNA片段含有两个基因表达盒：1) 受P-4-AS1植物启动子调控的*cry3Bb1*编码序列，小麦叶绿素a/b结合蛋白 (wtCAB) 的mRNA前导序列，水稻肌动蛋白编码基因内含子 (*ract1*)，以及小麦热休克蛋白17.3 (*tahsp17*) 3' 端多聚腺嘌呤序列；2) 受花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子调控的*nptII*编码序列用作选择标记，以及胭脂碱合酶 (NOS) 3'端多聚腺嘌呤序列。

表 2. 质粒线性化片段 PV-ZMIR13L 中主要遗传元件概述

遗传元件	大小 (bp)	在插入中 的定位	功能 (参考文献)
<b><i>cry3Bb1</i> 基因表达盒</b>			
<b>P-4-AS1</b>	222	1638-1859	含有 4 个串联的 AS1 启动子及一个花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子 (Lam and Chua, 1990; Odell <i>et al.</i> , 1985)
<b>L-wtCAB</b>	65	1864-1928	小麦叶绿素 a/b-结合蛋白 5'端非翻译区的前导序列 (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
<b>I-ract1</b>	488	1942-2429	水稻肌动蛋白 <i>actin 1</i> 基因 5'端区域，含有启动子，转录起始点及第一内含子 (McElroy <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>cry3Bb1</i></b>	1962	2435-4396	源自苏云菌芽孢杆菌编码 Cry3Bb1 蛋白质的序列 (English <i>et al.</i> , 2000)
<b>T-tahsp 17 3'</b>	234	4411-4644	源自小麦热休克蛋白 17.3 编码基因的 3'非翻译区 (McElwain and Spiker, 1989)，用于终止转录并指导 Cry3Bb1 mRNA 的多聚腺苷酸化
<b>选择标记基因 <i>nptII</i></b>			
<b>P-35S</b>	318	19-336	源自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子 (Odell <i>et al.</i> , 1985)
<b><i>nptII</i></b>	968	370-1337	源自大肠杆菌 Tn5 转座子的新霉素磷酸转移酶 II 的编码序列 (Beck <i>et al.</i> , 1982)
<b>T-NOS 3'</b>	256	1357-1612	来源于根癌菌 3'端胭脂氨酸合成酶非转录区，用于终止转录并引导 mRNA 多聚腺苷酸化(Fraley, <i>et al.</i> , 1983)

<sup>1</sup> 所述遗传元件不包括表中的间插序列和基因组侧翼序列；

<sup>2</sup> P – 启动子； T – 3'非翻译转录终止区和多聚腺苷酸信号序列



探针号	DNA 探针	起始位置	终止位置	全长 (~kb)
1	CS- <i>cry3Bb1</i>	2600	4560	~2.0
2	T- <i>Hsp17</i>	4567	4800	~0.2
3	Backbone B	4846	5969	~1.1
4	CS- <i>nptII</i>	6176	6931	~0.8
5	Backbone A	6949	148	~0.5
6	P-35S Promoter	167	479	~0.3
7	CS- <i>nptII</i>	531	1286	~0.8
8	T- <i>nos</i>	1512	1767	~0.3
	P-35S/AS1 - L-Cab - I-ract1	1782	2588	~0.8

图 14. PV-ZMIR13 环形质粒图谱 (示 Southern 探针)

使用 *Mlu* 限制性内切酶消化环形质粒后，释放出其中 *Mlu* I 149~*Mlu* I 4840 部分线性片段 (~4.7 kb) 用于通过基因枪法转化得到 MON 863。起始和终止位点相对于质粒编号。

## 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

用于转化的 DNA 片段含有两个基因表达盒：1) 受 4-AS1 植物启动子调控的 *cry3Bb1* 编码序列，小麦叶绿素 a/b 结合蛋白 (wtCAB) 的 mRNA 前导序列，水稻肌动蛋白编码基因内含子 (*ract1*)，以及小麦热休克蛋白 17.3 (*tahsp17*) 3' 端多聚腺嘌呤序列；2) 受花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子调控的 *nptII* 编码序列用作选择标记，以及胭脂碱合酶 (NOS) 3'端多聚腺嘌呤序列。两个表达盒相互独立，各自带有完整的启动子和终止子，详见表 2 和图 14。

P-4-AS1 启动子: 含有 4 个串联的 AS1 启动子和来源于花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子 (Lam and Chua, 1990; Odell et al., 1985)，长 222 bp，用于在植物体内启动目的基因 *cry3Bb1* 的 mRNA 转录。

T-tahsp 17 3'终止子: 源自小麦热休克蛋白 17.3 编码基因的 3'非翻译区 (McElwain and Spiker, 1989)，长 234 bp，用于终止转录并指导 Cry3Bb1 mRNA 的多聚腺苷酸化。

P-35S 启动子: 源自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子 (Odell et al., 1985)，长 318 bp，用于启动选择标记基因 *nptII* 的 mRNA 转录。

T-NOS 3'终止子: 来源于根癌菌 3'端胭脂氨酸合成酶非转录区，长 256 bp，用于终止转录并引导 *nptII* mRNA 的多聚腺苷酸化 (Fraley, et al., 1983)。

### 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

MON 863 使用 *nptII* 编码序列用作选择标记。*nptII* 基因分离自大肠杆菌的非毒性菌株 K12，功能编码区全长 795 bp，可编码合成 264 个氨基酸的新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 蛋白。转化质粒中 PV-ZMIR13 带有的 *nptII* 区域长为 968 bp，其中还包括一段从大肠杆菌分离时带来的 153 bp 博来霉素 (*ble*) 的部分基因，该基因片段不完整，在植物体内无法表达。

大肠杆菌 K12 菌株广泛存在于我们的生存环境中，包括人类消化道中，一般认为没有必要对该细菌来源的 NPTII 蛋白进行额外的分析或者毒理学试验。该表达载体不认为具有致病性，也不可能演变为具有致病性的载体，对人类和动物安全。

### 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)

I-ract1 内含子: 水稻肌动蛋白基因 *actin1* 的 5'端区域，长 488 bp，含有启动子、转录起始点及第一内含子 (McElroy et al., 1990)，可能参与目的基因的转录调控，不含有任何致病元素。

L-wtCAB 前导区: 源自于小小麦叶绿素 a/b-结合蛋白 5'端非翻译区的前导序列 (Lamppa et al., 1985)，长 65 bp，用于指导 *cry3Bb1* 转录和成熟 Cry3Bb1 在叶绿体上的定位。

## 2.5 转基因方法

用于MON 863转化的质粒为PV-ZMIR13，但是在转化过程中只有部分质粒序列插入到玉米基因组序列中，即*Mlu* I消化产生的约4.7 kb的酶切片段(PV-ZMIR13L)插入到玉米基因组DNA中。如下图所示：

借助于基因枪介导的转化方法，将包裹有目的基因的线性DNA片段的重金属粒子经加速后直接轰击受体玉米愈伤组织。在抗生素选择培养基中诱导愈伤组织再生，得到含有外源DNA片段的植株。随后经过一系列分子特征和目标性状筛选，最后得到能够有效抗虫并稳定遗传的MON 863转化株系。

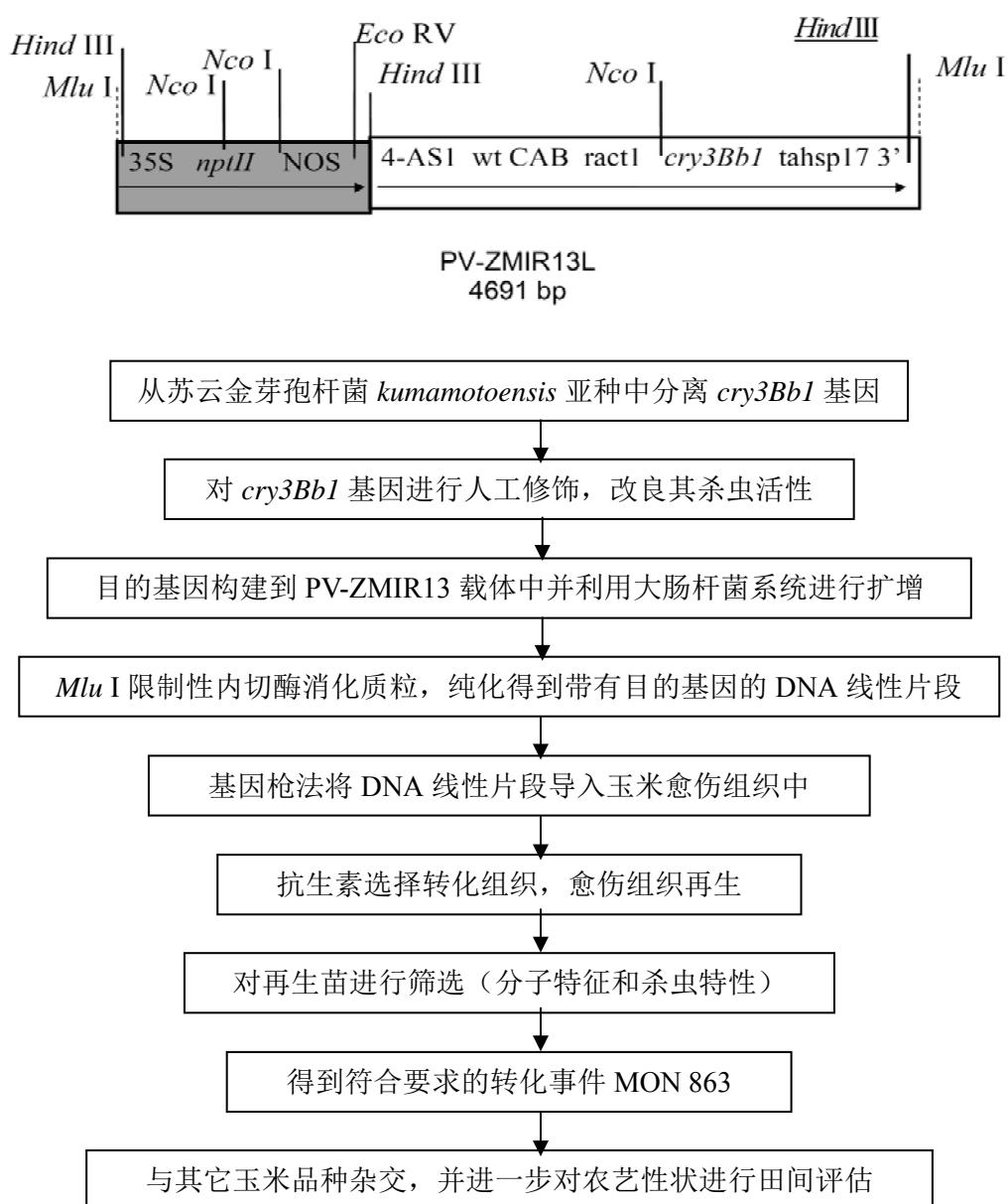


图 15. PV-ZMIR13L 示意图和抗虫玉米 MON 863 的研发流程图

## 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，例如根、茎、叶、花、果实、种子

用 ELISA 方法检测 MON 863 中目的蛋白在不同组织中的表达情况，结果表明 MON 863 玉米中导入的目的杀虫蛋白 Cry3Bb1 在根、秸秆、叶片、花和籽粒中均有效表达。蛋白测定数据见 2.6.2 部分表 3 和表 4。

### 2.6.2 插入序列表达量及其分析方法

用 ELISA 方法检测 MON 863 中目的蛋白在不同组织中的表达情况。用于表达分析的材料收集于 1999 年 4 个美国试验点，此外又在 2000 年阿根廷的 3 个试验点收集花粉材料用于分析。分析的组织包括：嫩叶（V4 生长期）、秸秆、成熟的根、花丝、籽粒和花粉。对所有组织均进行 Cry3Bb1 蛋白的检测，但仅在嫩叶、秸秆和籽粒中检测 NPTII 蛋白的水平，如表 3 所示。MON 863 中 Cry3Bb1 蛋白的平均水平如下：在嫩叶中为 81 μg/g，在籽粒中为 70 μg/g，在根中为 41 μg/g，在秸秆组织中为 39 μg/g。Cry3Bb1 在花粉和花丝中的水平分别为 62 和 10 μg/g。在检测的所有组织中，NPTII 蛋白水平的范围为不可检测 (<0.076 μg/g) ~1.4 μg/g。

表 3. 多个试点 MON 863 组织样品中 Cry3Bb1 和 NPTII 蛋白表达情况

组织 (种植后天数) <sup>‡</sup>	参数*	Cry3Bb1 (μg/g fw)	NPTII (μg/g fw)
嫩叶 (21 天)	平均数±标准差 范围 n	81 ± 11 65 – 93 4	0.98 ± 0.27 0.74 – 1.4 4
秸秆 (90 天)	平均数±标准差 范围 n	39 ± 10 24 – 45 4	0.19 ± 0.03 0.17 – 0.23 4
成熟的根 (90 天)	平均数±标准差 范围 n	41 ± 13 25 – 56 4	未分析
籽粒 (125 天)	平均数±标准差 范围 n	70 ± 17 49 – 86 4	<0.076 <sup>†</sup> 4
花丝 (58 天)	平均数±标准差 n	10 1	未分析
花粉 (60 天)	平均数±标准差 范围 n	62 ± 18 30 – 93 13	未分析

\* SD = 平均数标准差；n=分析中的重复数

† 玉米谷粒的检测限制=0.076 μg/g fw

‡ 依照 APHIS 通告 #99-106-16n 规定收集

此外，还在 1999 年美国田间试验点中全生长季的不同时期收集叶片、根和全植株样品，分析 Cry3Bb1 蛋白的含量，分析结果见表 4。对照组植物组织中的 Cry3Bb1 水平在检测限以下，所以没有报告。由表 4 可见，MON 863 的叶片组织、全植株和根组织中 Cry3Bb1 蛋白的平均水平随着生长季而下降。根组织 Cry3Bb1 蛋白的平均水平变化范围是：从最高的植物幼苗的 58 μg/g 到最低的衰老植物的 24 μg/g。不过，在植物发育关键性的早期阶段，根组织中 Cry3Bb1 蛋白水平已足够保护植株免受根虫的取食危害。

**表 4. 1999 年美国田间试验 MON 863 各组织样品中 Cry3Bb1 蛋白表达情况**

种植后天数 <sup>‡</sup>	参数 <sup>*</sup>	叶片组织中 Cry3Bb1 (μg/g fw)	全植株中 Cry3Bb1 (μg/g fw)	根部组织中 Cry3Bb1 (μg/g fw)
21 天	平均数±标准差	81 ± 14		
	范围	65 – 93	NC <sup>†</sup>	NC
	n	3		
35 天	平均数±标准差	79 ± 6.4	46 ± 7.8	58 ± 10
	范围	72 – 84	38 – 54	46 – 66
	n	3	3	3
49 天	平均数±标准差	43 ± 18	31 ± 3.3	57 ± 3.8
	范围	30 – 56	28 – 33	54 – 59
	n	2	2	2
90 天	平均数±标准差		37 ± 12	37 ± 11
	范围	NC	24 – 45	25 – 47
	n		3	3
126 天	平均数±标准差		25 ± 11	24 ± 18
	范围	NC	13 – 35	3.2 – 36
	n		3	3

\* SD = 平均数标准差；n=分析的重复的数目

† NC=未收集

‡ 依照 APHIS 通告 #99-106-16n 收集

### **2.6.3 插入序列表达的稳定性**

从 2.6.2 部分中 21 天叶片组织和 90 天成熟根组织中 Cry3Bb1 蛋白表达数据看来, 1999 年美国田间试验和 2000 年阿根廷田间试验中这两种组织的 Cry3Bb1 蛋白表达水平均分别相当, 证实插入序列在多年多点环境中均能够稳定表达。此外, 自 1996 年大规模种植至今, MON 863 均能够有效地抵抗玉米根虫的危害, 也支持 MON 863 中外源插入序列能够有效稳定地表达。

### **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, 基因操作使受体生物表现型发生改变但不影响人类健康或环境条件, 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划分标准, 用于产生 MON 863 的基因操作方法应当归于类型 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

MON 863 的育种谱系如图 16 所示。

选取 5 个世代植株进行孟德尔遗传数据的卡方检验，以确定在玉米 MON 863 子代中 *cry3Bb1* 基因的存在情况和稳定表达，用 ELISA 分析判断子代性状。其中 A1F1 子代来自于原始的转化的植物和近交系 A1 之间的杂交。A1F2 子代来自于个体 A1F1 自交。A1BC1F1 子代来自于 A1F1 植物和非转基因近交系 A1 之间的回交。A1BC2F1 子代来自于 A1BC1F1 世代和非转基因近交系 A1 之间的回交。A1BC2F2 子代来自于 A1BC2F1 自交。表 5 中给出了 CRW 保护的表型阳性的玉米 MON 863 子代的预期的和观察到的分离频率。由表中数据可见，MON 863 后代中抗虫性状的分离符合经典的孟德尔遗传规律。

此外，还选取了育种谱系中的 8 个世代(A1F1、A1BC1F1、A1BC2F2、A634F2a、A634F3、A1F2、A1BC2F1 及 LH82×A634F3) 进行 Southern 杂交分析，进一步确定插入序列在 MON 863 各个世代中的遗传稳定性。将对照 DNA、对照与 PV-ZMIR13 混合物以及 8 个世代玉米基因组 DNA 用 *Nco* I 消化，以 *nptII* 全长编码区为探针进行杂交(图 17)。对照组 DNA、A634 和 LH82×MON863-/A634F3(泳道 3 和 4) 无杂交信号。PV-ZMIR13 质粒 DNA 与 A1 非转基因对照 DNA 混合组(泳道 2)在 0.4、2.0 和 3.8 kb 处显示出预期大小的条带，膜上可见一些模糊条带，可能是由于消化不完全造成的。所有受试的 8 个世代 A1F1(泳道 5)，A1BC1F1(泳道 6)，A1F2(泳道 7)，A1BC2F1(泳道 8)，A1BC2F2(泳道 9)，A634F3(泳道 10)，A634F2a(泳道 11) 及 LH82×A634F3(泳道 12) 均产生了预期的 0.4 kb 条带和 8.0 kb 的插入区 5' 端片段。A634F3 世代(泳道 10) 在~1.6 kb 处有模糊条带，可能是由于 PV-ZMIR13 质粒 1501 bp 处 *Nco* I 识别位点的不完全消化造成。少数世代的杂交印迹中有一些看起来像是条带的模糊区域，由于这些条带没有存在于所有 MON 863 世代中，很有可能是非特异性杂交或是各世代间 DNA 质量存在差异。除此之外，没有观察到 9 个世代杂交带型的其它差异。上述结果证实了插入 DNA 的稳定性。

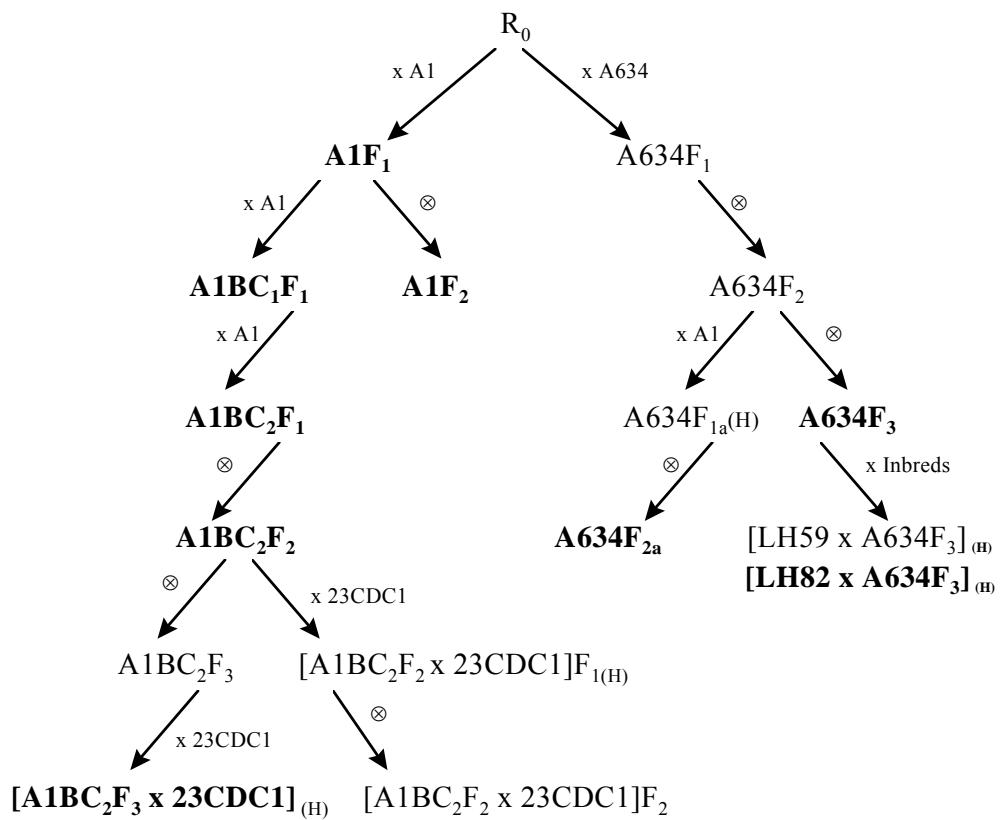
表 5. 玉米 MON 863 子代中预期和观察到的性状分离频率卡方分析

世代	观察值		预期值		$\chi^2$
	+	-	+	-	
A1F1	41	36	38.5	38.5	0.21†
A1F2	89	23	84	28	0.96†
A1BC1F1	18	15	16.5	16.5	0.12†
A1BC2F1	931	1040	985.5	985.5	5.92*
A1BC2F2	322	110	324	108	0.03†

† — p=0.05 置信水平上不具有显著性 (卡方=3.84, 1df)

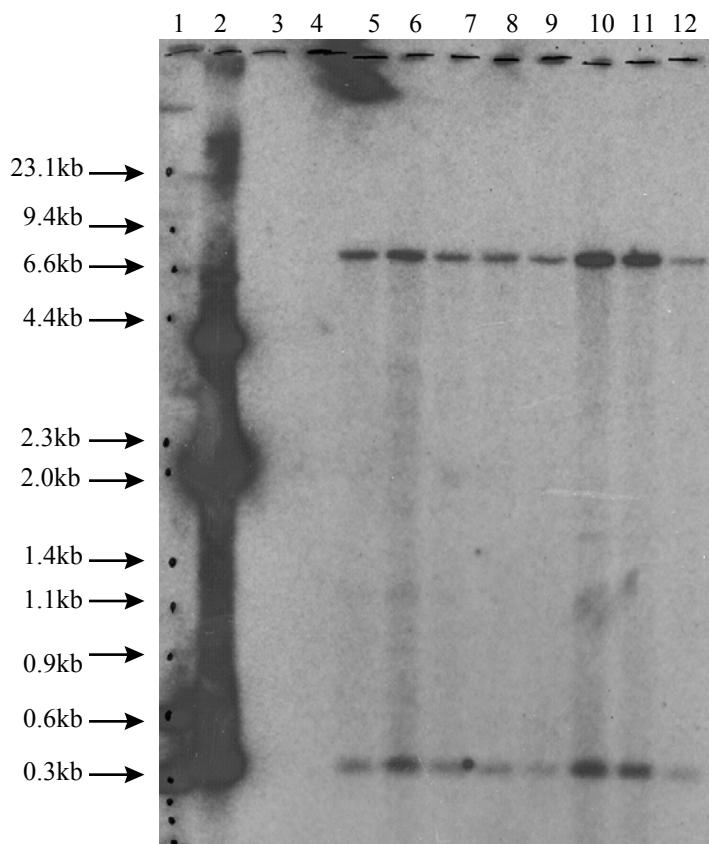
\* — p=0.05 置信水平上具有显著性 (卡方=3.84, 1df)，但 p=0.01 置信水平上不具有显著性 (卡方=6.63)

## MON 863 Breeding History



R<sub>0</sub> - originally transformed plant; ⊗ - self-pollinated; (H) - hybrid

图 16. MON 863 育种谱系图



**图 17. MON 863 中插入稳定性的 Southern 杂交分析**

10 $\mu$ g 提取自籽粒或叶片的DNA用Nco I进行消化,以放射性标记的全长nptII编码区为探针进行杂交,泳道描述如下:

- 1、DNA 分子量标准
- 2、A1 非转基因对照与约 22.8pg PV-ZMIR13 质粒的混合物
- 3、A634 非转基因对照
- 4、LH82xMON863-/A634F3 非转基因对照
- 5、A1F1
- 6、A1BC1F1
- 7、A1F2
- 8、A1BC2F1
- 9、A1BC2F2
- 10、A634F3
- 11、A634F2a
- 12、LH82xA634F3

→箭头标示分子量大小 (kb)

## 3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异

### 3.2.1 生殖方式和生殖率

MON 810 与常规玉米在生殖方式和生殖率上没有差异。孟山都公司 2000~2001 年在北美进行了为期两年的田间试验，调查结果显示，抗虫玉米品系 MON 863 的生殖率和方式与其对照玉米品种没有显著差异：花期同步，也没有发现种子或植物成熟期的不同。2002 年和 2003 年在吉林省和山东省进行的环境安全检测结果也证实，MON 863 及其亲本对照玉米在长势、株型、生育期等方面均无差异。

### 3.2.2 传播方式和传播能力

玉米的传播通过种子实现，转入的特性可能通过花粉传播。玉米是典型的风媒授粉植物，花粉的有效传播受花期株高、花粉量、花粉活力、降水、温度、湿度和传粉昆虫等多种因素的影响。由于花粉直径较大（~0.1 mm），大颗粒的迅速沉降特性影响了玉米花粉的传播。同时，由于玉米雌雄异花，所以昆虫传粉对玉米的可能性很小，也就限制了玉米花粉随昆虫远距离传播的可能。除了抗虫性状以外，没有 MON863 抗虫玉米和非转基因玉米之间存在农艺性状方面的差异。MON 863 并没有因为抗虫基因的导入而改变花粉形态、花粉产量或是花粉活力，因此，其花粉传播能力与非转基因玉米一样。

### 3.2.3 休眠期

玉米没有休眠要求，而且在达到成熟时，可以在任何时候萌发。孟山都公司 2000~2001 年在北美进行了为期两年的田间试验，在含有 MON863 转化事件的玉米中没有观察到休眠或萌发的不同。2002~2003 年在吉林省和山东省进行的环境安全检测结果也证实 MON 863 玉米种子的发芽率与常规对照相比无明显差异。

### 3.2.4 适应性

除了抗虫性状以外，没有 MON863 抗虫玉米和非转基因玉米之间存在农艺性状方面的差异。根据 1997 年以来在美国超过 30 个种植点的数据，抗虫玉米 MON863 在种苗萌发、表型特征（穗长、株高、根倒伏百分率、茎倒伏百分率、下垂穗百分率、持绿）、生长（种苗生活力、株高）、雄穗、花粉和丝生长长度单位及产量上，与常规玉米植株没有显著性差别。

2000~2001 年北美田间试验，调查结果表明，在 V4、VT 和 R3 生育期评价的虫害或病源菌的敏感性方面 MON 863 和对照品系没有差异。与对照品系相比 MON 863 在虫害或病害的敏感性或耐性方面没有改变。

2003 年中国农科院植物保护研究所和山东农业科学院分别对 MON863 进行的环境试验结果也显示，与其对照相比，转基因玉米 MON 863 对玉米主要病害如玉米大斑病、玉米灰斑病以及小斑病等的病害发生没有显著差异。

### 3.2.5 生存竞争能力

应农业部要求，中国农业科学院植物保护研究所和山东省农业科学院植物保

护研究所分别对 MON 863 转基因玉米进行了生存竞争能力部分的环境安全检测。

中国农业科学院植物保护研究所于 2003 年 6 月-10 月在位于河北省廊坊市广阳区的试验基地开展了 MON 863 转基因玉米的生存竞争能力检测。荒地条件下的调查结果表明，无论是撒播还是 5 cm 深播，MON 863 与其非转基因对照田的杂草种类和没有显著差异，以马齿苋为优势杂草。栽培地条件下的调查结果表明，MON 863 及其亲本对照玉米在株型、生育期等方面无差异，非转基因对照的株高稍高于 MON 863 (284.77 vs. 267.03 cm)，但在平均穗重、每穗粒行数和穗粒数上两者差异均不显著。

山东省农业科学院植物保护研究所于 2003 年 6 月-12 月在济南黄河大坝、植保所温室开展了 MON 863 转基因玉米的生存竞争能力检测。荒地条件下的调查结果表明，大坝优势杂草总体上看来数量较少，但覆盖度较高，深播、撒揪及对照区杂草种类基本相同。栽培地条件下的调查结果表明，MON 863 及其亲本对照玉米在长势、株型、生育期等方面均无差异，株高稍低于当地对照品种。

### 3.2.6 转基因植物的遗传物质向其它植物、动物和微生物发生转移的可能性

在自然生态条件下，有些栽培植物会和周围生长的近缘野生种发生天然杂交，从而将栽培植物中的基因转入近缘野生种中。玉米是典型的风媒授粉植物，但由于花粉直径较大 (~0.1 mm)，这种大颗粒的迅速沉降特性影响了玉米花粉的传播。而由于玉米雌雄异花，所以昆虫传粉对玉米的可能性很小，也就限制了玉米花粉随昆虫远距离传播的可能。

为检测转基因玉米花粉可能向栽培种的飘移而造成基因流散的风险，山东省农业科学院植物保护研究所和吉林省农业科学院分别于 2002 年和 2003 年利用 3 个转基因玉米品种进行了基因流散风险评估。多年多点的检测结果表明，在距转基因玉米田 5 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经大大降低，约为 0.24%~13.19%；到 60 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经低至 0.08%~1%。除了风力和风速外，玉米异交率还受花期株高、花粉量、花粉活力、降水、温度、湿度和传粉昆虫等多种因素的影响。

目前已知只有少数植物种类能与玉米杂交，且均属美洲大陆特种类，如分布在墨西哥和危地马拉某些地区的墨西哥类蜀黍 (*Zea mays* ssp. *mexicana* Schrad.) 和大刍草。据文献报道，在中国目前还没有发现能与玉米异交的近缘种，所以转基因玉米通过花粉向近缘种扩散的可能性小。同时，严格按照通用普通玉米制种田常规隔离距离 300 m 进行管理，转基因玉米基因流散的风险完全能够减少到可忽略不计。

### 3.2.7 转变成杂草的可能性

在美国的主要杂草参考资料里，玉米并不作为杂草列出 (Crockett, 1977; Holm *et al.*, 1979; Muenscher, 1980)，也不列在联邦政府出版的有害杂草物种名单里 (7

CFR Part 360)。同样，在中国出版的各类杂草名录中也不包括玉米。此外，玉米一直在全世界种植，并没有任何玉米是有害杂草的报道。

除了抗虫性状以外，没有 MON863 抗虫玉米和非转基因玉米之间存在农艺性状方面的差异。2000~2001 年北美田间试验以及 2003 年在河北省和山东省进行的生存竞争能力测试结果均显示，抗虫玉米 MON863 与其对照之间在农艺性状方法没有显著差异，表明抗虫基因的导入并没有增强受体原有的生存竞争能力，不会增加其杂草化趋势。

### 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

2000~2001 年在北美进行的为期两年的田间试验涵盖了 16 目 36 科昆虫在内的 156,572 种生物。其中对 30 多科昆虫的调查表明，与其对照相比，表达 Cry3Bb1 蛋白的 MON 863 玉米对包括有益昆虫、寄生蜂和分解生物（食腐质生物）在内的非靶标生物的相对丰度没有不利影响。并且，MON 863 的叶甲类害虫群体更少。MON 863 表达的玉米虫抗性蛋白 Cry3Bb1 对非靶标（非叶甲类）昆虫（包括有益捕虫、寄生类昆虫和分解类或食腐质类昆虫）没有任何显著影响。

2003 年中国农科院植物保护研究所和山东农业科学院分别对 MON863 进行了环境试验，检测结果表明，转基因抗虫玉米 MON 863 对亚洲玉米螟、棉铃虫和桃蛀螟等鳞翅目非靶标害虫没有控制作用，幼虫存活数量和对玉米造成的危害与非转基因玉米相当。转基因玉米 MON 863 的蚜虫发生量明显比其非转基因对照低，但对叶蝉种群数量的影响没有明显差异。2003 年利用吸虫器进行田间节肢动物抽样调查的结果表明，转基因玉米 MON 863 对玉米田昆虫的种类及群落的优势度影响无显著差异。

### 3.2.9 对生态环境的其它有益或有害作用

传统玉米虫控制方法（例如杀虫剂拌种、杀虫剂处理土壤或叶面喷施以控制成虫）不但对玉米害虫（例如玉米切根叶甲、玉米跳甲和玉米叶蚜）具有一致的显著主效应，而且还对几种非靶标有益捕虫（例如瓢虫）、小花蝽、寄生蜂和食腐质生物（Diplura: Japygidae）有影响。与传统的化学控制方法不同，MON 863 之类的抗虫作物由于对靶标作物的特异性，给生态环境中其它生物带来的风险程度最低。与传统杀虫剂控制计划（特别是土壤和叶面施用）相比，MON 863 对某些益虫的影响较小。因此，利用 MON 863 控制玉米虫可以减少杀虫剂的使用，从而提高玉米病虫害综合治理得益。

## 3.3 转基因植物与受体或亲本植物在对人类健康影响方面的差异

自从 1958 年开始，B.t.蛋白已经在美国用于商业用途，以产生具有杀虫活性的微生物来源的产品（EPA, 1988）。在大量的安全性研究中已经证明，基于 B.t.蛋白的杀虫剂对哺乳动物的毒性极低（McClintock et al, 1995）。这些研究的结果与用其它 Cry3 蛋白所作的研究结果一并归档，以支持此蛋白的使用，证明这一类蛋白对哺乳动物没有毒性。

此外，由于*nptII*基因已广泛用于西红柿、棉花和油菜等转基因植物的生产中，美国FDA已对NPTII蛋白进行了全面的安全性评价。NPT蛋白在胃酸中可被迅速灭活，并被消化酶降解，在转基因植物中的表达形式未被糖基化，且对热不稳定，因此不具备已知致敏原的特征。小鼠急性经口毒性试验表明，纯化的NPTII蛋白的最大予量不会引起任何毒性反应，其NOEL>5000 mg/kg。因此FDA认为，食用NPTII蛋白不会引起任何毒性和过敏反应。此外，NPTII蛋白在MON 863玉米中的表达量极低，因此，MON 863研发过程中主要对Cry3Bb1蛋白进行毒性和过敏性的安全性分析。

抗虫玉米 MON 863 于 2002 年在美国首先获得 FDA 和 USDA 的商业化批准，随即在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。自商业化应用以来，并没有发现 MON 863 玉米对环境或食用饲用安全产生不良影响的报道，具有长期安全食用历史。

### 3.3.1 毒性

根据Codex及相关安全评价指南，某种蛋白质的潜在毒性应该从如下方面来评价：

- i) 该蛋白与已知毒素或其他对人或动物有不利影响的生物活性蛋白之间是否具有氨基酸序列相似性；
- ii) 该蛋白在哺乳动物胃肠液系统中是否被快速消化；
- iii) 该蛋白对热处理是否稳定；
- iv) 该蛋白对哺乳动物是否具有急性毒性效应；
- v) 人和哺乳动物的预期膳食暴露水平。

已对MON 863中的Cry3Bb1蛋白基于上述标准进行潜在毒性评估，确定其没有显著毒理学风险。

#### 1) 蛋白质的理化特性

玉米 MON 863 中表达产生的 Cry3Bb1 是野生型蛋白的一种变体，与野生型 Cry3Bb1 蛋白序列之间有 7 个氨基酸的差异。MON 863 来源 Cry3Bb1 变体蛋白与重组 B.t. 株 EG11098 中分离的另一种 Cry3Bb1 变体蛋白之间只有 2 个氨基酸的差异。对从 EG11098 株中分离的细菌来源蛋白和 MON 863 植物来源蛋白进行全面的特性鉴定，包括 MALDI-TOF-MS 分析、N-末端测序、免疫反应活性比较、昆虫生物活性分析、凝胶电泳、糖基化状态分析以及氨基酸组成分析等，分析结果确定了两种来源 Cry3Bb1 的等效性。

#### 2) 与已知毒素的结构相似性

用于毒性分析的数据库为已知毒素数据库 TOXIN4 和具有生物活性蛋白数据库 ALLPEPTIDES。从转基因玉米 MON863 的编码区获得 *cry3Bb1* 的 DNA 序列，根据标准的遗传密码子来转录和翻译，以此为查询序列在这两个数据库中进行比对搜索。唯一符合条件的序列编号为 Q06117，与 Cry3Bb1 序列在 651 个氨基酸长度中相似性为 99.1%，序列分析进一步确定该序列即为野生型 Cry3Bb1 蛋白。除了可以预期在细菌 *thuringiensis* 和相关物种中发现的其它已知 Cry 蛋白会具有相似

性外，没有发现结构上具有相似性的其它蛋白。Cry 蛋白家族代表着来自共同祖先基因所编码的蛋白质。这些结果表明转基因玉米 MON863 产生的 Cry3Bb1 蛋白和对于人和动物健康有害的毒素不具有相似性。

### 3) 热稳定性

在玉米的商业加工过程中往往需要经过高温处理，加工过程中的热处理会影响玉米中Cry3Bb1蛋白的活性。在实验室模拟玉米的商业加工过程的研究中，利用免疫印迹反应和ELISA分析方法测定PBST或2×Laemmli缓冲液中Cry3Bb1蛋白的免疫反应活性。证实高温下烘烤30 min后即检测到Cry3Bb1蛋白。此外，还利用一种易受影响的害虫（科罗拉多马铃薯甲虫）对烘烤与未烘烤的IPC样品进行了昆虫试验。这些结果清楚地表明了烘烤后的转基因抗虫玉米MON 863中的Cry3Bb1蛋白杀虫活性的丧失。

### 4) 体外消化性

体外消化试验结果表明，Cry3Bb1蛋白非常容易降解。在模拟的胃液条件下，Cry3Bb1 蛋白可以在15秒内降解至无法检测的水平 (Leach et al., 2001)。在模拟的肠液条件下，观察到Cry3Bb1蛋白可以在1分钟之内从大约74 kDa降解为分子量大约为68和57 kDa的小片段。持续模拟肠液条件下，Cry3Bb1蛋白可形成一条单链稳定片段，分子量约为57 kDa，这是Cry3蛋白的色氨酸核心位点的预期大小 (Hileman et al., 2001b)。

### 5) 急性经口毒性

小鼠急性经品毒性试验结果表明，Cry3Bb1蛋白的“无观察效应水平”(NOEL) 为3200 mg/kg体重，这是试验中能够达到的最高剂量水平。该NOEL值比人类接触 Cry3Bb1 的膳食曝露上限估计值高出5个数量级。

### 6) 90天大鼠喂养试验

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所于 2003 年利用 Spargue-Dwaley 大鼠进行 90 天的全食品喂养试验，旨在进一步评价 MON 863 转基因玉米对哺乳动物的潜在毒性和食用安全性。试验共分为 3 组，每组 40 只大鼠（雌雄各半，体重约 60-80 g），分别喂饲含有 MON 863 转基因玉米、常规对照玉米和普通市售玉米的饲料，饲料中玉米含量为 50%。在 90 天的活体试验期间，分别观察 MON 863 对动物的一般情况、体重、食物利用率、血液学指标、脏器重量（脏体比）和组织病理学等的影响。

结果发现，动物活动、生长均未见异常，被毛浓密有光泽。MON 863组雌雄大鼠体重和食物利用率与亲本玉米组以及市售玉米组比较无显著性差异 ( $p>0.05$ )。血液学检测发现，MON 863玉米组雌性大鼠血小板读数和白细胞分类百分比与市售玉米组比较有显著性差异，但与亲本玉米组无显著性差异。血生化检测发现，MON 863玉米雄性大鼠的胆固醇（45天）显著高于市售玉米组，总蛋白和白蛋白（90天）显著低于市售玉米组，但上述指标均与亲本玉米组无显著性差异；虽然 MON 863玉米组的白蛋白和谷丙转氨酶（45天）显著高于亲本玉米组，但所有测定指标均在检测单位历史检测值参考范围之内，故无生物学单方。而且各试验组

末期脏体比无显著性差异；病理学检查也均未见由MON 863玉米引起的异常改变。因此可以认为MON 863玉米不会对大鼠体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理组织产生不良作用。

### 3.3.2 过敏性

根据国际食品法典委员会就导入蛋白的潜在过敏原性评估制定的指南，可通过比较所导入外源蛋白与已知过敏原的生化特性，评估其潜在过敏原性（Codex Alimentarius 2003）。所述生化特性评估包括如下方面：

- i) 该蛋白来源是否具有致敏性；
- ii) 该蛋白是否仅代表总植物蛋白中非常少的一部分；
- iii) 该蛋白与已知致敏蛋白是否具有相似氨基酸序列；
- iv) 该蛋白在哺乳动物胃肠液系统中是否被快速消化；
- v) 该蛋白对热处理是否稳定。

已基于上述标准安全性评价标准对MON 863中的Cry3Bb1蛋白进行潜在致敏性评估，确定其没有显著过敏原性风险。

#### 1) 蛋白质的理化特性

如前 3.3.1 部分所述，利用一系列方法对从 EG11098 株中分离的细菌来源蛋白和 MON 863 植物来源蛋白进行全面的特性鉴定，确定了两种来源 Cry3Bb1 的等效性。

#### 2) 在总蛋白中所占比例

在 1999 年美国田间试验以及 2000 年阿根廷田间试验中的植物叶片和籽粒组织进行 Cry3Bb1 蛋白表达水平的检测。在测试的 MON 863 组织中，籽粒是与食物致敏性最相关的组织。MON 863 粒子中 Cry3Bb1 蛋白的平均表达水平为 70 μg/g fwt, MON 863 粒子中总蛋白的平均干重比例约为 11.6% (或 116,000 μg/g 粒子干重)。玉米籽粒中含水量很低，约为 10%，则 MON 863 粒子中 Cry3Bb1 蛋白的百分比为：(70 μg/g ÷ 116,000 μg/g) × (1/0.9) × 100% ≈ 0.07% 或 700 ppm。

因此可见，Cry3Bb1 蛋白只占 MON 863 收获籽粒总蛋白中极少部分。因此，由于摄入 MON 863 而产生对 Cry3Bb1 蛋白的膳食曝露量可忽略不计。

#### 3) 与已知致敏蛋白的结构相似性

根据 CODEX 指南 (Codex, 2003)，如果某种蛋白与已知致敏蛋白在任何 80 个以上氨基酸片段内的相同氨基酸比例达到 35% 以上，则表明二者具有结构相似性，该蛋白可能具有潜在致敏性。CODEX 指南还推荐采用连续滑行窗口检索程序判断某种蛋白是否具有潜在致敏性：如果 1 个氨基酸序列与 1 潜在的致敏源的抗体决定部位有至少 8 个连续相邻氨基酸是相同的，那么该氨基酸可以被认为具有潜在的致敏性 (Metcalfe et al., 1996; Hileman et al., 2002)。

用于过敏性分析的数据库为 ALLERGEN3 序列数据库。从转基因玉米 MON863 的编码区获得 cry3Bb1 的 DNA 序列，根据标准的遗传密码子来转录和翻

译，以此为查询序列在该数据库中进行 FASTA 比对和八氨基酸滑行窗口搜索。未检索到符合 E 值要求的结果，证明转基因玉米 MON863 产生的 Cry3Bb1 蛋白与已知的过敏原相比没有结构上或者免疫学上的相关序列的一致性。

#### 4) 热稳定性

在玉米的商业加工过程中往往需要经过高温处理，加工过程中的热处理会影响玉米中Cry3Bb1蛋白的活性。在实验室模拟玉米的商业加工过程的研究中，利用免疫印迹反应和ELISA分析方法测定PBST或2×Laemmli缓冲液中Cry3Bb1蛋白的免疫反应活性。证实高温下烘烤30 min后即检测到Cry3Bb1蛋白。此外，还利用一种易受影响的害虫（科罗拉多马铃薯甲虫）对烘烤与未烘烤的IPC样品进行了昆虫试验。这些结果清楚地表明了烘烤后的转基因抗虫玉米MON 863中的Cry3Bb1蛋白杀虫活性的丧失。

#### 5) 体外消化性

体外消化试验结果表明，Cry3Bb1蛋白非常容易降解。在模拟的胃液条件下，Cry3Bb1 蛋白可以在15秒内降解至无法检测的水平 (Leach et al., 2001)。在模拟的肠液条件下，观察到Cry3Bb1蛋白可以在1分钟之内从大约74 kDa降解为分子量大约为68和57 kDa的小片段。持续模拟肠液条件下，Cry3Bb1蛋白可形成一条单链稳定片段，分子量约为57 kDa，这是Cry3蛋白的色氨酸核心位点的预期大小 (Hileman et al., 2001b)。另外，由于Cry3Bb1蛋白不是来源于致敏原，和致敏物质亦无同源性，因此不具有过敏原的特征。

### 3.3.3 抗营养因子

玉米有安全的使用历史，在各种人类食物和动物饲料产品中，消耗了玉米谷物和加工产品。玉米饲料作为动物饲料，被反刍动物广泛地消化。玉米不含已知的过敏原或产生有生物活性的毒素。如前所述，根据 OECD 文献资料 (2002)，玉米里含有几个人们熟知的抗营养因子，这些因子包括植酸、DIMBOA、棉子糖和胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶二者的抑制因子。根据 OCED 文献叙述的，“在考虑玉米中的抗营养因子和天然毒素时，只有植酸对动物饲料具有重要意义”(OECD, 2002)。已有的研究表明，MON 863 玉米中的抗营养因子与对照相比没有显著差异(表 10)。

### 3.3.4 营养成分

对在美国多年多点田间试验中收获的玉米籽粒和秸秆的营养成分进行了分析，结果表明 MON 863 抗虫玉米品系的主要成分与对照品系实质等同，并且在已发表的文献报导的数值范围之内。对玉米籽粒的成分分析指标包括蛋白质、脂肪、灰分、粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、碳水化合物、热量和水分。还分析了氨基酸、脂肪酸、钙质、磷、生育酚（维生素 E）等成分。具体结果见表 6-表 9。这些分析证明 MON 863 品系的营养成分和对照品系以及其他商品玉米的营养成分实质相等。

表 6. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在氨基酸水平上的统计数值比较

氨基酸 (% of total)	MON 863		对照		差值 (MON 863 minus Control)		Comm. Range		文献值 范围	历史 范围
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% 置信度. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)				
Alanine/丙氨酸	7.74 ± 0.032 (7.65 - 7.85)	7.79 ± 0.032 (7.46 - 7.98)	-0.045 ± 0.031 (-0.23 - 0.24)	0.247	-0.14, 0.055	7.30 - 8.06 (6.94, 8.46)	6.4-9.9	7.2-8.8		
Arginine/精氨酸	4.43 ± 0.062 (4.21 - 4.68)	4.33 ± 0.062 (4.09 - 4.63)	0.10 ± 0.044 (-0.16 - 0.51)	0.030	-0.0099, 0.19	3.86 - 4.83 (3.38, 5.22)	2.9-5.9	3.5-5.0		
Aspartic acid 天冬氨酸	6.51 ± 0.053 (6.38 - 6.72)	6.45 ± 0.053 (6.30 - 6.67)	0.061 ± 0.021 (-0.11 - 0.23)	0.064	-0.0070, 0.13	6.05 - 7.14 (5.54, 7.65)	5.8-7.2	6.3-7.5		
Cystine 胱氨酸	2.20 ± 0.027 (1.98 - 2.40)	2.09 ± 0.027 (1.99 - 2.29)	0.11 ± 0.029 (-0.15 - 0.39)	<0.001	0.054, 0.17	1.84 - 2.35 (1.59, 2.65)	1.2-1.6	1.8-2.7		
Glutamic acid 谷氨酸	19.39 ± 0.16 (18.99 - 19.91)	19.56 ± 0.16 (18.97 - 20.26)	-0.17 ± 0.090 (-0.76 - 0.24)	0.157	-0.46, 0.12	18.31 - 20.25 (17.55, 21.25)	12.4-19.6	18.6-22.8		
Glycine 甘氨酸	3.60 ± 0.048 (3.45 - 3.74)	3.53 ± 0.048 (3.32 - 3.72)	0.072 ± 0.030 (-0.075 - 0.31)	0.100	-0.025, 0.17	3.20 - 4.13 (2.81, 4.46)	2.6-4.7	3.2-4.2		
Histidine 组氨酸	2.84 ± 0.032 (2.70 - 2.95)	2.83 ± 0.032 (2.72 - 2.94)	0.011 ± 0.023 (-0.082 - 0.24)	0.665	-0.063, 0.085	2.60 - 3.20 (2.37, 3.35)	2.0-2.8	2.8-3.4		
Isoleucine 异亮氨酸	3.67 ± 0.033 (3.45 - 3.89)	3.74 ± 0.033 (3.61 - 3.87)	-0.064 ± 0.033 (-0.33 - 0.15)	0.072	-0.13, 0.0065	3.47 - 3.94 (3.20, 4.17)	2.6-4.0	3.2-4.3		
Leucine 亮氨酸	13.36 ± 0.081 (12.88 - 13.65)	13.65 ± 0.081 (13.27 - 14.17)	-0.29 ± 0.084 (-0.75 - 0.13)	0.039	-0.56, -0.026	11.94 - 14.47 (11.30, 15.63)	7.8-15.2	12.0-15.8		

表 6. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在氨基酸水平上的统计数值比较（续）

氨基酸 (% of total)	MON 863	对照	差值 (MON 863 minus Control)			Comm. Range		文献 (范围)	历史值 (范围)
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% 置信度. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)			
Lysine 赖氨酸	2.92 ± 0.061 (2.65 - 3.26)	2.88 ± 0.061 (2.67 - 3.08)	0.042 ± 0.036 (-0.19 - 0.32)	0.328	-0.073, 0.16	2.40 - 3.52 (1.87, 3.89)	2.0-3.8	2.6-3.5	
Methionine 蛋氨酸	2.28 ± 0.060 (1.89 - 2.49)	2.24 ± 0.060 (1.96 - 2.58)	0.034 ± 0.035 (-0.20 - 0.25)	0.348	-0.040, 0.11	1.61 - 2.29 (1.34, 2.74)	1.0-2.1	1.3-2.6	
Phenylalanine 苯丙氨酸	4.99 ± 0.015 (4.93 - 5.06)	5.04 ± 0.015 (4.95 - 5.23)	-0.048 ± 0.017 (-0.17 - 0.041)	0.052	-0.096, 0.0010	4.80 - 5.35 (4.53, 5.66)	2.9-5.7	4.9-6.1	
Proline 脯氨酸	8.73 ± 0.054 (8.30 - 9.21)	8.78 ± 0.054 (8.60 - 9.05)	-0.052 ± 0.046 (-0.32 - 0.38)	0.267	-0.15, 0.045	8.57 - 9.61 (8.04, 10.35)	6.6-10.3	8.7-10.1	
Serine 丝氨酸	4.70 ± 0.11 (3.93 - 5.09)	4.67 ± 0.11 (4.20 - 4.94)	0.031 ± 0.094 (-0.77 - 0.89)	0.743	-0.17, 0.23	4.24 - 4.99 (3.76, 5.69)	4.2-5.5	4.9-6.0	
Threonine 苏氨酸	3.41 ± 0.035 (3.16 - 3.60)	3.36 ± 0.035 (3.16 - 3.49)	0.049 ± 0.024 (-0.15 - 0.23)	0.056	-0.0016, 0.099	3.19 - 3.59 (2.93, 3.83)	2.9-3.9	3.3-4.2	
Tryptophan 色氨酸	0.66 ± 0.015 (0.60 - 0.83)	0.65 ± 0.015 (0.60 - 0.68)	0.013 ± 0.012 (-0.043 - 0.17)	0.295	-0.013, 0.039	0.54 - 0.82 (0.37, 0.90)	0.5-1.2	0.4-1.0	
Tyrosine 酪氨酸	3.63 ± 0.057 (3.33 - 3.77)	3.48 ± 0.057 (2.71 - 3.82)	0.15 ± 0.078 (-0.14 - 0.92)	0.073	-0.016, 0.32	2.60 - 3.73 (2.15, 4.65)	2.9-4.7	3.7-4.3	
Valine 缬氨酸	4.94 ± 0.043 (4.71 - 5.13)	4.94 ± 0.043 (4.64 - 5.12)	-0.0091 ± 0.043 (-0.36 - 0.50)	0.833	-0.097, 0.079	4.49 - 5.30 (4.15, 5.63)	2.1-5.2	4.2-5.3	

表 7. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在脂肪酸水平上的统计数值比较

脂肪酸 (% of total)	MON 863	对照	Difference (MON 863 minus Control)			Comm. Range	文献 范围	历史 范围
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% C.I. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)		
16:0 棕榈酸	12.01 ± 0.11 (11.61 - 12.56)	11.88 ± 0.11 (11.66 - 12.20)	0.12 ± 0.11 (-0.21 - 0.79)	0.337	-0.22, 0.47	9.07 - 12.14 (7.74, 13.87)	7-19	9.9-12.0
18:0 硬脂酸	1.66 ± 0.083 (1.40 - 1.86)	1.66 ± 0.083 (1.33 - 1.81)	0.0044 ± 0.013 (-0.087 - 0.078)	0.738	-0.023, 0.032	1.44 - 2.40 (1.04, 2.68)	1-3	1.4-2.2
18:1 油酸	22.00 ± 0.36 (20.97 - 23.55)	21.87 ± 0.36 (21.00 - 22.53)	0.13 ± 0.12 (-0.16 - 1.05)	0.365	-0.26, 0.52	21.26 - 32.06 (13.28, 36.31)	20-46	20.6-27.5
18:2 亚油酸	62.23 ± 0.38 (60.02 - 63.21)	62.47 ± 0.38 (61.55 - 63.60)	-0.23 ± 0.18 (-1.83 - 0.32)	0.293	-0.81, 0.35	54.15 - 63.64 (50.21, 70.86)	35-70	55.9-66.1
18:3 亚麻酸	1.20 ± 0.020 (1.13 - 1.29)	1.24 ± 0.020 (1.09 - 1.45)	-0.037 ± 0.021 (-0.30 - 0.071)	0.079	-0.080, 0.0047	0.97 - 1.36 (0.75, 1.51)	0.8-2	0.8-1.1
20:0 花生酸	0.41 ± 0.0068 (0.39 - 0.44)	0.40 ± 0.0068 (0.39 - 0.42)	0.0052 ± 0.0062 (-0.017 - 0.027)	0.460	-0.014, 0.025	0.35 - 0.45 (0.30, 0.51)	0.1-2	0.3-0.5
20:1 花生酸	0.30 ± 0.011 (0.28 - 0.35)	0.30 ± 0.011 (0.28 - 0.35)	0.0011 ± 0.0037 (-0.039 - 0.040)	0.783	-0.011, 0.013	0.25 - 0.39 (0.18, 0.42)	na	0.2-0.3
22:0 山嵛酸	0.18 ± 0.0068 (0.17 - 0.21)	0.18 ± 0.0068 (0.15 - 0.21)	0.0043 ± 0.0056 (-0.023 - 0.029)	0.498	-0.013, 0.222	0.089 - 0.21 (0.055, 0.30)	na	0.1-0.3

表 8. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在矿物质水平上的统计数值比较

矿物质	MON 863		对照		差值 (MON 863 minus Control)		Comm. Range		文献 (范围)	历史值 (范围)
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% 置信度. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)				
钙 (% dw)	0.0052 ± 0.00041 (0.0041 - 0.0064)	0.0053 ± 0.00041 (0.0043 - 0.0089)	-0.00013 ± 0.00020 (-0.0027 - 0.00081)	0.538	-0.00056, 0.00031	0.0039 - 0.0060 (0.0022, 0.0073)	0.01-0.1	0.003-0.006		
铜 (mg/kg dw)	2.26 ± 0.17 (1.72 - 3.18)	2.19 ± 0.17 (1.60 - 2.88)	0.078 ± 0.076 (-0.58 - 1.10)	0.315	-0.078, 0.23	1.03 - 2.15 (0.25, 2.70)	0.9-10	na		
铁(mg/kg dw)	23.55 ± 1.16 (21.13 – 26.36)	24.18 ± 1.16 (20.57 - 28.16)	-0.63 ± 0.80 (-3.92 - 1.83)	0.490	-3.18, 1.92	16.74 - 28.69 (12.52, 35.06)	1-100	na		
镁 (% dw)	0.13 ± 0.0034 (0.12 - 0.14)	0.14 ± 0.0034 (0.12 - 0.16)	-0.0049 ± 0.0024 (-0.018 - 0.0049)	0.135	-0.013, 0.0028	0.091 - 0.14 (0.082, 0.17)	0.09-1.0	na		
锰 Manganese (mg/kg dw)	5.81 ± 0.78 (3.75 - 7.40)	6.15 ± 0.78 (4.01 - 8.28)	-0.34 ± 0.16 (-0.94 - 0.58)	0.122	-0.84, 0.17	3.51 - 9.80 (0, 12.84)	0.7-54	na		
磷/Phosphorus (% dw)	0.40 ± 0.0068 (0.37 - 0.45)	0.42 ± 0.0068 (0.39 - 0.46)	-0.022 ± 0.0094 (-0.070 - 0.019)	0.065	-0.045, 0.0020	0.27 - 0.41 (0.21, 0.47)	0.26-0.75	0.288-0.363		
钾 Potassium (% dw)	0.43 ± 0.0088 (0.40 - 0.48)	0.44 ± 0.0088 (0.39 - 0.48)	-0.0074 ± 0.0087 (-0.056 - 0.037)	0.457	-0.035, 0.020	0.33 - 0.43 (0.28, 0.48)	0.32-0.72	na		
锌 (mg/kg dw)	22.15 ± 1.44 (17.95 – 25.25)	23.68 ± 1.44 (18.77 – 28.14)	-1.53 ± 0.69 (-4.60 - 0.90)	0.112	-3.73, 0.66	12.84 - 31.22 (6.31, 37.95)	12-30	na		

表9. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在纤维及常规组份水平上的统计数值比较

Fiber & Proximates	MON 863	对照	差值 (MON 863 minus Control)			Comm. Range		文献 (范围)	历史值 (范围)
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% 置信度. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)			
灰份 Ash (% dw)	1.35 ± 0.12 (0.84 - 1.71)	1.41 ± 0.12 (0.89 - 1.89)	-0.064 ± 0.047 (-0.45 - 0.31)	0.196	-0.17, 0.037	0.62 - 1.53 (0.26, 2.06)	1.1-3.9	1.2-1.8	
碳水化合物 (% dw)	83.30 ± 0.56 (81.83 - 85.00)	82.76 ± 0.56 (80.70 - 84.80)	0.54 ± 0.27 (-0.78 - 2.43)	0.138	-0.32, 1.40	82.51 - 87.84 (78.97, 90.36)	na	81.7-86.3	
Acid detergent fiber (% dw)	4.45 ± 0.15 (3.49 - 5.23)	4.50 ± 0.15 (3.62 - 5.89)	-0.050 ± 0.18 (-1.77 - 1.16)	0.778	-0.43, 0.33	3.65 - 6.09 (1.98, 6.62)	3.3 - 4.3	3.1 - 5.3	
Neutral detergent fiber (% dw)	11.64 ± 0.54 (9.21 - 13.47)	12.02 ± 0.54 (10.31 - 15.82)	-0.37 ± 0.61 (-4.32 - 2.30)	0.585	-2.33, 1.58	9.50 - 14.95 (6.51, 16.28)	8.3-11.9	9.6 - 15.3	
水份 (% fw)	10.03 ± 0.50 (8.54 - 11.20)	10.23 ± 0.50 (8.60 - 11.40)	-0.20 ± 0.13 (-0.90 - 0.26)	0.216	-0.61, 0.21	8.75 - 15.70 (5.09, 18.62)	7-23	9.4 - 15.8	
总脂肪 (% dw)	3.77 ± 0.20 (3.00 - 4.56)	3.64 ± 0.20 (3.05 - 4.29)	0.13 ± 0.18 (-0.77 - 1.02)	0.520	-0.44, 0.70	2.18 - 3.86 (1.68, 4.64)	3.1-5.7, 2.9-6.1	2.4-4.2	
蛋白质 (% dw)	11.60 ± 0.48 (10.43 - 12.82)	12.19 ± 0.48 (10.45 - 13.80)	-0.59 ± 0.22 (-1.52 - 0.12)	0.071	-1.28, 0.097 <sup>*</sup>	- 13.83 (5.47, 16.57)	6.0 - 12.0, 9.7 - 16.1	9.0 - 13.6	

表 10. 多试验点中 MON 863 和非转基因对照玉米在营养及抗营养因子水平上的统计数值比较

组成	MON 863		对照		差值 (MON 863 minus Control)		Comm. Range		文献 (范围)	历史值 (范围)
	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	均值 ± S.E. (范围)	p-值	95% 置信度. (Lower, Upper)	(95% T.I. Lower, Upper)				
肌醇六磷酸 (%) dw)	1.11 ± 0.033 (0.92 - 1.28)	1.23 ± 0.033 (1.01 - 1.37)	-0.12 ± 0.034 (-0.31 - 0.19)	0.001	-0.19, -0.050	0.73 - 1.17 (0.39, 1.33)	to 0.9%	na		
胰蛋白酶抑制剂 (TIU/mg dw)	2.30 ± 0.16 (0.56 - 3.10)	2.48 ± 0.16 (1.91 - 3.45)	-0.18 ± 0.16 (-1.70 - 0.63)	0.288	-0.53, 0.17	0.58 - 3.05 (0, 4.25)	na	na		
维生素 E (mg/gdw)	0.011 ± 0.0012 (0.0062 - 0.014)	0.013 ± 0.0012 (0.0088 - 0.016)	-0.0015 ± 0.00047 (-0.0077 - 0.00090)	0.002	-0.0025, - 0.00058	0.0041 - 0.014 (0, 0.019)	0.017 - 0.047	0.008 - 0.015		

### 3.3.5 抗生素抗性

MON 863 使用 *nptII* 编码序列用作选择标记。*nptII* 基因分离自大肠杆菌的非毒性菌株 K12，可编码合成 264 个氨基酸的新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 蛋白，在转化时用于抗生素抗性标记。

大肠杆菌 K12 菌株广泛存在于我们的生存环境中，包括人类消化道中，一般认为没有必要对该细菌来源的 NPTII 蛋白进行额外的分析或者毒理学试验。该表达载体不认为具有致病性，也不可能演变成为具有致病性的载体，对人类和动物安全。

此外，由于 *nptII* 基因已广泛用于西红柿、棉花和油菜等转基因植物的生产中，美国 FDA 已对 NPTII 蛋白进行了全面的安全性评价。NPT 蛋白在胃酸中可被迅速灭活，并被消化酶降解，在转基因植物中的表达形式未被糖基化，且对热不稳定，因此不具备已知致敏原的特征。小鼠急性经口毒性试验表明，纯化的 NPTII 蛋白的最大予量不会引起任何毒性反应，其 NOEL > 5000 mg/kg。因此 FDA 认为，食用 NPTII 蛋白不会引起任何毒性和过敏反应。此外，NPTII 蛋白在 MON 863 玉米中的表达量极低（低于检测限）。

### 3.3.6 对人类和食品安全性的其它影响

Cry3Bb1 蛋白来源于苏云金杆菌 (Bt)，自从 1958 年以来，Bt 菌株一直在美国进行商业应用，以生产具有杀虫活性的微生物衍生产品 (EPA, 1988)。具有长期的安全使用历史。此外，蛋白安全性评价数据也支持 Cry3Bb1 蛋白对人类健康无害的结论，组成成分分析表明 MON 863 与常规对照的组成成分实质等同。所以 MON 863 玉米不会对人体和食品安全产生任何不良影响。

## 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

MON 863 系采用安全等级为 I 的常规玉米栽培种 Hi-II 为受体并经类型 2 的基因操作方法转化后获得的。大量的研究表明 MON 863 对人类和动物健康以及对生态环境的安全性的影响与常规非转基因玉米是一致的。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十三条的规定，转基因植物应该属于安全等级 I。

## 4. 转基因植物产品安全性评价

### 4.1 生产和加工活动对转基因植物的安全性的影响

在玉米的商业加工过程中往往需要经过高温处理，加工过程中的热处理会影响玉米中Cry3Bb1蛋白的活性。在实验室模拟玉米的商业加工过程的研究中，利用免疫印迹反应和ELISA分析方法测定PBST或2×Laemmli缓冲液中Cry3Bb1蛋白的免疫反应活性。证实高温下烘烤30 min后即检测到Cry3Bb1蛋白。此外，还利用一种易受影响的害虫（科罗拉多马铃薯甲虫）对烘烤与未烘烤的IPC样品进行了昆虫试验。这些结果清楚地表明了烘烤后的转基因抗虫玉米MON 863中的Cry3Bb1蛋白杀虫活性的丧失。

### 4.2 转基因植物产品的稳定性

如前所述，MON 863 中外源 DNA 以单拷贝形式整合在玉米基因组的单个位点上，并以孟德尔遗传规律稳定遗传给子代。多年多点的田间试验也表明，MON 863 转基因玉米能够有效抵抗玉米根虫侵害，其外源蛋白 Cry3Bb1 稳定表达。

### 4.3 转基因植物产品和转基因植物之间环境安全性的差异

抗虫玉米 MON 863 给种植者带来的益处是显而易见的。传统玉米虫控制方法（例如杀虫剂拌种、杀虫剂处理土壤或叶面喷施以控制成虫）不但对玉米害虫（例如玉米切根叶甲、玉米跳甲和玉米叶蚜）具有一致的显著主效应，而且还对几种非靶标有益捕虫（例如瓢虫）、小花蝽、寄生蜂和食腐质生物（Diplura: Japygidae）有影响。与传统的化学控制方法不同，MON 863 之类的抗虫作物由于对靶标作物的特异性，给生态环境中其它生物带来的风险程度最低。与传统杀虫剂控制计划（特别是土壤和叶面施用）相比，MON 863 对某些益虫的影响较小。因此，利用 MON 863 控制玉米虫可以减少杀虫剂的使用，从而提高玉米病虫害综合治理得益。

从加工产品上来看，MON 863 在营养成分和食用安全性方面与常规非转基因玉米没有差异。经过加工的转基因玉米产品已不具备繁殖再生能力，其中表达的外源蛋白 Cry3Bb1 也在加热过程中失去抗虫活性，对环境安全没有影响。

### 4.4 转基因植物产品和转基因植物之间对人类健康影响的差异

研究数据表明，MON 863 在营养成分和食用安全性方面与常规非转基因玉米没有差异。大量的研究证实，Cry3Bb1 对人类健康没有不良影响，并且转基因玉米加工产品中其表达的外源蛋白 Cry3Bb1 也在加热过程中失去活性。因此，MON 863 转基因玉米与其加工产品对人类健康均没有不利影响。

### 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，目前对玉米所采用的加工方法不会影响抗虫玉米转化事件 MON 863 的安全性，即加工方法对产品安全性影响的安全等级应该为第 II 类。本项目的转化受体安全等级为 I，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，本项目转基因植物的产品的安全等级仍为 I。

## 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

抗虫玉米转化事件 MON 863 中 *cry3Bb1* 基因的核苷酸序列（商业保密资料）

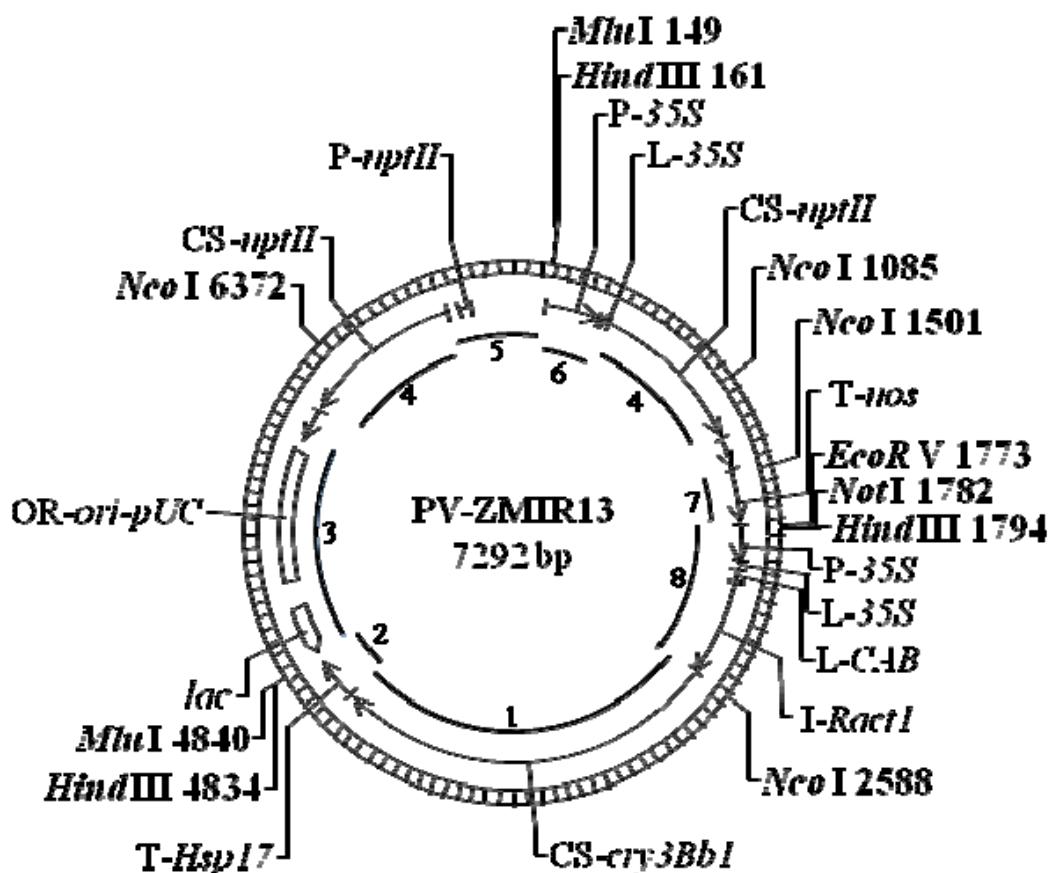
涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

#### 由 *cry3Bb1* 基因核苷酸序列推导的氨基酸序列

```
1  MANPNNRSEH DTIKVTPNSE LQTNHNQYPL ADNPNSTLEE LNYKEFLRMT
51 EDSSTEVLNDN STVKDAVG TG ISVVGQILGV VGVPFAGALT SFYQSFLNTI
101 WPSDADPWKA FMAQVEVLID KKIEEYAKSK ALAELQGLQN NFEDYVNALN
151 SWKKTPLSLR SKRSQGRIRE LFSQAESHFR NSMPSFAVSK FEVLFPLPTYA
201 QAANTHLLLLL KDAQVFGE EW GYSSEDVAEF YRRQLKLTQQ YTDHCVNWYN
251 VGLNGLRGST YDAWVKFNRF RREMTLTVLD LIVLFPFYDI RLYSKGVKTE
301 LTRDIFTDPI FLLTTLQKYG PTFLSIENSI RKPHLFDYLQ GIEFHTRLRP
351 GYFGKDSFNY WSGNYVETRP SIGSSKTITS PFYGDKSTEP VQKLSFDGQK
401 VYRTIANTDV AAWPNGKVYL GVTKVDFSQY DDQKNETSTQ TYDSKRNNGH
451 VSAQDSIDQL PPETTDEPLE KAYSHQLNYA ECFLMQDRRG TIPFFTWTMR
501 SVDFFFNTIDA EKITQLPVVK AYALSSGASI IEGPGFTGGN LLFLKESSNS
551 IAKFKVTLNS AALLQRYRVR IRYASTTNLR LFVQNSNNDF LVIYINKTMN
601 KDDDLTYQTF DLATTNSNMG FSGDKNELII GAESFVSNEK IYIDKIEFIP
651 VQL*
```

## 2. 目的基因与载体构建的图谱

源自于质粒PV-ZMIR13的线性化片段PV-ZMIR13L被用于MON 863玉米的转化。使用*Mlu* I消化PV-ZMIR13质粒，释放出~4700 bp的线性化片段 (*Mlu* I 149~*Mlu* I 4840)，该线性化片段含有一个完整的*cry3Bb1*基因表达盒。用于转化的DNA片段含有两个基因表达盒：1) 受P-4-AS1植物启动子调控的*cry3Bb1*编码序列，小麦叶绿素a/b结合蛋白(wtCAB)的mRNA前导序列，水稻肌动蛋白编码基因内含子(*ract1*)，以及小麦热休克蛋白17.3(*tahsp17*)3'端多聚腺嘌呤序列；2) 受花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子调控的*nptII*编码序列用作选择标记，以及胭脂碱合酶(NOS)3'端多聚腺嘌呤序列。



转化质粒 PV-ZMIR13 的环形图谱

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)

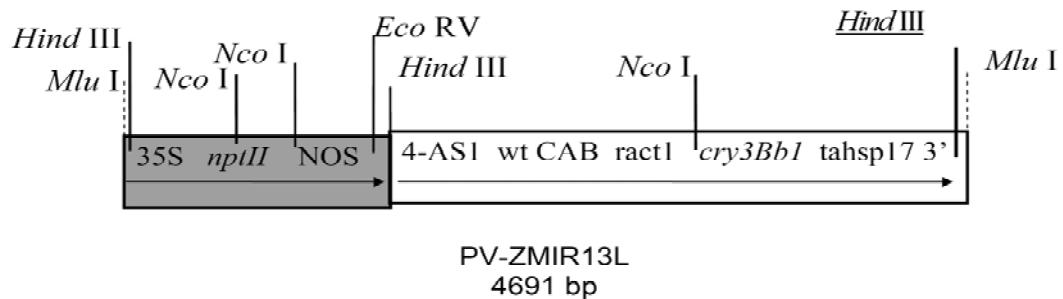
3-1 插入序列及其相邻的基因组侧翼序列的 PCR 分析结果 (商业保密资料)

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

3-2 插入序列及基因组侧翼序列 (商业保密资料)

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

3-3 插入片段、基因组侧翼片段和酶切位点线性示意图



### 3-4 插入和拷贝数的 Southern 杂交分析结果

用 Southern 杂交方法分析了插入数（玉米基因组中被整合位点的数目）、拷贝数（一个整合位点外源 DNA 片段的数目）、插入的基因表达盒的完整性、以及骨架序列是否存在与转化体中。数据显示 MON863 含有单个 DNA 插入，含有一个拷贝的 *cry3Bb1* 和 *nptII* 基因，除此之外，转化所用 DNA 片段上与完整插入片段相连或不相连的其它元件都没有在 MON 863 基因组中检出。此外，也没有检测出 MON 863 中存在 PV-ZMIR13 质粒骨架序列，包括 *ori-pUC* 和受细菌启动子调控的 *nptII* 编码区。综上，这些数据证实了 MON 863 的插入区只能编码两个预期全长蛋白：Cry3Bb1 和 NPTII。此外，对来源于 R0 自交产生的 F2 代及其产生的后两个 F2 世代基因组 DNA 的 Southern 印迹分析证实了插入 DNA 的遗传学稳定性。

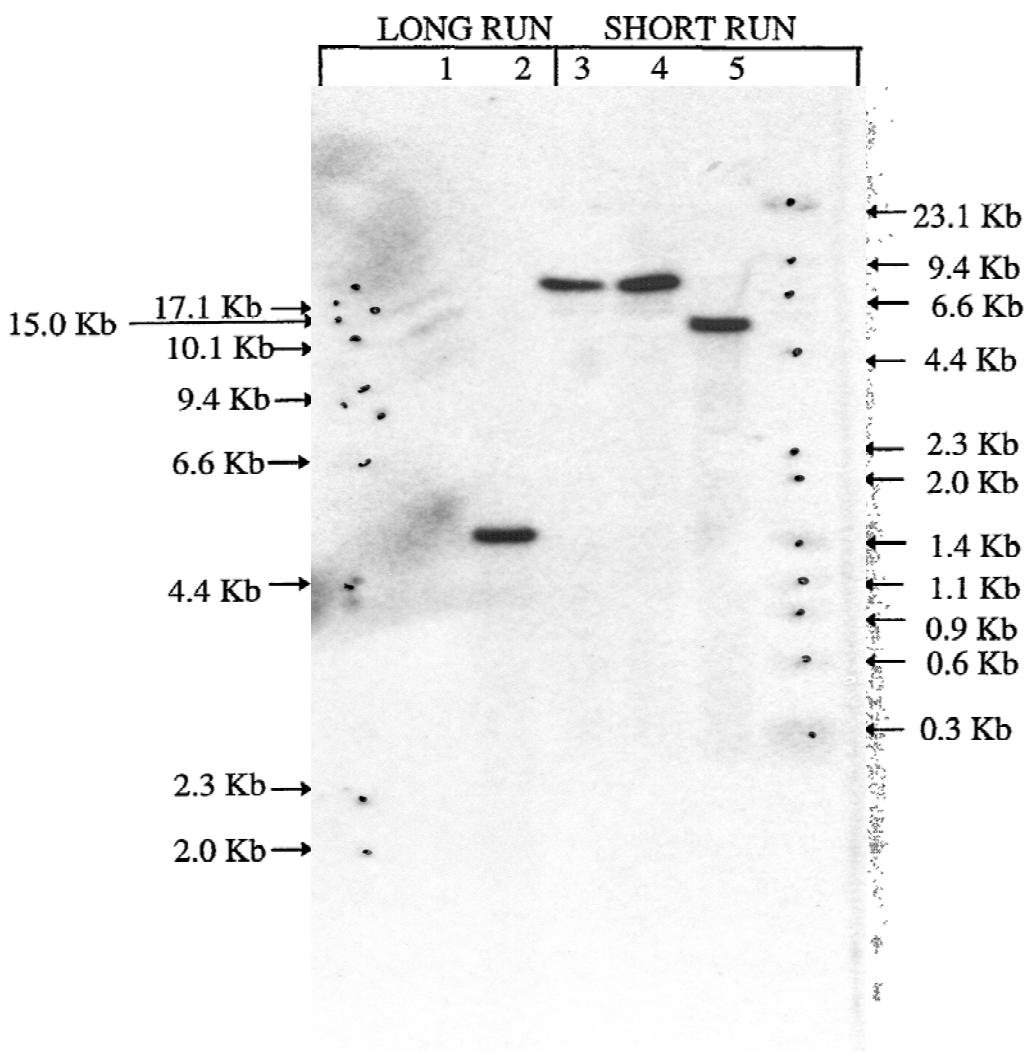
需要说明的是，MON 846 是同时与 MON 863 进行分子特征鉴定的另一转化事件，在 MON 863 的所有 Southern 杂交分析中，可将其视为阴性对照。

#### 插入数的 Southern 杂交分析

测试和对照DNA用限制性内切酶*NdeI*消化，PV-ZMIR13质粒与MON 846对照DNA的混合物用*NdeI*和*EcoRV*消化。*NdeI*在质粒内部不存在酶切位点，所以需用*EcoRV*使质粒线性化，帮助其在凝胶上的迁移，使其可以作为一个精确的分子量大小估计标准。以放射性标记的转化用PV-ZMIR13L线性DNA (~4.7 kb) 为探针进行杂交。对照MON 844 (第1道) 作为阴性对照，没有产生可检测条带；PV-ZMIR13 质粒DNA与MON 846 DNA混合物 (第3、4道) 产生了预期大小的约7.3 Kb全长质粒条带；MON 863 DNA (第2、5道) 产生了约5.0 kb的预期条带。因此，这一结果证实MON 863含有一个定位在约5.0 Kb *Nde I*限制性片段上的插入。

#### 拷贝数的Southern杂交分析

用*EcoRV*消化测试DNA、对照DNA，以及对照DNA与PV-ZMIR13质粒混合物。以PV-ZMIR13L为探针，PV-ZMIR13质粒提供了用于转化的线性DNA片段。MON 846对照DNA (第1道) 在9.3 Kb处有模糊条带，因其也出现在MON 863道 (第2、5道) 中，这可能是非特异性杂交所致。MON 846 DNA与PV-ZMIR13DNA的混合物 (第3、4道) 产生了预期大小的约7.3 Kb条带，代表全长线性质粒大小。因为质粒条带的存在，第3、4道没有发现非特异性杂交所致的9.3 Kb条带。MON 863 DNA (第2、5道) 在3.7 Kb和9.6 Kb处产生了两条独特条带。限制性内切酶*EcoRV*只在转化所用PV-ZMIR13L片段上有一个酶切位点，因此，对于只含一个拷贝插入DNA的事件来说，应该会产生两条边界片段的条带；如果一个事件的印迹多于两条带，则可推断有不止一个DNA片段拷贝被转化。由于本次分析中只有两条带出现，证实MON 863在一个整合基因座上只含单拷贝转化DNA片段。

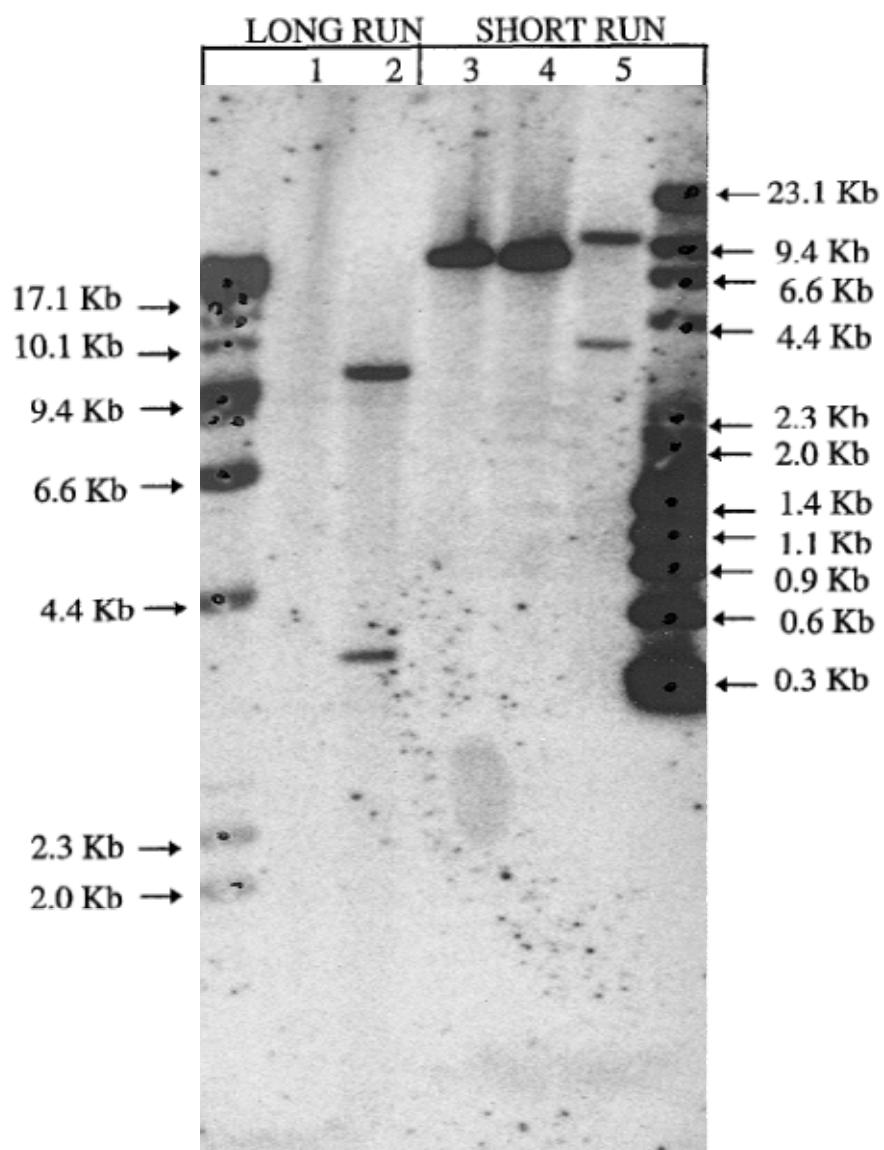


### MON 863 中插入数的 Southern 杂交分析

10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Nde*I 进行消化, PV-ZMIR13 质粒与 MON 846 对照 DNA 的混合物用 *Nde*I 和 *Eco*RV 消化, 以放射性标记的转化用 PV-ZMIR13L 线性 DNA 为探针进行杂交, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19 pg PV-ZMIR13 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)



## MON 863 中插入拷贝数的 Southern 杂交分析

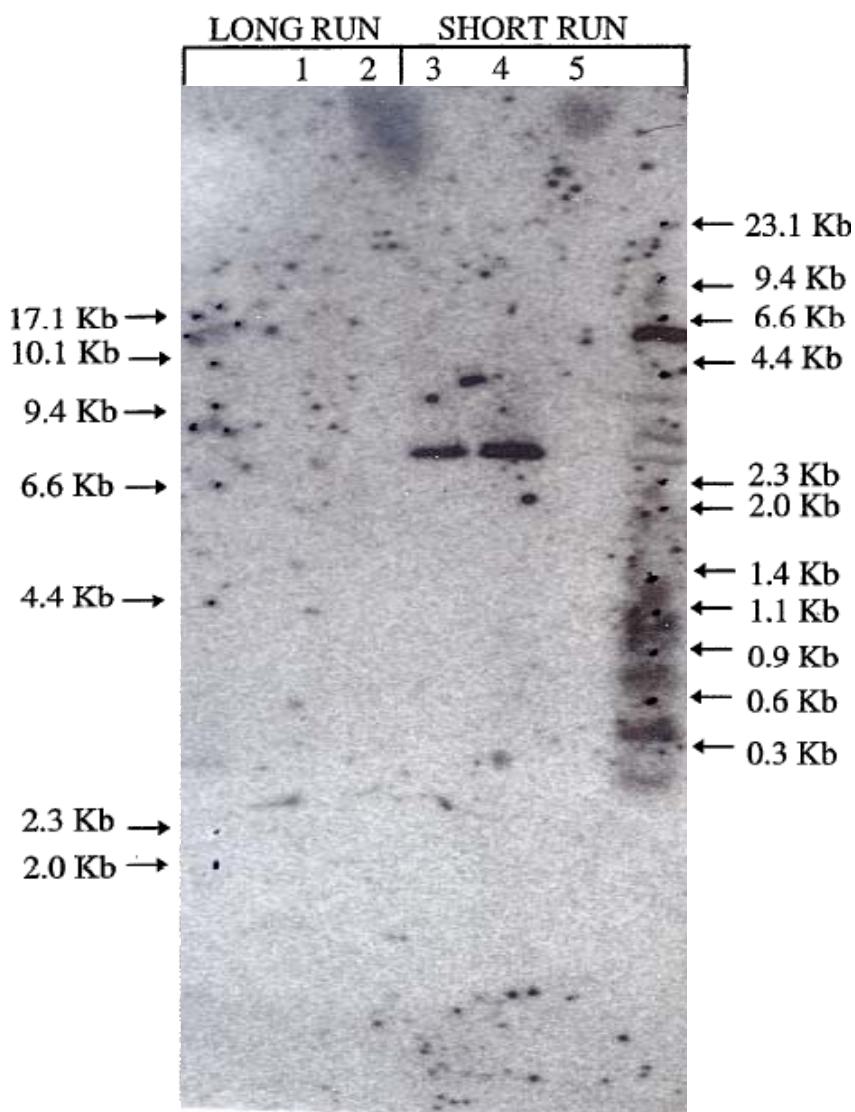
10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Nde*I 进行消化, PV-ZMIR13 质粒与 MON 846 对照 DNA 的混合物用 *Nde*I 和 *Eco*RV 消化, 以放射性标记的转化用 PV-ZMIR13L 线性 DNA 为探针进行杂交, 沫道描述如下:

- 1、MON 846 (10μg)
  - 2、MON 863 (10μg)
  - 3、MON 846 (10μg) 与约 9.5 pg PV-ZMIR13 (0.5 拷贝)
  - 4、MON 846 (10μg) 与约 19 pg PV-ZMIR13 (1.0 拷贝)
  - 5、MON 863 (10μg)

→箭头标示分子量大小 (kb)

### 3-5 MON 863 中不含质粒骨架序列的 Southern 杂交验证

试验和对照 DNA 用 *Hind*III 消化。将消化的对照 DNA 和含有完整骨架序列的 2.6Kb 的 *Hind*III 消化 PV-ZMIR13 质粒片段混合。以除了 *nptII* 编码区以外的整个质粒骨架序列为探针进行 Southern 印迹检测。阴性对照 MON 846 基因组 DNA（泳道 1）中未发现可检测的杂交条带，与预期结果一致。在大约 2.4 Kb 位置处有一片非特异性的微弱杂交信号区域扩散到泳道 1 的部分空间中，该现象不影响对此印迹结果的解释。质粒 PV-ZMIR13 骨架 DNA 混合 MON 846 对照组 DNA（泳道 3 和 4）在大约 2.6 Kb 位置产生与整个预期大小的条带。MON 863 DNA（泳道 2 和 5）未检测到杂交条带。此结果结合对 *nptII* 编码区的 Southern 印迹分析，确证 MON 863 不含任何可检测的质粒骨架序列（包括 *ori*-pUC 以及受细菌启动子调控的 *nptII* 编码区）。



### MON 863 中是否存在骨架序列的 Southern 杂交分析

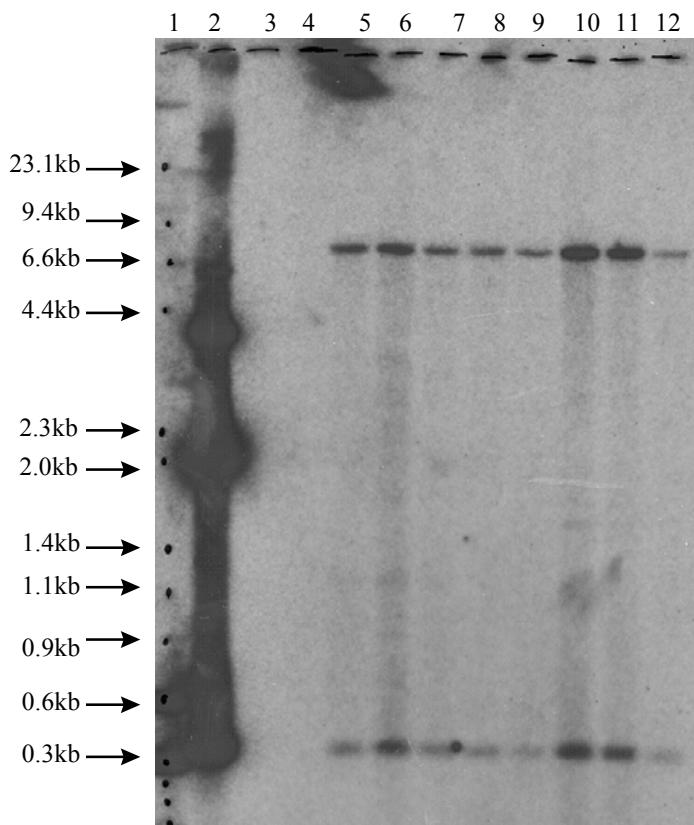
10 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 846 (对照) 基因组 DNA 和 20 $\mu$ g 提取自籽粒的 MON 863 (测试) 基因组 DNA 用 *Hind* III 进行消化, 以放射性标记的除了 *nptII* 编码区外的完整骨架序列为探针, 泳道描述如下:

- 1、MON 846 (10 $\mu$ g)
- 2、MON 863 (10 $\mu$ g)
- 3、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 9.5pgPV-ZMIR13 骨架区域 (0.5 拷贝)
- 4、MON 846 (10 $\mu$ g) 与约 19pgPV-ZMIR13 骨架区域 (1.0 拷贝)
- 5、MON 863 (10 $\mu$ g)

→箭头标示分子量大小 (kb)

### 3-6 插入序列世代稳定性的 Southern 杂交分析

选取了育种谱系中的 8 个世代(A1F1、A1BC1F1、A1BC2F2、A634F2a、A634F3、A1F2、A1BC2F1 及 LH82×A634F3) 进行 Southern 杂交分析, 进一步确定插入序列在 MON 863 各个世代中的遗传稳定性。将对照 DNA、对照与 PV-ZMIR13 混合物以及 8 个世代玉米基因组 DNA 用 *Nco* I 消化, 以 *nptII* 全长编码区为探针进行杂交。对照组 DNA、A634 和 LH82xMON863-A634F3 (泳道 3 和 4) 无杂交信号。PV-ZMIR13 质粒 DNA 与 A1 非转基因对照 DNA 混合组 (泳道 2) 在 0.4、2.0 和 3.8 kb 处显示出预期大小的条带, 膜上可见一些模糊条带, 可能是由于消化不完全造成的。所有受试的 8 个世代 A1F1 (泳道 5), A1BC1F1 (泳道 6), A1F2 (泳道 7), A1BC2F1 (泳道 8), A1BC2F2 (泳道 9), A634F3 (泳道 10), A634F2a (泳道 11) 及 LH82×A634F3 (泳道 12) 均产生了预期的 0.4 kb 条带和 8.0 kb 的插入区 5' 端片段。A634F3 世代 (泳道 10) 在~1.6 kb 处有模糊条带, 可能是由于 PV-ZMIR13 质粒 1501 bp 处 *Nco* I 识别位点的不完全消化造成。少数世代的杂交印迹中有一些看起来像是条带的模糊区域, 由于这些条带没有存在于所有 MON 863 世代中, 很有可能是非特异性杂交或是各世代间 DNA 质量存在差异。除此之外, 没有观察到 9 个世代杂交带型的其它差异。上述结果证实了插入 DNA 的稳定性。



### MON 863 中插入稳定性的 Southern 杂交分析

10 $\mu$ g 提取自籽粒或叶片的DNA用Nco I进行消化,以放射性标记的全长nptII编码区为探针进行杂交,泳道描述如下:

- 1、DNA 分子量标准
- 2、A1 非转基因对照与约 22.8pg PV-ZMIR13 质粒的混合物
- 3、A634 非转基因对照
- 4、LH82xMON863-/A634F3 非转基因对照
- 5、A1F1
- 6、A1BC1F1
- 7、A1F2
- 8、A1BC2F1
- 9、A1BC2F2
- 10、A634F3
- 11、A634F2a
- 12、LH82xA634F3

→箭头示分子量大小 (kb)

### 3-7 插入片段表达产物的分析

用 ELISA 方法检测 MON 863 中目的蛋白在不同组织中的表达情况。用于表达分析的材料收集于 1999 年 4 个美国试验点，此外又在 2000 年阿根廷的 3 个试验点收集花粉材料用于分析。分析的组织包括：嫩叶（V4 生长期）、秸秆、成熟的根、花丝、籽粒和花粉。对所有组织均进行 Cry3Bb1 蛋白的检测，但仅在嫩叶、秸秆和籽粒中检测 NPTII 蛋白的水平，如下表所示。MON 863 中 Cry3Bb1 蛋白的平均水平如下：在嫩叶中为 81 μg/g，在籽粒中为 70 μg/g，在根中为 41 μg/g，在秸秆组织中为 39 μg/g。Cry3Bb1 在花粉和花丝中的水平分别为 62 和 10 μg/g。在检测的所有组织中，NPTII 蛋白水平的范围为不可检测 (<0.076 μg/g) ~1.4 μg/g。

#### 多个试点 MON 863 组织样品中 Cry3Bb1 和 NPTII 蛋白表达情况

组织 (种植后天数) <sup>‡</sup>	参数*	Cry3Bb1 (μg/g fw)	NPTII (μg/g fw)
嫩叶 (21 天)	平均数±标准差 范围 n	81 ± 11 65 – 93 4	0.98 ± 0.27 0.74 – 1.4 4
秸秆 (90 天)	平均数±标准差 范围 n	39 ± 10 24 – 45 4	0.19 ± 0.03 0.17 – 0.23 4
成熟的根 (90 天)	平均数±标准差 范围 n	41 ± 13 25 – 56 4	未分析
籽粒 (125 天)	平均数±标准差 范围 n	70 ± 17 49 – 86 4	<0.076 <sup>†</sup> 4
花丝 (58 天)	平均数±标准差 n	10 1	未分析
花粉 (60 天)	平均数±标准差 范围 n	62 ± 18 30 – 93 13	未分析

\* SD = 平均数标准差；n=分析中的重复数

† 玉米谷粒的检测限制=0.076 μg/g fw

‡ 依照 APHIS 通告 #99-106-16n 规定收集

此外，还在 1999 年美国田间试验点中全生长季的不同时期收集叶片、根和全植株样品，分析 Cry3Bb1 蛋白的含量，分析结果见下表。对照组植物组织中的 Cry3Bb1 水平在检测限以下，所以没有报告。由下表可见，MON 863 的叶片组织、全植株和根组织中 Cry3Bb1 蛋白的平均水平随着生长季而下降。根组织 Cry3Bb1 蛋白的平均水平变化范围是：从最高的植物幼苗的 58 μg/g 到最低的衰老植物的 24 μg/g。不过，在植物发育关键性的早期阶段，根组织中 Cry3Bb1 蛋白水平已足够保护植株免受根虫的取食危害。

#### 1999 年美国田间试验 MON 863 各组织样品中 Cry3Bb1 蛋白表达情况

种植后天数 <sup>‡</sup>	参数 <sup>*</sup>	叶片组织中 Cry3Bb1 (μg/g fw)	全植株中 Cry3Bb1 (μg/g fw)	根部组织中 Cry3Bb1 (μg/g fw)
21 天	平均数±标准差	81 ± 14		
	范围	65 – 93	NC <sup>†</sup>	NC
	n	3		
35 天	平均数±标准差	79 ± 6.4	46 ± 7.8	58 ± 10
	范围	72 – 84	38 – 54	46 – 66
	n	3	3	3
49 天	平均数±标准差	43 ± 18	31 ± 3.3	57 ± 3.8
	范围	30 – 56	28 – 33	54 – 59
	n	2	2	2
90 天	平均数±标准差		37 ± 12	37 ± 11
	范围	NC	24 – 45	25 – 47
	n		3	3
126 天	平均数±标准差		25 ± 11	24 ± 18
	范围	NC	13 – 35	3.2 – 36
	n		3	3

\* SD = 平均数标准差；n=分析的重复的数目

† NC=未收集

‡ 依照 APHIS 通告 #99-106-16n 收集

#### 4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

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

本申请为进口转基因生物直接申请安全证书，本项不适用。

#### 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）

本申请为进口转基因生物直接申请安全证书，本项不适用。

#### 7. 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 *cry3Bb1* 基因抗虫玉米 MON 863 环境和食用安全性综合评价报告》。

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

请见下页《转 *cry3Bb1* 基因抗虫玉米 MON 863 环境和食用安全性综合评价报告》。

# 转 *cry3Bb1* 基因抗虫玉米 MON 863 环境和食用安全性综合评价报告

## 一、摘要（转述转基因作物的遗传性状、试验年限、评价或检测指标及结论）

孟山都公司利用基因枪法将 *cry3Bb1* 基因转入玉米植物基因组 DNA 中，开发了抗玉米根虫为害的玉米品系 MON 863。MON 863 可以表达经修饰的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 亚种 *kumamotoensis*, *B.t.*) 来源 Cry3Bb1 蛋白，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。

通过 PCR、Southern 杂交等分子生物学分析，证明了插入表达盒的完整性，以及插入为单一位点的单拷贝插入，并且证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。此外，多年多点的 ELISA 分析也证明了 Cry3Bb1 蛋白能够稳定表达。

2003 年中国疾病预防控制中心营养与食品安全所进行了 MON 863 的大鼠 90 天的全食品喂养试验，结果发现，动物活动、生长均未见异常，被毛浓密有光泽。MON 863 组雌雄大鼠体重和食物利用率与亲本玉米组以及市售玉米组比较无显著性差异 ( $p>0.05$ )。血液学检测发现，MON 863 玉米组雌性大鼠血小板读数和白细胞分类百分比与市售玉米组比较有显著性差异，但与亲本玉米组无显著性差异。血生化检测发现，MON 863 玉米雄性大鼠的胆固醇 (45 天) 显著高于市售玉米组，总蛋白和白蛋白 (90 天) 显著低于市售玉米组，但上述指标均与亲本玉米组无显著性差异；虽然 MON 863 玉米组的白蛋白和谷丙转氨酶 (45 天) 显著高于亲本玉米组，但所有测定指标均在检测单位历史检测值参考范围之内，故无生物学单方。而且各试验组末期脏体比无显著性差异；病理学检查也均未见由 MON 863 玉米引起的异常改变。因此可以认为 MON 863 玉米不会对大鼠体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理组织产生不良作用。

2000~2001 年北美田间试验和 2002~2003 年在吉林省、河北省和山东省进行的环境安全性检测结果均显示，抗虫玉米 MON863 在种苗萌发、表型特征（穗长、株高、根倒伏百分率、茎倒伏百分率、下垂穗百分率、持绿）、生长（种苗生命力、株高）、雄穗、花粉和丝生长长度单位及产量上，与常规玉米植株没有显著性差别。除了对靶标害虫的抗性外，MON 863 在虫害或病害的敏感性或耐性方面相对于非转基因对照没有改变，表明抗虫基因的导入并没有增强受体原有的生存竞争能力，不会增加其杂草化趋势。2002 年和 2003 年利用 3 个转基因玉米品种进行了基因流散风险评估表明，在距转基因玉米田 5 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经大大降低，约为 0.24%~13.19%；到 60 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经低至 0.08%~1%。在中国目前还没有发现能与玉米异交的近缘种，所以转基因玉米通过花粉向近缘种扩散的可能性小。同时，严格按照通用普通玉米制种田常规隔离距离 300 m 进行管理，转基因玉米基因流散的风险完全能够减少到可忽略不计。

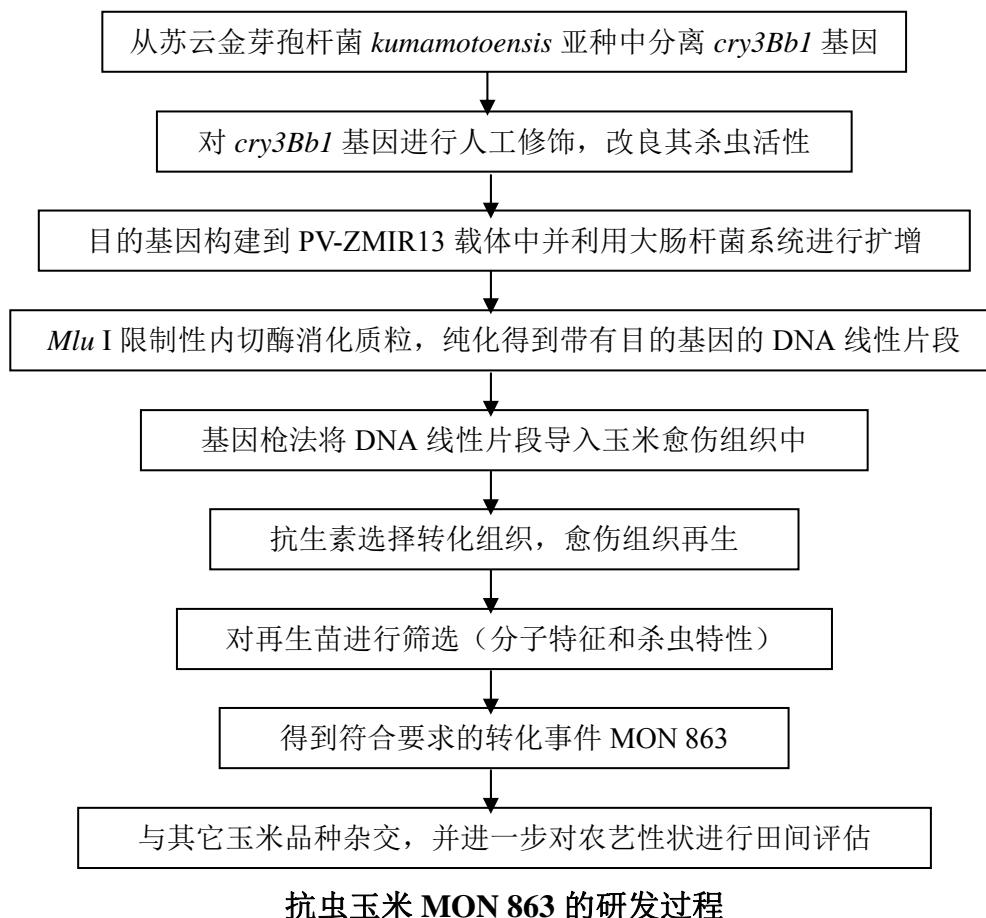
## 二、背景介绍

*B.t.* 来源的 Cry 抗虫蛋白从 1958 年开始在美国开始商业化应用，用于生产具有杀虫活性的微生物来源的产品 (EPA, 1988)。大量的安全性研究已经证明，来源于 *B.t.* 蛋白的杀虫剂对哺乳动物的毒性极低 (McClintock 等, 1995)。

在抗虫玉米 MON 863 上市之前，孟山都公司按照包括美国农业部动植物检疫局和美国食品与药品管理局在内的美国法规监管机构的有关法规要求对 MON 863 进行了大量的安全性检测，其中环境安全评价涵盖了对环境的影响、杂草化潜势、对非靶标生物的影响、遗传物质转移、生存竞争能力、适应性等，食用及饲用安全评价包括转入基因的分子生物特性分析、蛋白毒性及致敏性评价、营养成份的分析比较、毒理试验等，试验结果表明，MON 863 在环境安全、营养组成、食品安全等方面和其亲本 Hi-II 及常规玉米品种没有区别。

MON 863 于 2002 年在美国首先获得美国农业部（USDA）、美国食品与药品管理局（FDA）的相关批准允许上市，随即获得美国环保署（EPA）关于商业化种植的许可，后又在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。自商业化应用以来，并没有发现 MON 863 玉米对环境或食用饲用安全产生不良影响的报道。

抗虫玉米 MON 863 的转化开发过程见下图：



### 三、受体生物学特性

用于 MON 863 转化的最初玉米受体名为“Hi-II”，是 A188 和 B73 自交系玉米的衍生物。它们分别是由美国明尼苏达大学和爱荷华州立大学开发的自交系，属栽培类玉米。栽培玉米在分类上属于单子叶植物纲、禾本科 (*Gramineae*)、玉蜀黍族 (*Maydeae*)、玉蜀黍属 (*Zea* L.)。

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

*Gramineae* (禾本科)

*Maydeae* (玉蜀黍族)

Genus *Zea* (玉蜀黍属)

*Zea mays* L (玉米种)

*ssp. mays* (栽培玉米亚种)

大量研究表明，玉米很可能于 7,000 到 10,000 年前在墨西哥南部开始驯化。玉米公认的起源尚有争议，但墨西哥类蜀黍很可能在玉米的遗传背景中起了重要作用。玉米在 100 多个国家有商业化种植。主要的玉米生产国是美国、中国、巴西、墨西哥、法国和印度，占全世界玉米总产量的 75%。种植玉米主要是为了收获玉米籽粒，大多数用作动物饲料，也有相当大部分用于食品、制药和工业产品等加工领域。

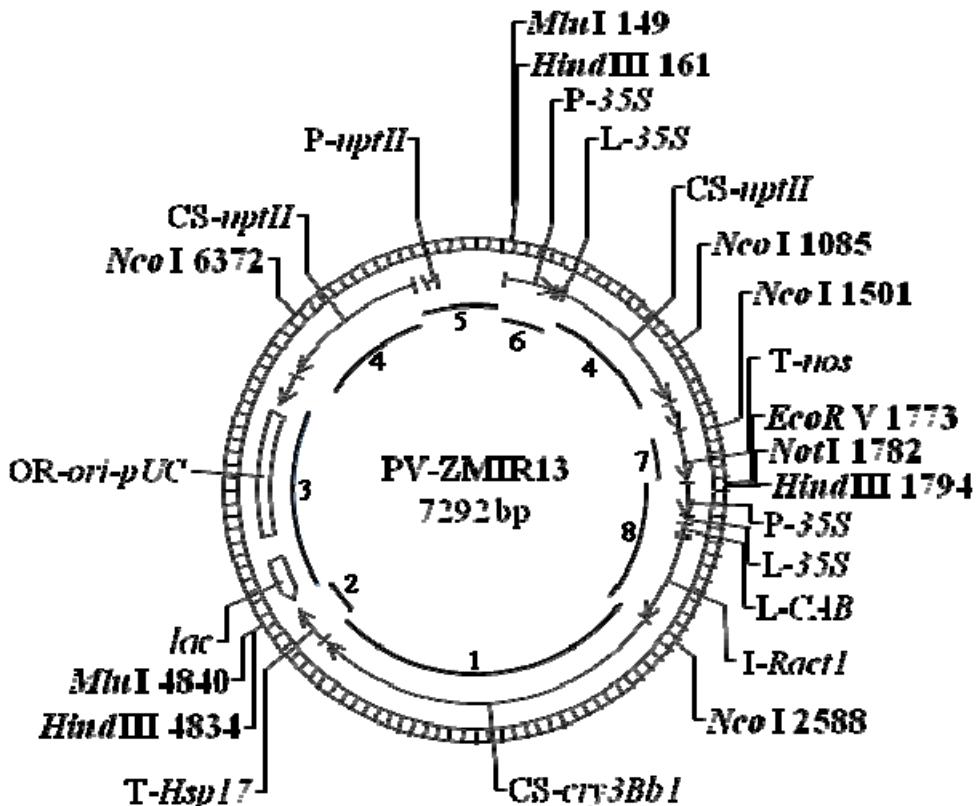
玉米引入中国的确切时间尚无定论，公元 1511 年的《颍州志》中可找到有关玉米的记载。玉米在中国分布很广，南起海南岛，北到北纬 50° 的黑龙江，东起台湾及沿海各省，西到新疆、青藏高原，都有玉米栽培。东北及西南高寒山区为春播玉米，黄淮海流域为夏播玉米，在广西、海南等省可一年两季种植。根据各地气候条件、生产条件和种植制度，从东北到西南的狭长区域内，形成了中国玉米的主要种植区，即北方春播玉米区、黄淮海夏播玉米区、西南山地玉米区、南方丘陵玉米区、西北灌溉玉米区、青藏高原玉米区。

玉米是一种植株高大粗壮、雌雄同株的一年生自花受粉植物，主要依靠风媒传粉，生存和生殖受到低温条件的限制，其生育期的长短取决于品种特性和生长环境。由于含有较多的遗传位点，玉米通过自交和回交可以稳定遗传。玉米在某些农田和路边以再生植物出现，但如果不行栽培则不能成长结实 (Gould, 1968)，没有明显的杂草化倾向。

玉米已有广泛种植和长期安全使用的历史，玉米及其产品没有对人类健康或环境产生不良影响的记载。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，玉米作为受体植物的安全等级为 I。

#### 四、基因操作

借助于基因枪法，将含有 *cry3Bb1* 基因的表达盒导入玉米受体自交系 Hi-II 中，同时导入的还有一个用于转化体筛选的选择标记，*nptII* 基因。经过连续世代的选择，最终得到 MON 863。转化质粒上各遗传元件如下图所示：



PV-ZMIR13 环形质粒图谱

通过 PCR、Southern 杂交等分子生物学分析，证明了插入表达盒的完整性，以及插入为单一位点的单拷贝插入，并且证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。而质粒中其余部分（质粒骨架）并未整合到植物基因组内。外源 DNA 插入玉米基因组时也没有发生植物遗传物质的删除。

如上所述，MON 863 开发所用基因操作使受体生物表现型发生改变但不影响人类健康或环境条件，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划分标准，应当归于类型 2，即“不影响受体生物安全性的基因操作”。

#### 五、遗传稳定性

从玉米转化事件 MON 863 的育种谱系中选取多个世代进行 Southern 杂交分析。结果表明，育种谱系上 8 个世代（A1F1、A1BC1F1、A1BC2F2、A634F2a、A634F3、A1F2、A1BC2F1 及 LH82×A634F3）均表现出一致的 Southern 杂交带型。基于此证据，推论外源 DNA 稳定地整合在抗虫玉米 MON 863 的基因组中。

对 MON 863 育种谱系中 5 个世代的分离数据进行卡方分析 ( $\chi^2$ ) 以确认插入

的数目以及目标性状分离的稳定性，用 ELISA 分析判断子代性状。分析结果支持 MON 863 中外源 DNA 为单一位点的插入，其抗虫性状依据孟德尔法则遗传给子代。

## 六、环境安全评价

**生存竞争能力：**应农业部要求，中国农业科学院植物保护研究所和山东省农业科学院植物保护研究所分别对 MON 863 转基因玉米进行了生存竞争能力部分的环境安全检测。

中国农业科学院植物保护研究所于 2003 年 6 月-10 月在位于河北省廊坊市广阳区的试验基地开展了 MON 863 转基因玉米的生存竞争能力检测。荒地条件下的调查结果表明，无论是撒播还是 5 cm 深播，MON 863 与其非转基因对照田的杂草种类和没有显著差异，以马齿苋为优势杂草。栽培地条件下的调查结果表明，MON 863 及其亲本对照玉米在株型、生育期等方面无差异，非转基因对照的株高稍高于 MON 863 (284.77 vs. 267.03 cm)，但在平均穗重、每穗粒行数和穗粒数上两者差异均不显著。

山东省农业科学院植物保护研究所于 2003 年 6 月-12 月在济南黄河大坝、植保所温室开展了 MON 863 转基因玉米的生存竞争能力检测。荒地条件下的调查结果表明，大坝优势杂草总体上看来数量较少，但覆盖度较高，深播、撒揪及对照区杂草种类基本相同。5 cm 深播条件下，MON 863 及其亲本对照种子均具有 85% 以上的出苗率；撒播条件下，出苗率均低于 10%。MON 863 及其亲本对照在长势、株型、生育期等方面无差异，杂草覆盖度大小和增幅基本一致。栽培地条件下的调查结果表明，MON 863 及其亲本对照玉米在长势、株型、生育期等方面无差异，栽培地 MON 863 及其亲本对照株高分别为 199.0 cm 和 197.9 cm，两者株高相当，稍低于当地对照品种鲁玉 10 号 (203.6 cm)。此外，栽培地 MON 863 及其亲本对照的产量分别为 3.29 kg 和 3.26 kg，两者之间差异不显著，稍高于鲁玉 10 号 (3.24 kg)。

**基因漂移：**在自然生态条件下，有些栽培植物会和周围生长的近缘野生种发生天然杂交，从而将栽培植物中的基因转入近缘野生种中。玉米是典型的风媒授粉植物，但由于花粉直径较大 (~0.1 mm)，这种大颗粒的迅速沉降特性影响了玉米花粉的传播。而由于玉米雌雄异花，所以昆虫传粉对玉米的可能性很小，也就限制了玉米花粉随昆虫远距离传播的可能。

为检测转基因玉米花粉可能向栽培种的飘移而造成基因流散的风险，山东省农业科学院植物保护研究所和吉林省农业科学院分别于 2002 年和 2003 年利用 3 个转基因玉米品种进行了基因流散风险评估。多年多点的检测结果表明，在距转基因玉米田 5 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经大大降低，约为 0.24%~13.19%；到 60 m 处，转基因玉米花粉的飘移率已经低至 0.08%~1%。除了风力和风速外，玉米异交率还受花期株高、花粉量、花粉活力、降水、温度、湿度和传粉昆虫等多种因素的影响。

目前已知只有少数植物种类能与玉米杂交，且均属美洲大陆特种类，如分布在

墨西哥和危地马拉某些地区的墨西哥类蜀黍 (*Zea mays* ssp. *mexicana* Schrad.) 和大刍草。据文献报道，在中国目前还没有发现能与玉米异交的近缘种，所以转基因玉米通过花粉向近缘种扩散的可能性小。同时，严格按照通用普通玉米制种田常规隔离距离 300 m 进行管理，转基因玉米基因流散的风险完全能够减少到可忽略不计。

**生物多样性：**转基因抗虫玉米MON 863的靶标生物主要是玉米根虫，这类害虫仅分布于北纬度，我国尚未发现此类害虫。孟山都公司2000~2001年在北美进行了为期两年的田间试验，调查了测试和对照材料的表型特征、非靶标无脊椎动物种群（节肢动物、蚯蚓和土壤微生物）的稳定性和丰度，以及病害的发生情况，涵盖16目36科昆虫在内的156,572种生物。调查结果显示，与对照相比，表达Cry3Bb1蛋白的MON 863玉米对包括有益昆虫、寄生蜂和分解生物（食腐质生物）在内的非靶标生物的相对丰度没有不利影响。并且，MON 863的叶甲类害虫群体更少。

中国农业科学院植物保护研究所的田间检测结果表明，MON 863 对天敌总量、对捕食性天敌小花蝽、蜘蛛和蓟马的种群数量的影响，与非转基因对照之间没有显著差异。

对生物多样性影响的检测中，除蚜虫外，转基因玉米田和其亲本对照田中各物种包括害虫及其天敌的种群数量无显著差别，说明转基因玉米MON 863对玉米田生物群落没有明显的影响。

综合多年多点田间试验观察结果，可以认为除抗虫性状外，MON 863与其对照之间对环境的影响没有差异，并且与传统杀虫剂控制计划（特别是土壤和叶面施用）相比，由于对靶标作物的特异性，MON 863给生态环境中其它生物带来的风险程度相对更低。

## 七、食用安全评价

**营养学评价：**对在美国多年多点田间试验中收获的玉米籽粒和秸秆的营养成分进行了分析，结果表明 MON 863 抗虫玉米品系的主要成分与对照品系实质等同，并且在已发表的文献报导的数值范围之内。对玉米籽粒的成分分析指标包括蛋白质、脂肪、灰分、粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、碳水化合物、热量和水分。还分析了氨基酸、脂肪酸、钙质、磷、生育酚（维生素 E）等成分。这些分析证明 MON 863 品系的营养成分和对照品系以及其他商品玉米的营养成分实质相等。

另对 MON 88017 粒中已知的玉米抗营养因子胰蛋白酶抑制剂含量进行了测量，并与常规玉米进行对比。没有观察到统计学显著差异。因此，可断定 MON 88017 中抗营养因子的含量与非转基因玉米对照是实质等同的。

**毒理学评价：**苏云金杆菌 (*B.t.*) 的 Cry 蛋白具有长期安全、广泛使用的历史。MON 863 产生的 Cry3Bb1 蛋白是 Cry3Bb 蛋白家族的一个成员，与已经商业化应用的微生物叶面喷施产品 Raven 生物杀虫剂内含有的野生型 Cry3Bb1 蛋白质相比，在氨基酸序列和性质上有>98%的相似性。此外，还针对 MON 863 进行过的广泛的生物学危害评估，包括几个 Cry3Bb1 蛋白变体的试验、调查它们对鸟类、

鱼类和陆地上非靶标昆虫等代表性物种的影响、估测其在土壤中分解代谢的时间以及评估其对濒危物种和土壤微生物的影响，确定 MON 863 产生的 Cry3Bb1 蛋白质不会对非靶标生物和环境产生有害的影响。在确定植物来源和大肠杆菌来源 Cry3Bb1 的等效性基础上，用最大剂量的纯化 Cry3Bb1 蛋白饲喂小鼠，急性口服试验中，大肠杆菌产生的 Cry3Bb1 变体蛋白以 400、1100 或 3200 mg/kg 体重的量喂食雌雄小鼠后无不良反应。因此，大肠杆菌产生的 Cry3Bb1 蛋白通过小鼠急性口服毒性实验得到的无可观察效应水平值（NOEL）至少为 3200 mg/kg，该数值是试验的最高检测剂量。

此外，受农业部的委托，中国疾病预防控制中心营养与食品安全所在孟山都提交国外安全性研究资料基础上，于 2003 年利用 Spargue-Dwaley 大鼠进行 90 天的全食品喂养试验，旨在进一步评价 MON 863 转基因玉米对哺乳动物的潜在毒性和食用安全性。试验共分为 3 组，每组 40 只大鼠（雌雄各半，体重约 60-80 g），分别喂饲含有 MON 863 转基因玉米、常规对照玉米和普通市售玉米的饲料，饲料中玉米含量为 50%。在 90 天的活体试验期间，分别观察 MON 863 对动物的一般情况、体重、食物利用率、血液学指标、脏器重量（脏体比）和组织病理学等的影响。

结果发现，动物活动、生长均未见异常，被毛浓密有光泽。MON 863 组雌雄大鼠体重和食物利用率与亲本玉米组以及市售玉米组比较无显著性差异 ( $p>0.05$ )。血液学检测发现，MON 863 玉米组雌性大鼠血小板读数和白细胞分类百分比与市售玉米组比较有显著性差异，但与亲本玉米组无显著性差异。血生化检测发现，MON 863 玉米雄性大鼠的胆固醇（45 天）显著高于市售玉米组，总蛋白和白蛋白（90 天）显著低于市售玉米组，但上述指标均与亲本玉米组无显著性差异；虽然 MON 863 玉米组的白蛋白和谷丙转氨酶（45 天）显著高于亲本玉米组，但所有测定指标均在检测单位历史检测值参考范围之内，故无生物学单方。而且各试验组末期脏体比无显著性差异；病理学检查也均未见由 MON 863 玉米引起的异常改变。可以帮助认为 MON 863 玉米不会对大鼠体重、食物利用率、血液学、血生化、脏体比和病理组织产生不良作用。

**致敏性评价：**Cry3Bb1 蛋白是从苏云金杆菌 *kumamotoensis* 亚种 EG4691 中分离出的野生型 Cry3Bb1 蛋白变体。自 1958 年以来，苏云金杆菌一直被商业化用于微生物杀虫剂（EPA，1988），目前尚无报道表明人类对苏云金杆菌及其产品发生过敏事件。

还通过生物信息学方法，将 Cry3Bb1 蛋白与已知过敏原数据库进行搜寻比对，未发现有任何与其相同氨基酸序列和特性的已知过敏原。此外，体外消化实验表明，Cry3Bb1 蛋白在模拟胃肠液和模拟肠液条件下被快速消化降解，不具备致敏条件。

**抗生素抗性：**MON 863 使用 *nptII* 编码序列用作选择标记。*nptII* 基因分离自大肠杆菌的非毒性菌株 K12，可编码合成 264 个氨基酸的新霉素磷酸转移酶 II (NPTII) 蛋白，在转化时用于抗生素抗性标记。大肠杆菌 K12 菌株广泛存在于我们的生存环境中，包括人类消化道中，一般认为没有必要对该细菌来源的 NPTII 蛋白进行额外

的分析或者毒理学试验。该表达载体不认为具有致病性，也不可能演变为具有致病性的载体，对人类和动物安全。

此外，由于 *nptII* 基因已广泛用于西红柿、棉花和油菜等转基因植物的生产中，美国 FDA 已对 NPTII 蛋白进行了全面的安全性评价。NPT 蛋白在胃酸中可被迅速灭活，并被消化酶降解，在转基因植物中的表达形式未被糖基化，且对热不稳定，因此不具备已知致敏原的特征。小鼠急性经口毒性试验表明，纯化的 NPTII 蛋白的最大予量不会引起任何毒性反应，其 NOEL>5000 mg/kg。因此 FDA 认为，食用 NPTII 蛋白不会引起任何毒性和过敏反应。此外，NPTII 蛋白在 MON 863 玉米中的表达量极低（低于检测限）。

综合受体植物（玉米）、基因供体（苏云金芽孢杆菌）、转基因操作（基因枪法）以及转基因玉米新表达蛋白（Cry3Bb1）的毒性、致敏性、全食品动物喂养试验等多方面资料进行综合分析，可认为，抗虫玉米 MON 863 并未因导入 *cry3Bb1* 基因而增加食用风险，其加工产品与其亲本玉米和普通市售玉米之间不存在生物学和营养学上的显著差异，对人类和动物不会有亚慢性毒性和营养方面的不良影响。

## 八、非预期效应

MON 863 于 2002 年在美国首先获得美国农业部（USDA）、美国食品与药品管理局（FDA）的相关批准允许上市，随即获得美国环保署（EPA）关于商业化种植的许可，后又在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。自商业化应用以来，并没有发现 MON 863 玉米对环境或食用饲用安全产生不良影响的报道。MON 863 在产地国种植或作为食用/饲用进口过程中未发现对人类健康和环境产生不利影响，未发现非预期效应。

## 九、生产应用前景及拟采取的安全监控措施

从种植面积和净产值来看玉米是美国第一大作物。在美国玉米产量和谷物质量都受到虫害引发的减产的巨大影响（James，2003 年）。孟山都公司应用基因枪转化法将来源于苏云金杆菌的 *cry3Bb1* 基因和选择性标记基因 *nptII* 转入常规玉米基因组中得到抗虫玉米 MON 863。MON 863 于 2002 年在美国首先获得 FDA 和 USDA 的商业化批准，随即在加拿大、日本、韩国和墨西哥等地获得食用和饲用安全的进口批准。

孟山都公司在中国申请抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 安全证书的目的是进口用作加工原料，主要作为饲料或其它加工产品，并不用于种植目的。作为转基因技术研发商，孟山都公司进口安全证书的使用上，始终严格按照相应的法律法规以及农业部批准的安全证书的要求，使用和管理农业转基因生物安全证书。并明确要求贸易商清楚了解批准的安全证书应用范围和有效期，要求贸易商在有效期内向孟山都公司申请相关转基因材料进口安全证书的复印件，并要求贸易商采取措施，确保按照安全证书批复要求来使用安全证书复印件，不得改变进口用途，不得从未批准相关转基因作物种植的输出国出口相关玉米产品到中国等，从

而对从事相关转基因材料的进口、生产加工和经营活动的企业进行监控，以防止任何不利影响的发生。

## 十、结论

大量的环境和食用安全性评价结果证实，MON 863 中表达的 Cry3Bb1 蛋白对靶标害虫具有高度的特异性，对人类和哺乳动物无害。MON 863 玉米也不会对环境造成不利影响。

## 9. 该类转基因植物国内外生产应用概况

90年代中期，美国首次批准转基因植物大面积种植，从而揭开了转基因植物商业化应用飞速发展的序幕。目前应用最为广泛的转基因性状是耐除草剂和抗虫作物，主要转基因作物有大豆、玉米、棉花和油菜。

根据国际农业生物工程应用技术采购管理局的资料显示，2002年全球转基因作物种植面积已达5870万公顷，比上年增加610万公顷，增长11.6%。以2002年为例，全球大豆、玉米、棉花和油菜转基因作物的种植面积分别为3650万公顷、1240万公顷、680万公顷和300万公顷，各占转基因作物总面积的62.2%、21.1%、11.6%和5.1%。与2001年相比，转基因油菜面积增加30万公顷，增长11.1%。从2002年全球四种主要转基因作物面积占当年该作物种植总面积的比例来看，以大豆最高，占51%，比2001年提高了5个百分点；棉花次之，占20%；油菜第三，占12%，比2001年增加了1个百分点；玉米占9%，比2001年提高了2个百分点。在1996至2002年间，全球转基因作物种植面积从170万公顷迅速扩大到5870万公顷，7年间增长了35倍。

在全球转基因作物面积迅速扩大的同时，种植转基因作物的国家也在不断增多。2002年全球有16个国家的550万—600万农民种植转基因作物，而2001年和1996年分别只有13个和6个国家种植转基因作物。2002年转基因作物种植面达百万公顷以上的国家共有4个，依次为美国3900万公顷，占全球转基因作物总面积的66.4%；阿根廷1350万公顷，占23.0%；加拿大350万公顷，占6.0%；中国210万公顷，占3.6%。这四个国家的转基因作物面积占全球转基因作物总面积的99%，另外12个国家（南非、澳大利亚、印度、罗马尼亚、西班牙、乌拉圭、墨西哥、保加利亚、印度尼西亚、哥伦比亚、洪都拉斯、法国）的转基因作物面积之和仅占全球转基因作物总面积的1%。

2002年共有9个发展中国家种植转基因作物，总面积达1600万公顷，约占全球转基因作物总面积的27%。1997年以来，发展中国家转基因作物面积占全球转基因作物总面积的比例一直呈上升趋势，其中1997年为14%，1998年为16%，1999年为18%，2000年为24%，2001年为26%，2002年为27%。

2002年3月，孟山都公司按照中华人民共和国农业部的有关法规要求，向农业部转基因安全管理办公室提交了《转cry3Bb1基因抗虫玉米MON863进口用作加工原料的安全证书》申请，并在中国境内由农业部指定检测机构进行了环境安全以及食用安全检测，没有发现安全问题。

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

本申请书为获得 MON 863 进口用作加工原料的安全证书，不会在中国境内种植。

如果能够获得 MON 863 的进口安全证书，孟山都公司会按照相关的法律法规和农业部批准的安全证书上的要求严格使用和管理安全证书，并明确要求贸易商清楚了解批准的安全证书应用范围和有效期，要求贸易商在有效期内向孟山都公司申请 MON 863 进口安全证书的复印件。孟山都公司对贸易商在安全证书使用上要求将包括：

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

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

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

- A. 遵守相关法律法规：**在 MON 863 向中国进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中的要求和条件。
- B. 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。

### C. 运输环节：

- a) 产地国内陆运输：要求使用专门的运输工具用以装载转基因产品。对运输工具在使用前将进行充分地清洗，以避免其它转基因生物的污染。
- b) 出口终端：对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其它转基因生物的污染。在确认其出口装船之前，将接受出口国相关部门的检验。
- c) 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。
- d) 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。
- e) 卸货：当船只到达中国口岸时，要求中国进口商严格执行中国农业部所制定的转基因安全管理条例，避免在港口卸货和中转中，有转基因产品流入农业生产领域，确保中国的农业生物安全。将督促国内收货人，对其用于进口转基因产品的包装物和运输工具进行必要的清洗和标识。将要求国内收货人和中国有关港务部门，将进口转基因产品与在港的其它农产品分开存放，以确保不发生可能的污染。

### 11. 审查所需的其它相关资料

孟山都公司利用基因枪法将 *cry3Bb1* 基因转入玉米植物基因组 DNA 中，开发了抗玉米根虫为害的玉米品系 MON 863。MON 863 可以表达经修饰的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 亚种 *kumamotoensis*, *B.t.*) 来源 Cry3Bb1 蛋白，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。

在抗虫玉米 MON 863 上市之前，孟山都公司按照包括美国农业部动植物检疫局和美国食品与药品管理局在内的美国法规监管机构的有关法规要求对 MON 863 进行了大量的安全性检测，其中环境安全评价涵盖了对环境的影响、杂草化潜势、对非靶标生物的影响、遗传物质转移、生存竞争能力、适应性等，食用及饲用安全评价包括转入基因的分子生物特性分析、蛋白毒性及致敏性评价、营养成份的分析比较、毒理试验等，试验结果表明，MON 863 在环境安全、营养组成、食品安全等方面和其亲本 Hi-II 及常规玉米品种没有区别。为便于审阅，特将所有研究报告附在申请书正文之后。

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

**1. 美国食品与药物管理局批件  
(US-FDA, 2001 年 12 月, 食用)**



## DEPARTMENT OF HEALTH &amp; HUMAN SERVICES

Public Health Service

Food and Drug Administration  
Washington, DC 20204

December 31, 2001

Dennis P. Ward, Ph.D.  
Monsanto Company  
800 North Lindbergh Boulevard  
St. Louis, Missouri 63167

Dear Dr. Ward:

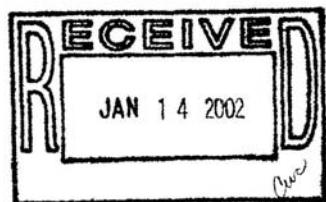
This is in regard to Monsanto's consultation with the Food and Drug Administration (FDA) (Center for Veterinary Medicine and Center of Food Safety and Applied Nutrition) on its genetically modified corn, line MON 863. According to Monsanto, this new line has been modified to express two new proteins, a modified Cry3Bb and NptII. The modified Cry3Bb protein confers resistance to Coleopteran insects, including corn rootworm. The NptII protein confers resistance to aminoglycoside antibiotics and was used as a selectable marker in the development of the MON 863 corn line. All materials relevant to this notification have been placed in a file designated BNF 0075. This file will be maintained in the Office of Food Additive Safety.

As part of bringing the consultation regarding this product to closure, Monsanto submitted a summary of its safety and nutritional assessment of the genetically modified corn on September 25, 2000. This communication informed the FDA of the steps taken by Monsanto to ensure that this product complies with the legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment Monsanto has conducted, it is our understanding that Monsanto has concluded that the corn derived from these new varieties is not materially different in composition, safety, and other relevant parameters from corn currently on the market and that the genetically modified corn does not raise issues that would require premarket review or approval by FDA.

Because the Environmental Protection Agency (EPA) regulates pesticidal substances and pesticidal inert ingredients, FDA has not evaluated the information related to the safety of the modified Cry3Bb1 and NptII proteins. It is Monsanto's responsibility to obtain all appropriate clearances, including those from EPA and the United States Department of Agriculture, before marketing food or feed derived from corn line MON 863.



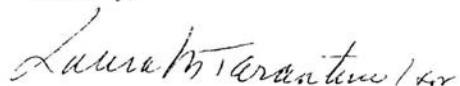
AA054817



Page 2- Dennis P. Ward, Ph.D.

Based on the information Monsanto has presented to FDA, we have no further questions concerning corn from line MON 863 at this time. However, as you are aware, it is Monsanto's continued responsibility to ensure that foods marketed by the firm are safe, wholesome, and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely,



Alan M. Rulis, Ph.D.  
Director  
Office of Food Additive Safety  
Center for Food Safety  
and Applied Nutrition

人类健康服务部

公众健康服务

食品与药物管理局

华盛顿 DC 20204

2001 年 12 月 31 日

Dennis P. Ward 博士  
孟山都公司  
800 North Lindbergh Boulevard  
St.L, Missouri 63167

亲爱的 Ward 博士：

就孟山都公司的转基因玉米品系 MON 863 向食品与药物管理局 (FDA) (兽医中心和食品安全与应用营养学中心) 所作的咨询，现予以回复。根据孟山都公司提交的资料，这一新的玉米品系经基因工程改造后表达两个新蛋白，一个修饰过 Cry3Bb1 蛋白和一个 NPTII 蛋白。经过修饰的 Cry3Bb1 蛋白能够抵御包括玉米根虫在内的鞘翅目害虫。NPTII 蛋白具有新霉素抗性，在 MON 863 玉米品系研发过程中作为选择性标记。所有与本公告相关的材料都被存放于编号为 BNF0075 的文件中。该文件保存于食品添加剂安全办公室。

为了使关于本产品的咨询结束，孟山都公司于 2000 年 9 月 25 日提交了该转基因玉米品系安全性和营养分析的总结。该举动是为了通知 FDA 孟山都公司为了保证该产品遵守 FDA 相关的法律、法规要求所采取的步骤。基于孟山都公司开展的安全性和营养分析结果，我们认同孟山都公司得出的来源于该转基因玉米品系的玉米与目前市场上的玉米在成分、安全性和其他相关参数上没有本质性差异和该转基因玉米品系不存在任何问题需要 FDA 进行市场准入前审查或批准的结论。

由于环保署监管杀虫剂物质和杀虫剂和杀虫剂助剂成分，FDA 还没有评价与修饰的 Cry3Bb1 蛋白和 NPTII 蛋白安全性相关的信息。在将来源于玉米品系 MON 863 的食品与饲料投放市场前，孟山都公司有责任获得包括环保署和农业部在内的所有必需审批。

根据孟山都公司提交的材料，我们对于 MON810 转基因玉米用于食用和饲料生产的安全性没有疑问。但是孟山都公司有责任来保证此产品在市场上是安全的，有益健康的并遵循其他相关的法律与法规。

您诚挚的  
Alan M. Rulis 博士  
主任  
食品添加剂安全办公室  
食品安全与应用营养中心

**2. 美国农业部动植物检疫局批件**  
(USDA-APHIS, 2002 年 10 月, 饲用与环境)



United States  
Department of  
Agriculture

Marketing and  
Regulatory  
Programs  
  
Animal and  
Plant Health  
Inspection  
Service

4700 River Road  
Riverdale, MD 20737

Dr. Dennis Ward  
Regulatory Affairs Manager  
Monsanto Company  
700 Chesterfield Parkway  
St. Louis, MO 63198

Dear Dr. Ward:

Your petition number 01-137-01p for a determination of nonregulated status corn rootworm protected corn event MON 863 has been approved. Enclosed are signed copies of the Environmental Assessment (EA) and Finding of No Significant Impact with the attached response to comments on the EA and petition, and the determination statement. Should you have any questions about these documents, please contact Ms. Kay Peterson at Area Code (301) 734-4885.

APHIS must be notified within five days in writing if any information comes to the applicant's attention that differs substantially from what was described in the petition and our environmental analysis.

A notice advising the public of our determination that the transformed line and its progeny are no longer considered regulated articles under 7 CFR 340 has been prepared for publication in the *Federal Register*. You will be advised of the publication date when it becomes available.

Sincerely,

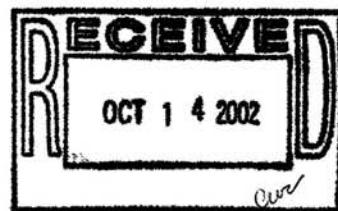
Cindy Smith  
Acting Deputy Administrator  
Biotechnology Regulatory Services

Enclosures



AA061483

01-CR-0504



APHIS - Protecting American Agriculture  
An Equal Opportunity Employer

**美国农业部**

市场营销与法规项目  
动植物检疫局  
4700 River Road  
Riverdale, MD 20737

2002 年 10 月 8 日

Dennis Ward 博士  
法规事务经理  
孟山都公司  
700 Chesterfield Parkway  
St.Louis, MO 63198

亲爱的 Ward 博士：

贵公司编号为 01-137-01p 的关于抗根虫玉米转化事件 MON 863 取消监管状态的申请已经被批准。另附签字的环境评价（EA）和附有对 EA 和本申请意见的回复及决议的“无显著影响的发现”。如对本文件有任何疑问，请与 Kay Peterson 小姐联系，电话号码为（301） 734-4885。

如申请人得到任何与申请和我们环境分析中描述的情况存在显著不同的信息，动植物检疫局必须在 5 天内得到通知。

我们决定该转基因品系及其后代不再是受制于 7 CFR 340 的受监管产品的通知将发布在 “*Federal Register*” 上，通知准备好后我们会告知您发布时间。

您诚挚的

Cindy Smith

代理副处长

生物技术法规处

**3. 美国环保署批件**  
(US-EPA, 2003 年 2 月, 种植)



U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY  
Office of Pesticide Programs  
Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511C)  
1200 Pennsylvania Avenue NW  
Washington, DC 20460

EPA Reg Number:  
**524-528** Date of Issuance:  
**FEB 24 2003**

**NOTICE OF PESTICIDE:**

- Registration  
 Reregistration  
(under FIFRA, as amended)

Term of Issuance: Conditional  
Name of Pesticide Product:  
**Corn Event MON863**

Name and Address of Registrant (include ZIP Code):

Monsanto Company  
700 Chesterfield Parkway West  
St. Louis, MO 63017



**AA061690**

**Note:** Changes in labeling differing in substance from that accepted in connection with this registration must be submitted to and accepted by the Biopesticides and Pollution Prevention Division prior to use of the label in commerce. In any correspondence on this product always refer to the above EPA registration number.

On the basis of information furnished by the registrant, the above named pesticide is hereby registered/reregistered under the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act.

Registration is in no way to be construed as an endorsement or recommendation of this product by the Agency. In order to protect health and the environment, the Administrator, on her motion, may at any time suspend or cancel the registration of a pesticide in accordance with the Act. The acceptance of any name in connection with the registration of a product under this Act is not to be construed as giving the registrant a right to exclusive use of the name or to its use if it has been covered by others.

The registration application referred to above, submitted in connection with registration under § 3(c)(7)(C) of the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, as amended, is acceptable provided that you implement the following terms and conditions.

- 1) The subject registration will automatically expire on midnight May 1, 2004. The registration must expire on this date because this is the date of expiration of the tolerance exemption under 40 CFR 180.1214. When and if the Agency registers this product, it is our understanding that Monsanto intends to submit in the near future an amendment application to modify the expiration date and a petition to amend the tolerance exemption under 40 CFR 180.1214 so that its expiration date is removed. Based on the Agency's review of the data submitted and cited in support of this application, and provided that the Agency finalizes a rule which amends 40 CFR 180.1214 so that its expiration date is removed; the Agency anticipates at this time that an expiration date three years from the initial date of registration for this product would be appropriate.
- 2) The subject registration will be limited to *Bacillus thuringiensis Cry3Bb1 Protein* and the Genetic Material Necessary for its Production (Vector ZMIR13L) in Event MON863 Corn use in field corn.
- 3) Submit/cite all data required for registration of your product under FIFRA § 3(c)(5) when the Agency requires registrants of similar products to submit such data.

Signature of Approving Official:

*[Signature]* See last page

Date:

**FEB 24 2003**

EPA Form 8570-6

美国环保署 (EPA) 杀虫剂项目办公室 生物杀虫剂与污染防治处 (7511C) 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC. 20460	EPA 登记号:	签发日期:
	<b>524-528</b>	2003 年 2 月 24 日
	签发类别: 有条件	
<b>杀虫剂登记公告</b> <u><input checked="" type="checkbox"/> 登记</u> <u><input type="checkbox"/> 续登记</u>	杀虫剂产品名称: <b>玉米转化事件 MON 863</b>	
登记人名称与地址 (包括邮政编码): 孟山都公司 700 Chesterfield Parkway West St. Louis, MO 63017		
注意: 与本登记有关的任何标签内容的改变必须提出申请, 经生物杀虫剂和污染预防处批准后方可商业化应用, 任何与本登记有关内容请查阅上述环保局登记号。		
<ul style="list-style-type: none"> <li>上述农药产品在登记人提供信息的基础上依据《联邦杀虫剂、杀菌剂、灭鼠剂法案》获得登记。</li> <li>产品获得登记在任何情况下都不能解释为是环保局对该产品的认可或推荐。为了保护健康和环境, 管理机构可以在任何时候按照法案延缓或取消农药产品的登记。环保局依据法案接受与一个登记产品有关的任何名称不能解释为登记者获得专用该名称或在该名称已被其他登记者涵盖的情况下使用该名称的权利。</li> </ul>		
上述依照《联邦杀虫剂、杀菌剂、灭鼠剂修改法案》第 3(c)(7)(C)款进行的产品登记, 需满足下列条款和条件才能被接收:		
(1) 本登记将于 2004 年 5 月 1 日午夜自动失效, 该失效时期根据 40 CFR 180.1214 中规定的豁免容许时间确定。一旦环保署对该产品的登记生效, 我们认为孟山都将于近期内提交为以延续有效日期的修订申请, 并在 40 CFR 180.1214 规定范围内提请修改豁免容许时间。基于环保署对所提交和引用来支持该申请的相关数据进行审核并完成对 40 CFR 180.1214 修订的前提, 可免去失效时间的限定。此时, 环保署预期为该产品允许自生效之日起 3 年有效时间有合适的。		
(2) 本登记仅限于玉米转化事件 MON 863 及其衍生产品中所包含的苏云金芽孢杆菌 Cry3Bb1 蛋白及其必要的遗传物质 (载体 ZMIR13L) 在玉米田中的应用。		
(3) 当本署要求所有相似产品的登记者提交数据时, 根据 FIFRA3(C)(5)提交/引用登记你公司产品所需所有数据。		
批准人签名 生物杀虫剂和污染防治处 (7511C)	日期 2003 年 2 月 24 日	

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

针对 MON 863 的安全性，孟山都公司根据法规要求做了详细的分子特征、蛋白特性、食用/饲用安全及环境安全评估，具体技术报告目录如下（以下所列所有技术报告见本申请书下册）：

- 报告 1 转 *cry3Bb1* 基因“抗虫”玉米 MON 863 生态风险评估报告（中国农业科学院植物保护研究所）
- 报告 2 MON 863 玉米食用安全性评价报告（中国疾病预防控制中心营养与食品安全所）
- 报告 3 转 *cry3Bb1* 基因 MON 863 抗虫玉米及其产品食用安全性评价报告（中国疾病预防控制中心营养与食品安全所）
- 报告 4 玉米 MON 863 的分子生物学分析（孟山都研究报告，MSL-17152）
- 报告 5 抗食根虫玉米 MON 863 中插入 DNA 的序列确定及 PCR 分析（孟山都研究报告，MSL-17108）
- 报告 6 抗根虫玉米 MON 863 多世代间遗传稳定性的分子生物学分析（孟山都研究报告，MSL-17063）
- 报告 7 来自 1999 试验田种植的 MON 863 玉米样品组织中 B.t. Cry3Bb1.11098 和 NPTII 蛋白水平（孟山都研究报告，MSL-17181）
- 报告 8 1999 年美国田间试验中收集的抗玉米根虫玉米 MON 863 的秸秆和籽粒的成分分析（孟山都研究报告，MSL-17669）
- 报告 9 2000 年美国和加拿大田间试验中 MON 863 玉米农艺学比较（孟山都公司总结）
- 报告 10 2000-2001 年田间试验中对含有 MON 863 转化事件的抗根虫玉米杂交种进行的对非靶标生物生态评价（孟山都研究报告，MSL17531）
- 报告 11 大肠杆菌和 MON 863 产生的 Cry3Bb1 蛋白的特性和等同性分析
- 报告 12 SB-2001-085 研究[大肠杆菌产生的变异蛋白 Cry3Bb1 (LOT 6962478) 对小鼠的急性口服毒性研究]报告总结（孟山都研究报告，MSL-17382）
- 报告 13 利用过敏原、毒素和公共蛋白数据库对转基因玉米 MON863 产生的 Cry3Bb1 蛋白的生物信息学评价（孟山都研究报告，MSL-17140）
- 报告 14 从大肠杆菌和玉米转化事件 MON 863 中纯化的 Cry3Bb1 蛋白的体外消化性分析（孟山都研究报告，MSL17292）

- 报告 15 Cry3Bb1.11098 (Q349R) 蛋白在模拟肠道消化液中的离体消化性评价  
(孟山都研究报告, MSL-17530)
- 报告 16 MSL-16597 报告的修正: 经热处理后的转基因抗虫玉米 MON 863 和  
MON 853 品系的 Cry3Bb1.11098 和 Cry3Bb1.11231 蛋白的免疫检测 (孟  
山都研究报告, MSL-17223)
- 报告 17 以 *PUB-PEA* 泛素为内标, 对 1: 200 种子库的玉米 MON 863 的转化事  
件特异性 ENDPOINT TAQMAN PCR (BQ-QC-10602-01)
- 报告 18 推荐的用于保丰抗根虫玉米 MON 863 的实时定量 TAQMAN® PCR 步  
骤

## 七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

MON 863 是孟山都公司利用生物技术开发的抗玉米根虫为害的玉米品系。大量的安全性评价资料表明，除了抗根虫特性以外，MON 863 及其加工的食品和饲料与常规玉米同样安全和营养，与常规玉米相比 MON 863 不会增加转变为有害生物的潜在可能性，包括杂草化倾向或对环境有不良影响。得出这一结论所依据的证据包括：

- 1、插入 DNA 的详细分子特征鉴定结果表明：插入序列包括一个完整的 *cry3Bb1* 基因表达盒和一个完整的 *nptII* 基因表达盒，并且以单拷贝稳定地整合到玉米基因组的单一座位上，没有质粒骨架序列插入；
- 2、生物信息学、体外消化性、热稳定性、急性经口毒性、90 天大鼠喂养等分析均表明，MON 863 中表达的 Cry3Bb1 蛋白不具有毒性或过敏性风险；
- 3、组成成分和营养成分评价资料表明 MON 863 除了表达 Cry3Bb1 抗虫蛋白和极少量 NPTII 的蛋白，其它成分与常规玉米实质等同；
- 4、针对表型性状、农艺性状及与环境的相互作用的深入评价结果表明，与常规玉米相比 MON 863 不太可能增加转变为潜在的有害生物的风险；

根据《农业转基因生物安全管理条例》及其它相关法规的规定，同意上报该申请。

小组组长（签章）

年   月   日

## 八、本单位审查意见

MON 863 是孟山都公司利用生物技术开发的抗玉米根虫为害的玉米品系，能够表达经修饰的苏云金芽孢杆菌（*B.t.*）来源 Cry3Bb1 蛋白，对玉米根虫具有选择性毒杀特性。该转基因品系的衍生品种可以有效防止玉米根虫为害，其效果甚至比当前应用的合成杀虫剂更好。国内外大量的评价试验均已证实 MON 863 的食用安全性和环境安全性。

鉴于 MON 863 已经在美国获得商业化栽培批准，根据中国相关法律法规的要求，同意上报本申请书。

单位公章

负责人（签章）

年   月   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）