

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申报书

转 Bt 基因 *Cry1F* 抗虫玉米 TC1507 进口作为加工原料的
安全证书申请
(申请书正文)

杜邦中国集团有限公司

与

陶氏益农中国有限公司

2004 年 03 月

中华人民共和国农业部制

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申报书

项目名称: 转 Bt 基因 *Cry1F* 抗虫玉米 TC1507 进口作为加工原料的

安全证书申请

申请单位: 杜邦中国集团有限公司

陶氏益农中国有限公司

申请人:

地址: 北京朝阳区建国路 91 号金地中心 A 座 18 层

邮政编码: 100022

电话:

传真:

E-mail:

填报日期: 2004 年 03 月

中华人民共和国农业部制



先锋国际良种公司文件

Pioneer Hi-Bred International, Inc.

2004 先锋国际良种公司 版权所有

先锋国际良种公司向中华人民共和国农业部转基因行政主管部门提交本申请书只能用于本申请书的申请目的。先锋国际良种公司向相关部门递交本申请书，不代表先锋国际良种公司授权任何个体或实体对本申请书中所涉及知识产权的许可或使用。

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条例》等有关法规，了解相关要求。

2. 此申报书同样适用于法规规定的报告类实验研究和中间试验的报告，名称分别改为“农业转基因生物实验研究报告书”和“农业转基因生物中间试验报告书”。

3. 申报书内容应当包括以下部分：申请表、项目内容摘要、工作目的和意义、国内外研究的相关背景资料、安全性评价、试验方案、相关附件资料、本单位农业转基因生物安全小组审查意见、本单位审查意见、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见。

4. 申请实验研究的，申请表按表 2 填写，项目名称应包含转基因性状、受体生物名称、实验研究所在省（市、自治区）名称和实验研究阶段等内容，如“转基因抗虫棉花在河北省的实验研究”。一份申报书只能包含同一物种的受体生物和相同的转基因性状。“安全性评价”可不填写。“试验方案”包括研究目标、外源基因的名称和来源、载体构建图谱、转化方法和规模、地点、安全控制措施等。“相关附件资料”包括法人证书和营业执照的复印件，若涉及合作项目，应提交双方合作或转让协议等。“所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送实验研究所在省（市、自治区）的农业行政主管部门。

5. 申请中间试验的，申请表按表 2 填写。申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。“所在省（市、自治区）级农业行政主管部门的审查意见”可不填写，申报材料报送农业部时，抄送中间试验所在省（市、自治区）级农业行政主管部门。

6. 申请环境释放和生产性试验的，申请表按表 2 填写；申报书中“安全性评价”、“试验方案”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写。对于已批准过的环境释放或生产性试验，在试验结束后，若同一转基因生物在原批准地点以相同规模重复试验，在申报时“安全性评价”部分可省略。

7. 申请农业转基因生物安全证书的，申请表按表 3 填写；申报书中“安全性评价”和“相关附件资料”依照《农业转基因生物安全评价管理办法》附录 I、II、III 要求逐条填写，“试验方案”不用填写。

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

9. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。

10. 受理时间：每年 3 次，截止日期分别为 3 月 1 日、7 月 1 日和 11 月 1 日。

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

保密商业资料声明

本申请书中包含了杜邦公司和陶氏益农公司的保密商业资料。本申请书中的商业资料是杜邦公司和陶氏益农公司在投入巨大的人力、物力和财力基础上获得的，内容包括研究方案设计、遗传元件的序列信息、产品开发和育种过程、环境和食品安全性方面的研究数据等等。

杜邦公司和陶氏益农公司只向农业部转基因生物行政主管部门提交本申请书，以期通过对玉米 TC1507 的审批，获得该产品在中国境内进口用作加工原料的许可。杜邦公司和陶氏益农公司在国内外有很多竞争对手，竞争对手一旦获得这些资料会影响公司的商业计划并造成巨大的经济损失。因此，依据《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》等有关规定及本申请书的填写说明，杜邦公司和陶氏益农公司要求对本申请书标有“保密商业资料”的部分进行保密。

一、农业转基因生物安全证书申请表

项目概况	项目名称	转 Bt 基因 <i>CryIF</i> 抗虫玉米 TC1507 进口作为加工原料的安全证书申请						
	项目来源	杜邦中国集团有限公司 与 陶氏益农中国有限公司						
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 <input checked="" type="checkbox"/>)						
	转基因生物名称	转 Bt 基因 <i>CryIF</i> 抗虫玉米 TC1507						
	受体生物	中文名	玉米		学名	<i>Zea Mays</i> L.		
		分类学地位	禾本科玉蜀黍属	品种(品系)名称	33P66	安全等级	I	
	目的基因 1	名称	<i>CryIF</i>		供体生物	苏云金芽孢杆菌		
		生物学功能	对鳞翅目昆虫的毒性					
		启动子	Ubiquitin		终止子	ORF polyA		
	载体 1	PHP8999 质粒		供体生物	大肠杆菌 (<i>E.coli</i>)			
	* 标记基因 1	名称	<i>pat</i>		供体生物	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>		
		启动子	<i>CaMV35S</i>		终止子	<i>CaMV35S</i>		
	* 报告基因 1	名称	无		供体生物	无		
		启动子	无		终止子	无		
	调控序列 1	名称	无		来源	无		
		功能	无					
	转基因方法	基因枪			基因操作类型	2		
转基因生物品系(株系)名称	TC1507			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	不用填写					
		批准文号	不用填写					
		试验的时间、地点和规模	不用填写					
	环境释放情况	转基因生物名称及编号	不用填写					
		批准文号	不用填写					

		批准时间、地点和规模	不用填写			
生产性试验情况		转基因生物名称及编号	不用填写			
		批准文号	不用填写			
		批准时间、地点和规模	不用填写			
	拟申请使用范围（省、自治区、直辖市）		境内			
拟申请使用年限		3年				
申请单位概况	单位名称	杜邦中国集团有限公司 与 陶氏益农中国有限公司				
	邮 编					
	传 真					
	单位性质	境内单位（事业 <input type="checkbox"/> 企业 <input type="checkbox"/> 中外合作 <input type="checkbox"/> 中外合资 <input type="checkbox"/> 外方独资 <input type="checkbox"/> ） 境外单位（企业 <input checked="" type="checkbox"/> 其它 <input type="checkbox"/> ）(选√)				
	申请人姓名					
	传 真					
	联系人姓名					
	传 真					
研制单位概况	单位名称					
	联系人姓名					
	传 真					
	主 要 完 成 人					
	姓名					
	学历					
	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
			博士	科学家	先锋国际良种公司	遗传转化
		硕士	科学家	先锋国际良种公司	分子和蛋白分析	
		博士	科学家	先锋国际良种公司	人类健康与环境	

- 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

本项目中的转基因抗虫玉米 TC1507 是先锋公司利用 Mycogen 公司的转 *Cry1F* 基因玉米植株而得，*Cry1F* 基因来自 *Bacillus thuringiensis var. aizawai* 的 PS811 品系。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是一种常见的革兰氏阳性土壤微生物，它能产生一种对特定生物具有高度选择性的杀虫蛋白。对 *Bt* 蛋白已进行了数十年安全性试验证实，它对人类和动物不具毒性。

转 *Bt Cry1F* 基因玉米第 1507 品系中除了含有 *Cry1F* 基因以外，还含有代号为 *pat* 的 PPT 乙酰基转化酶基因。*pat* 基因为来自 *Streptomyces viridochromogenes*（一种非致病微生物）的天然基因经遗传改造而得。包含 *pat* 基因之目的乃在于产生对除草剂草胺磷铵盐的耐受性，从而能够筛选出 *Bt* 品系。*PAT* 蛋白没有已知的对环境不利或毒理作用。*Bt Cry1F* 玉米 1507 品系亦可被种植者当作耐草胺磷铵盐的品系。草胺磷铵盐作为玉米除草剂的安全使用历史。

Bt Cry1F 玉米第 1507 品系自 1997 年以来已在北美和欧洲的主要玉米产区进行过田间试验，所有的田间试验都是在获得美国农业部或南美或欧盟之有关管理部门田间试验许可的情况下进行的。美国农业部、美国环保署和美国食品与药物管理署已于 2001 年 6 月为 *Bt Cry1F* 玉米 TC1507 品系颁发了批准书。自 2001 年以来，转 *Bt* 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 已经分别在美国，加拿大和阿根廷的主要玉米产区获得商业化种植许可（详见表 1）。2002 年以来转 *Bt* 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 分别获得加拿大、韩国、南非、阿根廷、澳大利亚/新西兰、墨西哥、台湾、菲律宾、中国、欧盟、日本和瑞士等 19 个国家和地区的食品与饲料的加工原料进口许可。

受农业部委托，2003 年，农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心（济南）对玉米 1507 进行了环境安全性评价，结果表明，在生存竞争力、基因漂移、非靶标生物及病害应答等方面，玉米 1507 与对照玉米之间没有显著差异；玉米 1507 对田间靶标害虫亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 有很好的控制作用，对棉铃虫 *H. armigera* 和桃蛀螟 *D. punctiferalis* 也有一定控制作用。

受农业部委托，2004 年，农业部转基因生物食用安全监督检验测试中心（天津）

对玉米 1507 进行了食用安全性评价。90 天大鼠喂养结果表明，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因玉米 TC1507 对雌雄两种大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数和病理组织学均未见不良影响。

在这些安全性评估中，先锋公司和陶氏益农有限公司已得出如下结论：基于对遗传物质、人类食用的历史、营养素与抗营养素的组成成分，及常规玉米杂交种和 *Bt* Cry1F 玉米 1507 品系杂交种之间的类似性等资料的考虑，由 *Bt* Cry1F 玉米第 1507 品系所加工的各种食品可以被认为与现有各种食品等同。

三、工作目的和意义

玉米 (*Zea mays*) 是世界三大粮食作物之一, 占世界粗粮产量的 65% 以上, 是制造复合饲料的最主要原料, 在国家农业产业结构中占有重要地位。玉米的种植和产量受到害虫、气候、光温、土壤盐碱度等诸多条件的影响, 其中害虫是造成玉米减产的主要原因之一。TC1507 玉米品系利用了转 *cry1F* 基因植株而得, *cry1F* 基因来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)。苏云金芽孢杆菌是一种常见的革兰氏阳性土壤微生物, 它能产生一种对欧洲玉米螟及其他害虫具有高度选择性的杀虫蛋白。TC1507 玉米 TC1507 品系中除了含有 *cry1F* 基因以外, 还含有代号为 *pat* 的 PPT 乙酰基转化酶基因。*pat* 基因为来自非致病性绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 的天然基因, 经遗传改造而得。包含 *pat* 基因目的在于产生对除草剂草胺膦铵盐的耐受性。

Bt 玉米的种植和推广有效地控制了因玉米害虫而造成的损失, 使玉米产量增加, 同时避免了使用杀虫剂对环境造成的不利影响。这类转基因玉米深受种植者的欢迎, 在被批准可以进行商业化种植之后, 其种植面积不断扩大。虽然 Bt 玉米提高了玉米产量, 降低了劳动成本, 给种植者带来巨大收益, 但有许多国际组织和消费者一直强烈反对将转基因技术用于食品生产, 并阻止转基因作物进入食物链。目前, 人们对转基因食品的担忧主要集中在这类食品对环境和人类健康的潜在安全隐患。这些担心并非毫无理由。从理论上讲, 转基因本身并不能构成新的健康危害, 但是基因的插入与表达、基因的非预期表达以及插入基因所引起的非意向性突变均可能改变转基因食品的原有组成, 进而影响食物固有的营养性质、毒性以及致敏性。Bt 基因在大多数情况下能够整合到玉米的基因组中, 并遵循简单的孟德尔遗传规律, 但是它在玉米植物中的命运受到一系列生理和生化过程的影响, 并以复杂的遗传方式表现出来。任何用于改变生物遗传构成的技术都可能导致其它非意向性的改变, 这种基因多效性可能也会影响食物的安全性和营养价值。此外, 插入的 Bt 基因理论上能使原已存在的基因失活或表达改变, 也能激活其它在正常情况下处于“沉默”状态 (silencing) 的基因。因此, 受体植物在长期进化或驯化过程中逐渐“沉默”的毒素基因可能会被转基因或基因操作再次激活, 进而可能表达具有毒性或致敏性的成分。另据 1999 年研究报道, Bt 玉米花粉对非靶生物 Monarch 蝴蝶幼虫有负面影响, 这引起许多科学家的关注。这些均说明对转基因食品进行安全性评价是十分必要的。

因此, 为了全面了解 TC1507 玉米的食用安全性, 现根据我国的相关管理法规, 从受体植物 (玉米)、基因供体 (Bt 杆菌)、转基因操作 (微粒加速转化系统) 以及终产品 (TC1507 玉米) 等方面对该玉米的食用安全性进行综合评价, 旨在为政府有关部门就是否批准 TC1507 玉米进入中国市场提供技术依据。

四、国内外研究的相关背景材料

玉米是全球分布最广的粮食作物，也是中国最重要的作物，在世界范围内，玉米的种植面积和总产量均为第二位。随着人口的增加和经济的发展，中国粮食的进口特别是饲料玉米的进口呈增加趋势。

国际转基因植物研究发展进展

转 Bt 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 自 2001 年在美国，2002 年加拿大主要玉米产区商业化种植的田间表现证明：先锋公司的转 Bt 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 田间表现优秀，没有由于 Bt 基因 *Cry1F* 导入而导致的农艺性状退化或者抗病性减弱等现象发生；TC1507 在玉米虫害严重发生的年份，产量显著高于非转基因玉米；由于转基因抗虫玉米能有效地保护玉米穗和玉米籽粒免遭玉米螟侵食，减少虫伤粒，继而减少真菌感染、降低玉米中真菌毒素的含量，所以 TC1507 玉米品质大大提高；TC1507 玉米不仅能抗欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)，还能抗其它害虫，如西南玉米螟 (*Diatraea grandiosella*)，豆切根虫 (*Striacosta albicosta*)，粘虫 (*Spodoptera frugiperda*)，地老虎 (*Agrotis ipsilon*)，和甘蔗螟 (*Diatraea saccharalis*)，而且对美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*) 也有一定的抗性。抗虫性多年来保持在高抗水平，未发现抗虫性降低现象。

2001 年以来，转基因玉米 1507 已分别在美国、加拿大和阿根廷的主要玉米产区获得商业化种植许可。自 2002 年，玉米 1507 分别获得加拿大、韩国、南非、阿根廷、澳大利亚、新西兰、墨西哥、中国台湾、菲律宾等多个国家和地区的食品与饲料的加工原料进口许可。

中国转基因玉米研究进展

中国的农业生物技术研究始于二十世纪八十年代初，八十年代中期被列入国家“863”计划。为加快我国转基因植物研究与产业化进程，近年来，国家正式启动实施了“转基因生物新品种培育科技重大专项”，投入经费数亿元。通过多年努力，我国转基因植物研究取得了很大进展。由于玉米在中国农业生产中的重要地位，转基因玉米得到国家和广大科技工作者的重视。转基因玉米研究进展明显，转基因玉米在中国即将进入生产阶

段，转基因抗虫、抗除草剂玉米的产业化蓄势待发。基于转基因专项的支持，克隆出了一批具有自主知识产权的功能基因或候选基因，按功能分类主要包括：抗虫、抗病（病毒、细菌和真菌病害）、抗除草剂、抗逆（抗寒、抗旱、抗盐碱、耐铝毒）、品质改良（高直链淀粉、油脂、蛋白质和维生素）、营养高效（氮高效、磷高效）。

使用子房注射法、超声波技术及基因枪法，中国农业科学院、中国农业大学和中国科学院等机构成功地将 *Bt* 基因导入玉米，试验表明其再生转基因植物具有杀虫作用。中国农业科学院生物技术研究所从国内苏云金芽孢杆菌中克隆鉴定了 *Bt cryIAh* 杀虫蛋白基因，用基因枪法转化玉米，外源基因在玉米植株可以稳定表达，转基因抗虫玉米对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 具有显著地抗性且逐代稳定遗传。转基因抗虫玉米已在国内进入生产性试验阶段。中国农业科学院生物技术研究所的专家也研制成功了转 *Bt* 基因抗虫抗除草剂玉米，田间实验表明对玉米螟有很好的抗性。中国农业科学院依托于“国家转基因植物中试与产业化基地（吉林）”，获得了一大批转基因玉米自交系，其中主要为抗虫和抗除草剂玉米。

通过基因枪共转化方法，在玉米种转入自行克隆的植酸酶基因，中国农业科学院生物技术研究所开发了转植酸酶基因玉米，多代筛选后获得了可稳定遗传表达植酸酶基因的玉米自交系。转植酸酶基因玉米能够减少植酸酶添加剂的用量，使饲料成本降低三分之二。同时能够降低江河、水域等环境中磷的污染，缓解磷资源的匮乏与供应不足。

五、安全性评价

1 受体植物

1.1 受体植物的背景资料:

受体植物为玉米，又名玉蜀黍，俗名为苞米、苞谷、棒子。玉米在植物分类学上属种子植物门、被子植物亚门、单子叶植物纲、禾本科、玉蜀黍属、玉米种、栽培玉米亚种。为一年生草本植物，株形高大，不具分枝，基部各节具气生根；叶片宽长，具强壮之中脉；雌雄花同株异位，雄花序长于植株顶部，雌花序(穗)着生在中上部叶腋间，异花(株)授粉。玉米籽粒由果皮和种皮(占6-8%)、胚(10-15%)和胚乳(占80-85%)构成，其形状、大小和透明度等随品种类型而不同。

玉米的起源和进化过程仍无定论。1964年，在墨西哥南部史前人类居住过的洞穴中，发现了一些保存完好的公元前5000年的野生玉米穗轴，据此判断现代玉米的祖先是野生玉米进化而成。目前大多数观点认为，玉米起源于南美洲的墨西哥蜀黍(teosinte)，但尚需进一步证实。早在公元前2700年之前，玉米在美洲就已经作为食用作物开始种植。15世纪末期哥伦布把玉米从古巴带到西班牙并开始在欧洲种植。随着世界航海业的发展，玉米逐渐传到了世界各地，并成为最重要的粮食作物之一。中国大约在16世纪初期开始引进玉米，因此中国的玉米栽培历史已有400多年。现在世界各地几乎都种植玉米，2001年的产量高达6亿吨。

玉米是世界上分布最广的作物之一，从北纬55度到南纬35-40度的地区，从低于海平面的新疆吐鲁番盆地到3600米以上的高海拔地区，均能栽种。北美洲种植面积最大，亚洲、非洲和拉丁美洲次之。在世界谷类作物中，玉米的种植面积和总产量仅次于小麦、水稻而居第3位。美国和中国是两个主要的玉米生产国，分别占总产量的43.2%和17.9%。

玉米为短日照、喜温作物，种子发芽的最适温度为25~30℃，极冷和较热温度对于玉米种子的发芽和成活力均有不良影响。子粒成熟阶段温度要求保持在20~24℃，以利于营养物质的积累。玉米在砂壤、壤土、粘土上均可生长。适宜的土壤pH为5~8，以6.5~7.0最适。玉米耐盐碱能力差，特别是氯离子对玉米的危害较大。

1.2 受体植物及其产品的安全性

玉米无毒，有作为人类食物和动物饲料的安全食用历史。《本草纲目》中记载：玉米“释名玉高粱，味甘、平，无毒”，具有“调中开味”之功效。在全球范围内，饲喂

动物仍然是玉米的最大用途。从1995年到1997年世界上66%的玉米用于动物饲料，17%用于人类的消费，发展中国家用于人类消费的玉米比例高达30%。人类对玉米的直接消费量低于间接消费量，而且对不同品种玉米的消费模式也存在差异。例如，大田玉米主要用作饲料（谷壳、麸质和玉米粥）和食物（油、粗玉米粉、面粉、酒、糖浆和淀粉）的生产。甜玉米可以用来制作食物（籽粒和粗粉）和饲料（谷壳）。爆米花玉米的谷粒是制作爆米花和糖果的主要成分。

玉米不是一种常见的致敏食物，但是近期也有一些关于玉米引发过敏反应报道，主要症状包括皮肤瘙痒、胃肠不适和呼吸困难。曾有极少数几起有关玉米导致过敏性事件的报道（见White和Pollack,1995年）。因食品而引起该过敏反应的原因已被确认是一种脂转移蛋白（见Pastorello等,2000年）。

研究发现，玉米中天然存在的主要抗营养因子为植酸和胰蛋白酶抑制剂，两者的含量都很低，主要存在玉米的籽粒中。植酸在玉米中以植酸盐的形式存在，结合了60-75%的磷原子。由于和磷结合，该物质直接影响玉米中磷的生物利用率。对于非反刍动物来说，玉米中磷的生物利用率低于15%，但由于反刍动物胃中的微生物可产生植酸酶，后者可破坏植酸盐，释放出磷，所以反刍动物能够大量利用玉米中的磷。为了提高玉米基饲料中磷的生物利用率，通常在饲料中添加植酸酶。植酸在玉米干物质中的含量为0.45-1.0%。玉米中含有少量的胰蛋白酶抑制剂。

玉米的加工方式多种多样，主要有湿磨法和干磨法两种（见图1和图2）。前者主要生产玉米淀粉，后者则生产玉米粗粉和玉米面粉，他们是进一步生产糖浆、酒精等其它食品的原料。这两种加工方法的副产品可用来生产动物饲料。此外，玉米在碱存在的条件下加热到85-95℃后可生产一种湿润粉糊(Masa)，它是制作玉米圆饼和玉米卷的原料。上述玉米加工过程主要采用清洗、筛屑、浸泡、蒸煮、研磨、离心等机械手段，在生产糖浆和酒精等深加工过程时主要采用糖化、发酵和常规酶解方法，因此不认为这些加工过程会对玉米的原有安全性产生影响。

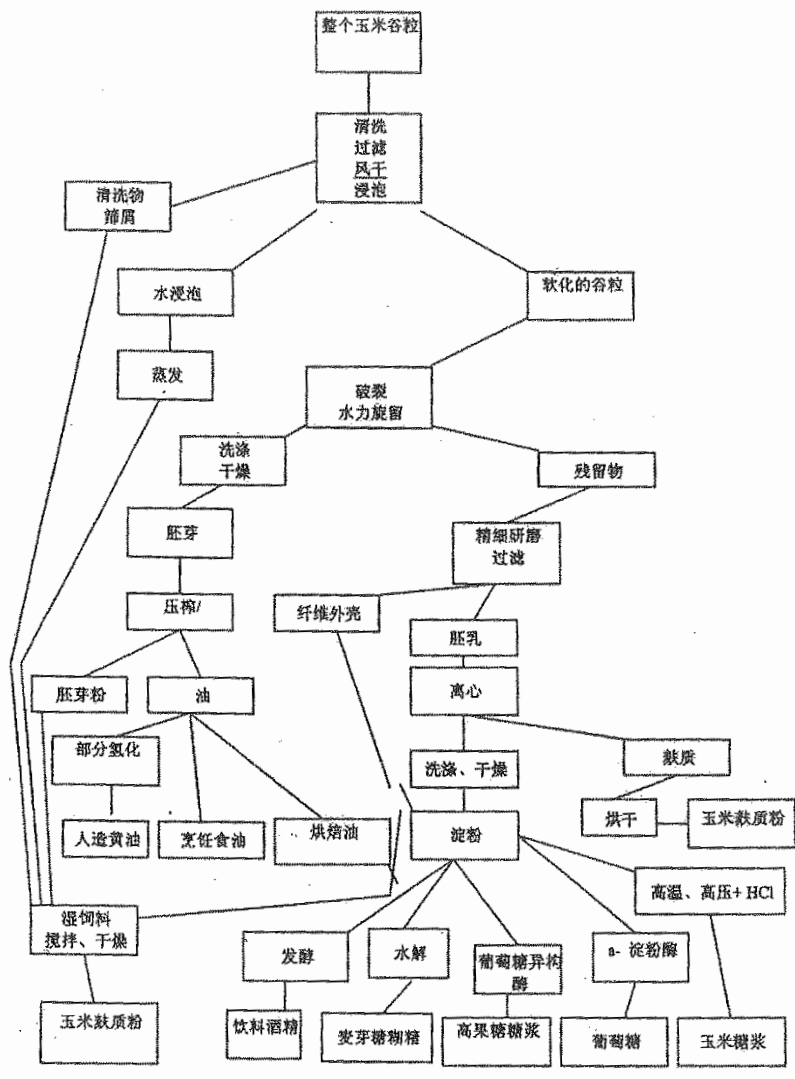


图1 玉米的湿加工过程

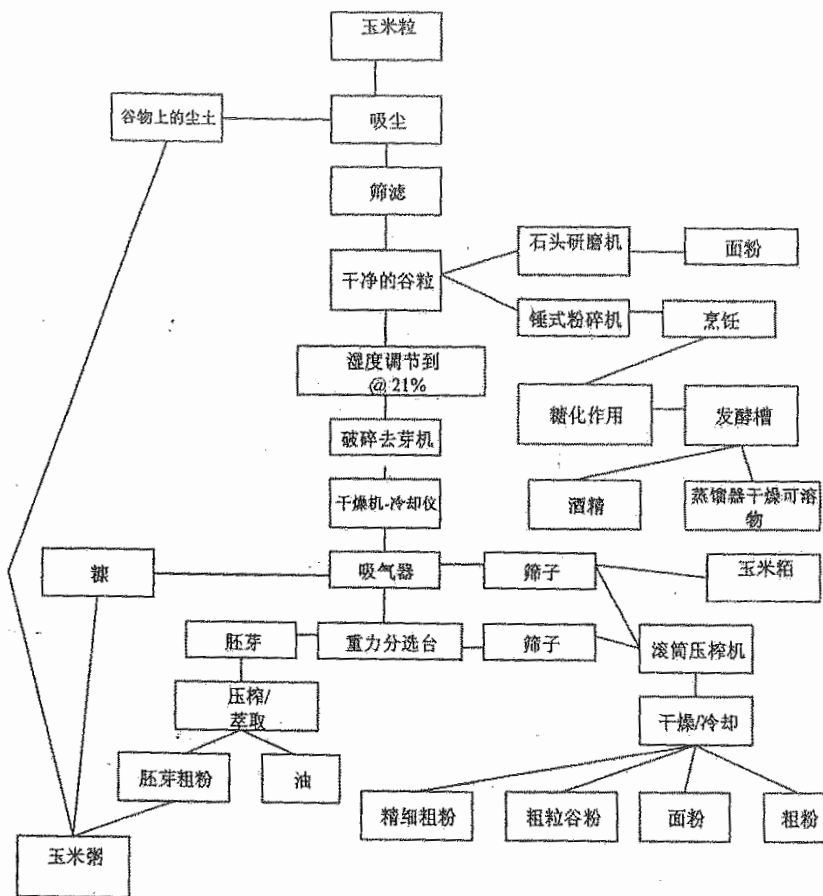


图2 玉米的干加工过程

综上所述，受体植物玉米有着被安全食用的历史，在世界各地广泛种植。玉米一般被用作牲畜饲料，以提供丰富的高质量畜产品，并用以生产多种人类食品和大量的工业产品。玉米不是一种常见的致敏食物。玉米中天然存在的主要抗营养因子为植酸和胰蛋白酶抑制剂，但两者的含量都很低。玉米的加工方式多种多样，主要有湿磨法和干磨法两种，目前没有证据证明这些加工过程会对玉米的原有安全性产生影响。

2 基因供体

2.1 基因供体背景资料

TC1507玉米品系利用了转*cryIF*基因植株而得，*cryIF*基因来自苏云金芽孢杆菌鮎泽变种(*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*)的PS811品系。苏云金芽孢杆菌是一种

常见的革兰氏阳性土壤微生物,属芽孢杆菌科(Bacillaceae),芽孢杆菌属(Bacillus),菌体杆状,可形成芽孢,有机化能营养,利用多种底物进行严格呼吸代谢,严格发酵代谢或呼吸和发酵代谢二者兼有的代谢。它能产生一种对特定生物具有高度选择性的杀虫蛋白。自1958年在美国被首次注册为杀虫剂后,至今40多年来Bt杆菌一直是制造微生物杀虫剂的常用材料。Bt杆菌可用于控制生长期作物、储藏谷物以及一些观赏植物的害虫危害。在抗虫转基因作物的研制开发中,Bt杆菌是转基因的最常用微生物供体之一。

苏云金芽孢杆菌在自然界具有多样性,迄今被分离的菌株数量已很多。苏云金芽孢杆菌主要存活在土壤、昆虫、灰尘、落叶及针叶等环境中。其在全球的分布及生活史仍在不断的研究中。目前,对苏云金芽孢杆菌孢子在实验室、温室、田间及森林环境下的存活力研究较深入,苏云金芽孢杆菌的孢子被喷洒到上述环境后,虽然其种群数量及毒性会很快下降,但通常可以存活若干年。

TC1507玉米品系中除了含有*cry1F*基因以外,还含有代号为pat的PPT乙酰基转化酶基因。pat基因为来自非致病性绿色产色链霉菌的天然基因,经遗传改造而得。绿色产色链霉菌属于放线菌目(*Actinomycetales*)、链霉菌科(*Streptomycetaceae*)、链霉菌属(*Streptomyces*),绿色产色链霉菌种,革兰氏阳性的土壤孢子菌。链霉菌属是放线菌中种类最多的一属,在自然界,尤其是在土壤中有广泛分布。它们具有发达菌丝体。浮动的菌丝体产生圆柱状的孢子。无性繁殖阶段:菌丝体(营养体)在适宜条件下产生无性孢子,无性孢子萌发形成新的菌丝体,多次重复。有性繁殖阶段:在发育后期,在一定条件下,在菌丝体上分化出特殊性器官(细胞),质配、核配、减数分裂后形成单倍体孢子,再萌发形成新的菌丝体。

2.2 基因供体的安全性:包括毒性、过敏性、抗营养作用、致病性的描述及与人类健康的关系

Bt杆菌经口急性毒性试验表明,4.7×10¹¹个芽孢/kgBW的Bt杆菌不会产生毒性反应、哺乳动物感染和致病性,因此其毒性被美国EPA认定为四级。虽然有两例关于Bt杆菌可能会引起致敏性的报道,但最后证实均不是由Bt杆菌所引起。现有资料尚未发现Bt杆菌含有能引起内分泌干扰或免疫毒性的毒性物质或代谢物,因此预计该微生物不会引起内分泌系统方面的副作用。研究表明,Bt杆菌能够产生与腊状芽孢杆菌有关的、低水平的致泻性内毒素,但是迄今仍无有效的证据表明Bt杆菌杀虫剂的应用与腹泻发生存在关联。另有研究报道,某些含有发酵副产物的Bt杆菌产品对水蚤、蜜蜂及其它非靶性益虫具有毒性和致病性。由于Bt杆菌可产生对害虫特异毒性的Cry型蛋白,而人体肠道不含该型蛋白的特异性受体;而且由于Bt杆菌的芽孢和结晶蛋白(毒素)的半衰期很短,这

类杀虫剂的暴露仅仅局限于施用后的很短时间内。

经过广泛的毒性和感染性评估，美国FDA于1960年对第一个Bt产品免除了容许量要求 (Requirement of a Tolerance)。自1971年以后，许多天然的或转基因的Bt产品陆续在FDA注册，并均免除了容许量要求。从1995年到2001年，FDA对转基因食用作物中表达的各种Bt晶体蛋白 (CryI、CryII、CryIII) 制定了各自的容许量豁免 (Tolerance Exemption) 规定。这些规定是建立在大量毒理学研究未发现Bt混合物和晶体蛋白对哺乳动物具有不良作用的基础之上，同时也说明了Bt混合物和其蛋白是安全的。因此，从Bt杆菌及其产品在农业上40多年的安全应用史以及上述文献资料结果来看，Bt杆菌不会对哺乳动物产生健康危害。

pat基因为来自非致病性绿色产色链霉菌的天然基因经遗传改造而得。未见PAT蛋白对环境不利或毒性作用的报道。人类可以通过处理土壤、食用在有细菌存在的土壤中生长出的块茎状食物或食用其他与土壤接触的食物等形式与绿色产色链霉菌发生接触。BtCry1F玉米TC1507品系亦可被种植者当作耐草胺磷铵盐的品系。未见PAT蛋白对环境不利或毒性作用的报道。已有草胺磷铵盐用作玉米除草剂安全使用的历史。

综上所述，Bt杆菌产品在农业中具有很长的安全使用历史，并已经积累了大量的毒理学资料。绿色产色链霉菌在环境中广泛存在，未见PAT蛋白对环境不利或毒性作用的报道。因此没有根据认为TC1507玉米基因供体有安全性问题。

3 基因操作(修饰过程)

3.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的描述

在设计插入Bt Cry1F玉米TC1507品系中的 *cry1F* 基因序列的基因改造中，有选择地将密码子替换为受体植物中更常用的密码子，并去除与mRNA不稳定性有关的某些富含A+T序列的元件如RNA剪切信号、冗余的多聚腺苷酸化序列、内含子拼接位点、发夹序列及转录终止信号。使其适合在植物中进行蛋白表达 (植物优化)。

适合植物表达的 *cry1F* 基因编码了一种剪切形式的Cry1F蛋白，这种蛋白与苏云金芽孢杆菌菌株泽变种天然的Cry1F完整蛋白和MR872菌株产生的Cry1F完整蛋白中的核心毒素完全一致。只有玉米TC1507品系Cry1F蛋白的第604位的氨基酸被替换成了亮氨酸。对编码序列进行的这种改变是为了引入Xho I限制酶切位点，以便与编码蛋白的C末端区域的序列进行融合而形成完整蛋白。采用F₆₀₄L替换是基于亮氨酸在其他Cry1蛋白中的同源位置出现频率较高。

序列分析结果与 Southern 印迹分析表明除去插入片段中的 *cry1F* 和 *pat* 基因的全长拷贝外，还有另外一个 *cry1F* 基因片段和 2 个 *pat* 基因片段。另外的 *cry1F* 基因片段位

于全长插入片段的5'端区域，一个pat基因片段也存在于全长插入片段的5'端区域，第2个pat基因片段位于BtCry1F玉米TC1507品系的全长插入片段的3'端区域。

在BtCry1F玉米TC1507品系中，*cry1F*和pat基因唯一的表达与预期的全长基因一样。采用与PHI8999A中*cry1F*基因1817bp编码序列、ORF25终止子的723bp和pat基因的552bp序列相同的全长探针进行Northern blot分析证实了在TC1507中只具有预期的全长*cry1F*和pat的mRNA转录子。Western blot分析表明只产生预期大小的Cry1F和PAT蛋白。对全部序列的分析证实该序列与能够编码已知致敏或毒性蛋白的序列没有同源性。

3.2 实际插入或删除序列资料：

3.2.1 插入序列的大小和结构及确定其特性的分析方法：

TC1507转化体的产生采用了一个含有*cry1F*和pat基因的线性DNA片段。该线性DNA片段定名为PHI8999A插入序列。该序列含6235碱基对，主要含有Cry1F和PAT基因及Cry1F的启动子(ubiquitin)、终止子(ORF25 poly A)和PAT的启动子(CaMV 35S)、终止子(CaMV 35T)。

pHP8999质粒为先锋公司所开发的植物表达载体，质粒的大小为9504碱基对。限制性内切酶Pme I位点用来产生含Bt*cry1F*基因的线性插入序列。用这个插入序列转化玉米从而产生TC1507转化体。该DNA插入序列定名为PHI8999A(见图5)。

质粒pHP8999含有卡那霉素抗性基因。这种基因被定名为npt II。这种叫做npt II的基因存在于质粒pHP8999中，其作用是在制备用来产生B.t .Cry1F玉米转化体的DNA过程中帮助选择含有这种质粒的微生物细胞。pHP8999质粒中的npt II基因和其它载体部分在转化玉米细胞产生B.t .Cry1F玉米转化体TC1507之前已被删除。

质粒pHP8999中不包含会引起质粒转移的DNA序列。质粒pHP8999中的DNA序列只能在大肠杆菌(*E. coli*)中得到复制。这种载体在植物中或自然中都不会增殖。

用于Cry 1F蛋白的ubiquitin启动子

ubiquitin启动子(加上ubiquitin的内含子和一个5'端非翻译区)(Christensen等, 1992年)起源于Zea mays.

用于PAT蛋白的花椰菜花叶病毒启动子(CaMV 35S)

在BtCry1F玉米TC1507品系中，pat基因是用来源于花椰菜的花叶病毒CaMV 35S启动子来表达的。因为这种启动子所启动的基因表达效率较高，目前被广泛用作转基因植物的启动子(Van Wert, 1994年)。花椰菜的花叶病毒无论对人类或动物都不是致病。

用于Cry1F蛋白的根瘤农杆菌质粒pTi15955的终止子(ORF 25 poly A)

ORF polyA 终止子是一种来源于根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) pTi15955 的转录终止子。这种非编码的终止子不会产生对玉米有害的毒素或使玉米演变成有害于其它生物的植物。

用于 PPT 乙酰基转化酶蛋白的花椰菜花叶病毒终止子 (CaMV 35T)

CaMV 35T 终止子的序列(见 Pietrzak, 1968 年)常被用于终止 BtCry 1F 玉米 TC1507 品系所含有的 pat 基因的表达。CaMV(花椰菜花叶病毒)对于人类或动物来说都不是一种病原体。

3.2.2 删除区域的大小和功能

在设计插入 Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系中的 *cry1F* 基因序列的基因改造中, 有选择的将密码子替换为受体植物中更常用的密码子, 并去除与 mRNA 不稳定性有关的某些富含 A+T 序列的元件如 RNA 剪切信号、冗余的多聚腺苷酸化序列、内含子拼接位点、发夹序列及转录终止信号。使其适合在植物中进行蛋白表达 (植物优化)。

3.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

cry1F 基因的核苷酸序列见附录

核苷酸序列为公司保密信息, 在此公开版本中删除

pat 基因的核苷酸序列:

核苷酸序列为公司保密信息, 在此公开版本中删除

CRY1F 蛋白的氨基酸序列

在编码 Cry1F 蛋白的三种基因型中一致的序列代表着相同的残基。假定的蛋白酶剪

切位点在活性核心蛋白的起始（大约在第 28 或 31 残基）和末端（大约在第 612 或 615 残基），以 ↓ 标记。请注意转基因 Cry1F 多肽中的单一的 F₆₀₄L 替换。这个差异是由于引入了限制酶切位点以便对完整蛋白的 C 末端部分进行基因克隆而改变了密码子引起的。

MR872 = 用于毒理学研究的细菌产生的CRY1F蛋白氨基酸序列
 CRY1F_{syn} = 1507玉米品系的CRY1F蛋白氨基酸序列
 CRY1F = *Bacillus thuringiensis var. aizawai*的CRY1F蛋白的氨基酸序列

	1		↓	↓	50
MR872	MENNIQNQCV	PYNCLNNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Cry1F _{syn}	MENNIQNQCV	PYNCLNNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Cry1F	MENNIQNQCV	PYNCLNNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Consensus	MENNIQNQCV	PYNCLNNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
	51				100
MR872	GVGVAFGLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Cry1F _{syn}	GVGVAFGLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Cry1F	GVGVAFGLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Consensus	GVGVAFGLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
	101				150
MR872	LADSYEIIYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Cry1F _{syn}	LADSYEIIYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Cry1F	LADSYEIIYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Consensus	LADSYEIIYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
	151				200
MR872	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Cry1F _{syn}	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Cry1F	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Consensus	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
	201				250
MR872	YTKHCLDTYN	QGLLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Cry1F _{syn}	YTKHCLDTYN	QGLLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Cry1F	YTKHCLDTYN	QGLLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Consensus	YTKHCLDTYN	QGLLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
	251				300
MR872	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPHLMDFM
Cry1F _{syn}	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPHLMDFM
Cry1F	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPHLMDFM
Consensus	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPHLMDFM
	301				350
MR872	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIAD
Cry1F _{syn}	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIAD

```

Cry1F      NSLFVTAETV RSQTVWGGHL VSSRNTAGNR INFPSYGVFN PGGAIWIAD
Consensus  NSLFVTAETV RSQTVWGGHL VSSRNTAGNR INFPSYGVFN PGGAIWIAD

351                                             400
MR872      DPRPFYRTLS DPVFVRGGFG NPHYVLGLRG VAFQQTGTNH TRTFRNSGTI
Cry1Fsyn   DPRPFYRTLS DPVFVRGGFG NPHYVLGLRG VAFQQTGTNH TRTFRNSGTI
Cry1F      DPRPFYRTLS DPVFVRGGFG NPHYVLGLRG VAFQQTGTNH TRTFRNSGTI
Consensus  DPRPFYRTLS DPVFVRGGFG NPHYVLGLRG VAFQQTGTNH TRTFRNSGTI

401                                             450
MR872      DSLDEIPPQD NSGAPWNDYS HVLNHVTFVR WPGEISGSDS WRAPMFSWTH
Cry1Fsyn   DSLDEIPPQD NSGAPWNDYS HVLNHVTFVR WPGEISGSDS WRAPMFSWTH
Cry1F      DSLDEIPPQD NSGAPWNDYS HVLNHVTFVR WPGEISGSDS WRAPMFSWTH
Consensus  DSLDEIPPQD NSGAPWNDYS HVLNHVTFVR WPGEISGSDS WRAPMFSWTH

451                                             500
MR872      RSATPTNTID PERITQIPLV KAHTLQSGTT VVRGPGFTGG DILRRTSGGP
Cry1Fsyn   RSATPTNTID PERITQIPLV KAHTLQSGTT VVRGPGFTGG DILRRTSGGP
Cry1F      RSATPTNTID PERITQIPLV KAHTLQSGTT VVRGPGFTGG DILRRTSGGP
Consensus  RSATPTNTID PERITQIPLV KAHTLQSGTT VVRGPGFTGG DILRRTSGGP

501                                             550
MR872      FAYTIVNING QLPQRYRARI RYASTTNLRI YVTVAGERIF AGQFNKMTMDT
Cry1Fsyn   FAYTIVNING QLPQRYRARI RYASTTNLRI YVTVAGERIF AGQFNKMTMDT
Cry1F      FAYTIVNING QLPQRYRARI RYASTTNLRI YVTVAGERIF AGQFNKMTMDT
Consensus  FAYTIVNING QLPQRYRARI RYASTTNLRI YVTVAGERIF AGQFNKMTMDT

551                                             600
MR872      GDPLTFQSFS YATINTAFTF PMSQSSFTVG ADTFSSGNEV YIDRFELIPV
Cry1Fsyn   GDPLTFQSFS YATINTAFTF PMSQSSFTVG ADTFSSGNEV YIDRFELIPV
Cry1F      GDPLTFQSFS YATINTAFTF PMSQSSFTVG ADTFSSGNEV YIDRFELIPV
Consensus  GDPLTFQSFS YATINTAFTF PMSQSSFTVG ADTFSSGNEV YIDRFELIPV

601           ! !                               650
MR872      TATFEAEYDL ERAQKAVNAL FTSINQIGIK TDVTDYHIDR VSNLVECLSD
Cry1Fsyn   TATLE*.....
Cry1F      TATFEAEYDL ERAQKAVNAL FTSINQIGIK TDVTDYHIDQ VSNLVDCLSD
Consensus  TAT-E-----

651                                             700
MR872      EFCLDEKKEL SEKVKHAKRL SDERNLLQDP NFKGINRQLD RGWRGSTDIT
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      EFCLDEKREL SEKVKHAKRL SDERNLLQDP NFKGINRQLD RGWRGSTDIT
Consensus  -----

701                                             750

```

```

MR872      IQGGDDVFKE NYVTLLGTFD ECYLTYLYQK IDESKLKAYT RYQLRGYIED
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      IQRGDDVFKE NYVTLPCTFD ECPYTYLYQK IDESKLKPYT RYQLRGYIED
Consensus  -----

              751                                800
MR872      SQDLEIYLIR YNAKHETVNV PGTGSLWRLS APSP.....
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      SQDLEIYLIR YNAKHETVNV LGTGSWPLS VQSPIRKCCE PNRCAHLEW
Consensus  -----

              801                                850
MR872      ..... .GKCAHSHH FSLDIDVGCT DLNEDLVVWV IFKIKTQDGH
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      NPDLDCSCRD GEKCAHSHH FSLDIDVGCT DLNEDLVVWV IFKIKTQDGH
Consensus  -----

              851                                900
MR872      ARLGNLEFLE EKPLVGEALA RVKRAEKKWR DKREKLEWET NIVYKEAKES
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      ARLGNLEFLE EKPLVGEALA RVKRAEKKWR DKREKLELET NIVYKEAKES
Consensus  -----

              901                                950
MR872      VDALEFVNSQY DRLQADTNIA MIHAADKRVH SIREAYLPEL SVIPGVNAAI
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      VDLEFVNSQY DQLQADTNIA MIHAADKRVH RIREAYLPEL SVIPGVNVDI
Consensus  -----

              951                                1000
MR872      FEELEGRIFT AFSLYDARNV IKNGDFNNGL SCWNVKGHVD VEEQNNHRSV
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      FEELKGRIFT AFFLYDARNV IKNGDFNNGL SCWNVKGHVD VEEQNNHRSV
Consensus  -----

              1001                               1050
MR872      LVVPEWEAEV SQEVRVCPGR GYILRVTAYK EGYGEGCVTI HEIENNTDEL
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      LVVPEWEAEV SQEVRVCPGR GYILRVTAYK EGYGEGCVTI HEIENNTDEL
Consensus  -----

              1051                               1100
MR872      KFSNCVEEEV YPNNTVTCND YTATQEEYEG TYTSRNRGYD GAYESNSSVP
Cry1Fsyn   .....
Cry1F      KFSNCVEEEV YPNNTVTCND YTANQEEYGG AYTSRNRGYD ETYGSNSSVP
Consensus  -----

```

```

1101                                     1150
MR872   ADYASAYEEK AYTDGRRDNP CESNRGYGDY TELPAGYVTK ELEYFPETDK
Cry1Fsyn .....
Cry1F   ADYASVYEEK SYTDGRRDNP CESNRGYGDY TELPAGYVTK ELEYFPETDK
Consensus -----

1151                                     1175
MR872   VWIEIGETEG TFIVDSVELL LMEE*
Cry1Fsyn .....
Cry1F   VWIEIGETEG TFIVDSVELL LMEE*
Consensus -----

```

PAT 蛋白的氨基酸序列

```

1                                     50
MSPERRPVEI RPATAADMAA VCDIVNHYIE TSTVNFRTPEP QTPQEWIDDL

51                                     100
ERLQDRYPWL VAEVEGVVAG IAYAGPWKAR NAYDWTVEST VYVSHRHQRL

101                                    150
GLGSTLYTHL LKSMEAQGFK SVVAVIGLPN DPSVRLHEAL GYTARGTLRA

151                                    184
AGYKHGGWHD VGFWRQDFEL PAPP RPVRPV TQI*

```

3.2.4 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

用Southern blot分析法对TC1507玉米品系进行分析, 确定插入序列已整合到玉米的基因组中。通过孟德尔遗传规律对其后代的观察确定转基因被插入染色体中。

3.2.5 插入序列的拷贝数, 插入序列和周围序列资料

序列分析结果与Southern印迹分析表明除去插入片段中的*cry1F*和*pat*基因的全长拷贝外, 还有另外一个*cry1F*基因片段和2个*pat*基因片段。另外的*cry1F*基因片段位于全长插入片段的5'端区域, 一个*pat*基因片段也存在于全长插入片段的5'端区域, 第2个*pat*基因片段位于BtCry1F玉米TC1507品系的全长插入片段的3'端区域。

TC1507玉米品系的插入序列PHI8999A主要分为三部分: 5'端包含玉米基因组DNA和其它与玉米基因组DNA的结合部位; 中部的PHI8999A片段的全长插入片段; 3'端包含转化的ORF25终止子、其他DNA片段和3'边缘区域。对这一结合部位的分析证实了3'边缘区段的DNA序列来源于玉米基因组。在插入片段图例下方的箭头标出开放阅读框架。

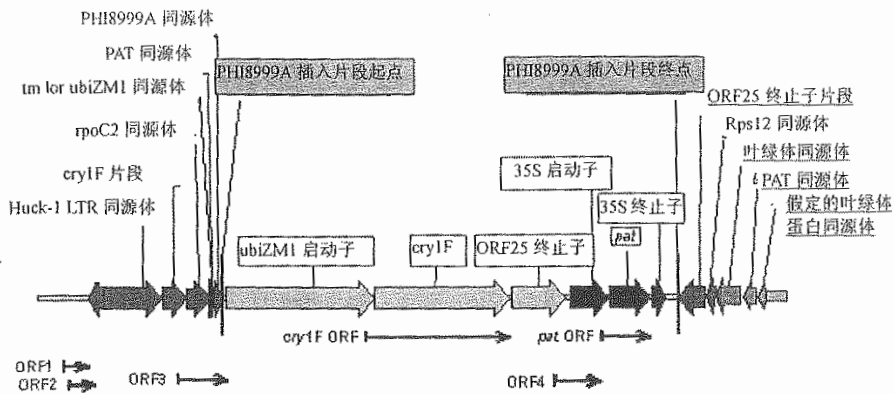


图3 BtCry1F 玉米 TC1507 品系中的边缘区域和全长插入序列

3.2.6 插入序列或由插入序列与邻近的基因组序列产生的所有开放阅读框架，包括可以产生融合蛋白序列的资料

插入序列或由插入序列与邻近的基因组序列产生的开放阅读框架见图3图例下方的箭头。

3.3 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

名称：质粒pHP8999

来源：该质粒为先锋公司所开发的植物表达载体。

DNA 大小：pHP8999质粒的长度为9504碱基对。

在植物表达载体pHP8999中不存在任何编码对人类有毒蛋白的核酸序列。质粒pHP8999中的DNA序列只能在大肠杆菌(E. coli)中得到复制。这种载体在植物中或自然中都不会增殖。

有关的限制位点与遗传因子均已标出。BtCry1F 玉米 TC1507 品系已被含 6235 碱基对的 DNA 片段进行转化，该 DNA 片段是经限制性内切酶的酶切而产生的。

图 4 质粒 pHP8999

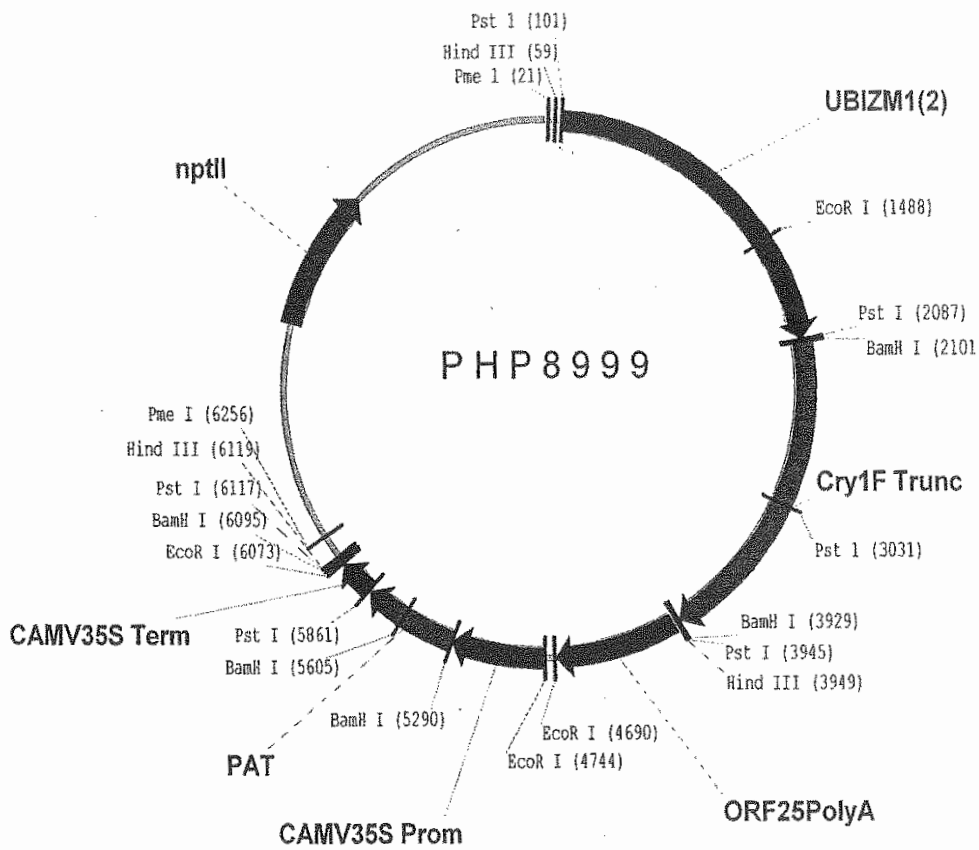
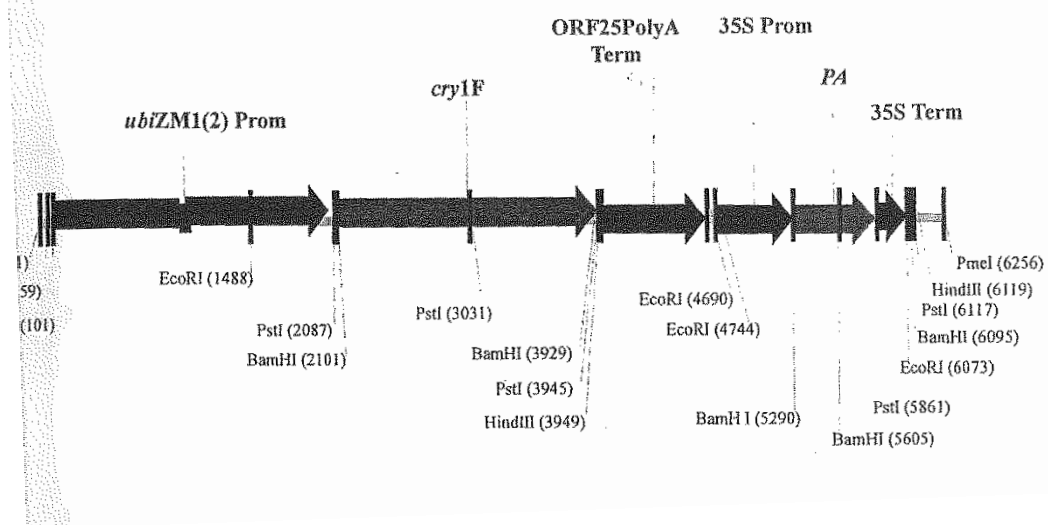


图 5 插入序列 PHI8999A



关于产生质粒载体 pHP8999 和用于转化体 TC1507 的 DNA 插入序列 (pHP8999) 之程序请见下列图解:

第一步: 先将 *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 的 PS81I 品系克隆编码 Cry1F 蛋白的 *cry1F* 基因。然后再对这一 *cry1F* 基因进行修饰和制备, 以便进行克隆载体的构建。BamHI 和 HindIII 限制性内切酶分别位于编码区 5' 和 3' 端的位置。

↓

第二步: 先产生一个克隆的载体, 这个载体含有玉米 ubiquitin 启动子和 *A. tumefaciens* ORF25 终止子, 其 5' 和 3' 端附近带有 BstEII 酶切位点。然后再利用 BamHI 和 HindIII 克隆位点, 在上述启动子与终止子之间插入 Cry 1F 编码序列。

↓

第三步: 先把 Cry 1F 基因作为 BstEII 片段插入载体主干中, 该主干包括来自质粒 pUC19(ori-pUC19) 的复制起始点、nptII 基因、CaMV 35S 启动子、pat 基因和 CaMV 35T 终止子。最终的载体被定名为 pHP8999, 它包含按以下次序排列的各种因子: 玉米 ubiquitin 启动子、Cry 1F 基因、ORF25 终止子、CaMV 35S 启动子、pat 基因和 CaMV 35T 终止子。

↓

质粒载体 pHP8999

↓

第四步: 用内切酶 PmeI 酶切 pHP8999 质粒 DNA, 将包括 Cry1F 和 pat 基因表达构件的片段从含有 nptII 基因的 pUC19(ori-pUC19) 质粒主干中分离提纯出来, 制成用于转化的 DNA 插入片段。该插入片段被定名为 PHI8999A。

↓

用于植物转化的 DNA 插入片段 PHI8999A

3.4 载体中插入区域各片段的资料

3.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称

用于 Cry 1F 蛋白的 ubiquitin 启动子起源于 *Zea mays*, 其大小约为 2100 个碱基对; 用于 PAT 蛋白的花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV) 来源于花椰菜的花叶病毒 CaMV 35S 启动子, 这种启动子被广泛用作转基因植物的启动子, 其大小约为 550 个碱基对; 用于 Cry1F 蛋白的根瘤农杆菌 pTi15955 的终止子 (ORF 25 poly A), ORF 25 polyA 终止子是一种来源于根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) pTi15955 的转录终止子。其大小约为 140 个碱基对; CaMV 35T 终止子是 PAT 的终止子, 其大小约为 220 个碱基对。

3.4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称

质粒pHP8999中含有npt II基因, 该基因编码对卡那霉素的抗性蛋白。但在DNA片段PHI8999A转化进Bt Cry1F玉米TC1507转化体之前已被去除, 因此在Bt Cry1F玉米TC1507品系中没有耐药标志的DNA序列。

3.4.3 其他表达调控序列的名称及其来源

TC1507玉米未引入其他表达调控序列。

3.5 转基因方法

用限制性内切酶PmeI将携带*cry1F*和*pat*基因及其表达所需调控因子的线性DNA片段从完整的重组质粒上切割下来, 并利用琼脂糖凝胶电泳纯化后, 用来转化玉米组织。TC1507玉米品系是用Bio-Rad公司制造的Biolistics PDS1000氦基因枪, 通过微粒轰击得到的。用纯化的PHI8999A DNA涂在钨制微粒上, 并将这些钨粒射入培养中的玉米幼胚之中。在幼胚中, 被射入的DNA就会结合到胚细胞的染色体中。

用Southern blot分析法对TC1507玉米品系进行分析确定插入序列已整合到玉米的基因组中。通过孟德尔遗传规律对其后代的观察确定转基因被插入染色体中。

3.6 插入序列表达的资料:

3.6.1 插入序列表达的部位, 如根、茎、叶、花、果、种子等;

Cry1F表达的组织有叶片、花粉、丝、茎、全株植物、玉米籽粒、老化全株植物。

Pat表达的组织只有叶片。

3.6.2 插入序列的表达量及其分析方法:

分析方法: 利用兔多克隆抗体, 采用直接双抗体夹心ELISA定量检测玉米中的Cry1F蛋白水平及PAT蛋白水平

表1 从BtCry1F玉米杂交品系TC1507收集的组织中测量的Cry1F蛋白水平

组织	平均Cry1F(pg/ μ g总蛋白)	标准差	最小值/最大值范围
叶片	110.9	27.2	56.6-148.9
花粉	135.5	13.5	113.4-168.2
丝	50.3	16.5	26.8 - 79.8
茎	550.0	104.0	355.9 - 737.4
全株植物	1063.8	361.7	803.2 - 1572.7
玉米籽粒	89.8	23.3	71.2 - 114.8
老化全株植物	714.3	95.5	a. 622.2 - 845.3

表2 从BtCry1F玉米杂交品系1507收集的组织中测量的PAT蛋白水平

组织	平均PAT (pg/μg 总蛋白)	标准差	最小值/最大值范围
叶片	<LOD	NA3	<LOD - 40.8
花粉	<LOD	NA	<LOD
丝	<LOD	NA	<LOD
茎	<LOD	NA	<LOD
整体植物	<LOD	NA	<LOD
玉米籽粒	<LOD	NA	<LOD
老化整体植	<LOD	NA	<LOD

<LOD: 测量值低于20 pg/μg总蛋白的检测限度

NA: 不适用

3.6.3 插入序列表达的稳定性。

对转入性状的后代分离资料表明新引入的遗传物质能够稳定地进行遗传。分别在转育进程中的两个阶段记录、分析了B. t. Cry1F玉米1507品系的分离 (图6)。带有TC1507转基因原初转化体Hi-II品系与优良的自交系进行杂交产生后代F1杂种。F1杂种与优良的自交系进行两次回交产生BC2F1子代。对每一代应用草胺磷除草剂以消除对草胺磷敏感的植物, 这样产生出半合子子代。

用BC2F1代的种子进行种植, 并对生长的植物喷洒草胺磷。对草胺磷耐受的预期分离比为1:1(阳性:阴性)。在表3中详细列出了研究结果。

表3 B. t. Cry1F 玉米 1507 品系的孟德尔分离

代	实测比 ⁽¹⁾	预期比	卡方	p 值 ⁽²⁾	显著性差异 ⁽²⁾
BC2F1	248 : 278	263 : 263	1.711	0.1909	无
F1	910 : 493	935.3 : 467.7	2.903	0.0884	无

(1) 数据以耐草胺磷的实测植物数与对草胺磷敏感的实测植物数之比例表示。

(2) 显著性程度为 $\alpha = 0.05$ 。

同时获得了高世代 (对B. t. Cry1F玉米1507品系回交三代后的植株进行自交而产生的种子) 的分离资料。得到的种子 (BC3F2) 对草胺磷耐受的预期分离比为3:1(阳性:阴性)。BC3F2的种子进行了种植, 并喷洒草胺磷以消除纯合敏感 (阴性) 植物。在存活的耐草胺磷 (阳性) 的植物中, 预期1/3为转基因插入片段纯合子基因型, 2/3为杂合子基因型。该耐药植物种群与敏感的自交系产生F1杂交子代。用这些杂交种子进行种植, 并喷洒草胺磷以验证对草胺磷的耐受, 预期阳性:阴性比为2:1。在表3中详细列出了研究结果。

对这些F1杂交后代喷洒草胺磷并评估除草剂耐受性后, 在每一株喷洒草胺磷后存活

的F1植物上接种200只新生的欧洲玉米螟。研究发现所有对草胺磷耐受的植物同时也能抵抗欧洲玉米螟的侵袭。这些结果证实TC1507品系是一种稳定的转化体，并按照孟德尔显性基因的规律进行遗传。

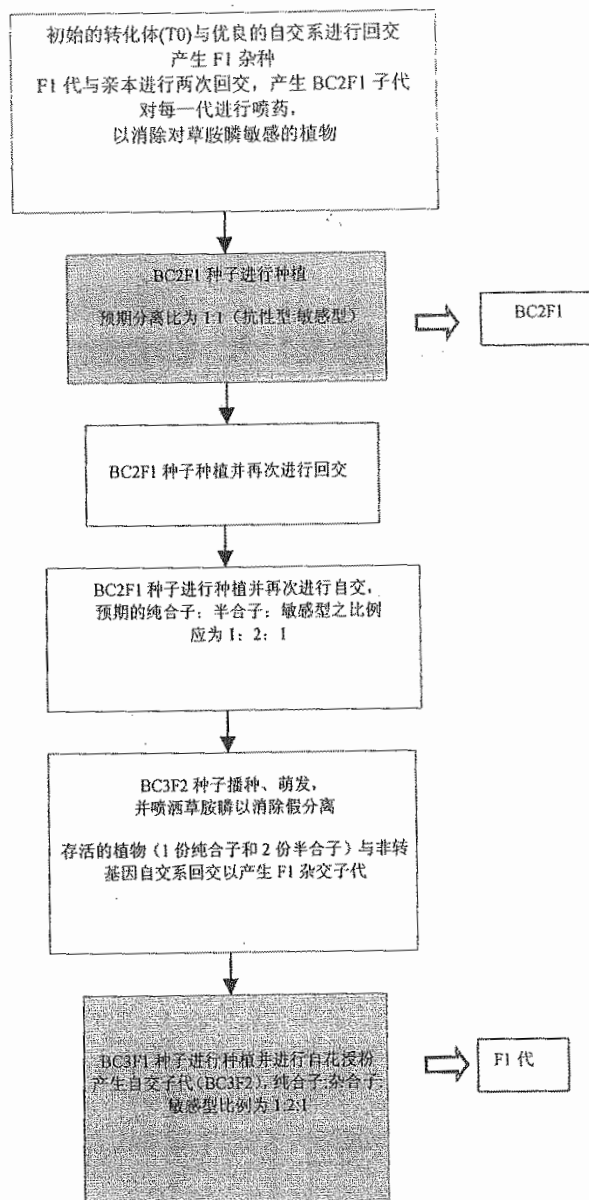


图 6 用于分析 B. t. Cry1F 玉米 1507 品系的孟德尔分离比的回交代

为进一步确定 B. t. Cry1F 玉米品系 1507 的遗传稳定性结果，另外还对含有 TC1507 转

植株的商品化自交系进行了分子生物学分析。对从B. t. Cry1F玉米1507品系中繁育而来的cry1F基因纯合体的多种自交系进行了Southern分析。分析了7种不同的玉米品系，它们代表了3种不同的，被转育成Cry1F纯合体的自交系。7种玉米株中每种取20个植物样本，抽提DNA后，以HindIII酶切，并用cry1F基因特异性DNA探针进行杂交。所有植物样本中均出现预期的3890bp和大约4000bp大小的条带(预期条带的示例见Locke等, 2001)。这表明将用于商品化杂交种子生产的自交系中含有稳定的cry1F基因拷贝。

Southern分析证明商品化杂交种子生产的自交系中含有稳定的cry1F基因拷贝。对转入性状的后代分离资料表明新引入的遗传物质能够稳定地进行遗传。

4 转基因植物及其产品

4.1 转基因植物及其产品的营养检测

4.1.1 转基因植物及其产品的主要成分分析，包括提供的分析结果和验证分析结果：

对TC1507玉米品系与对照品系的营养成分，包括蛋白质、脂肪及碳水化合物、矿物质、维生素等；抗营养成分和天然毒素分析，包括抗营养因子和酶抑制剂；以及其它由转入目的基因而发生改变的成分或含量进行比较研究的结果如下。

以下各表是TC1507玉米品系与对照品系的营养检测结果：

组分分析-玉米籽粒

对玉米TC1507品系和对照杂交品种的玉米籽粒进行的组分分析中估计的平均值和p值，根据1998年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

表3 玉米籽粒的组分分析

反应变量 ^a	处理评估(平均)	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^c
脂肪 %	1507 品系平均=3.83	0.046	3.1 - 5.7 ^b	是
	对照品系平均=3.94			
蛋白质 %	1507 品系平均=11.20	0.611	6.0 - 12 ^b	是
	对照品系平均= 11.32			
ADF %	1507 品系平均= 3.55	0.250	3.0 - 4.3 ^d	是
	对照品系平均=3.68			
NDF %	1507 品系平均=10.47	0.315	8.3 - 11.9 ^b	是
	对照品系平均=10.08			
灰 %	1507 品系平均=1.51	0.335	1.1 - 3.9 ^d	是
	对照品系平均=1.50			

^a - 在干重基础上的百分比

^b - Watson, 1987.

^c - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在已知的范围内

^d - Watson, 1982.

ADF: 酸性去污剂处理后的纤维

NDF: 中性去污剂处理后的纤维

矿物质分析 - 玉米籽粒

对玉米 TC1507 品系和对照杂交品种进行的组分分析中估计的平均值和 p 值, 根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

表 4 玉米籽粒的矿物质分析

反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^b
钙 %	1507 品系平均=0.0036	0.620	0.002-0.011 ^d	是
	对照品系平均=0.0031			
磷 %	1507 品系平均=0.33	0.161	0.26-0.75 ^c	是
	对照品系平均=0.32			
铜 ppm	1507 品系平均=2.03	0.845	0.9-10 ^c	是
	对照品系平均=2.11			
铁 %	1507 品系平均=0.0025	0.549	0.0001-0.01 ^c	是
	对照品系平均=0.0025			
镁%	1507 品系平均=0.12	0.524	0.09-1.0 ^c	是
	对照品系平均=0.13			
锰%	1507 品系平均=0.0005	0.0003	0.00007-0.0054 ^c	是
	对照品系平均=0.0006			
钾%	1507 品系平均=0.40	0.023	0.32-0.72 ^c	是
	对照品系平均=0.36			
锌%	1507 品系平均=0.002	0.141	0.0012-0.0030 ^c	是
	对照品系平均=0.002			

- ^a - 干重基础上的百分比或干重基础上的百万分比 (ppm)
- ^b - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在已知的范围内
- ^c - Watson, 1982
- ^d - 对 22 种市售先锋牌杂交品种分析的资料

脂肪酸组分 - 玉米籽粒

对玉米 TC1507 品系和对照杂交株进行的近期分析中估计的平均值和 p 值来自 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

表 5 玉米籽粒脂肪酸分析

反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	文献报道的数值范围 ^b	在范围内 ^c
棕榈酸 %	1507 品系平均=11.07	0.091	7 - 19	是
	对照品系平均=10.92			
硬脂酸 %	1507 品系平均=2.28	0.007	1 - 3	是
	对照品系平均=2.44			
油酸 %	1507 株平均=30.61	0.002	20 - 46	是
	对照品系平均=32.53			
亚油酸%	1507 品系平均=53.10	0.002	35 - 70	是
	对照品系平均=51.16			
亚麻酸 %	1507 品系平均=1.29	0.0001	0.8 - 2	是
	对照品系平均=1.21			

- ^a - 脂肪酸占总脂肪的百分比的值
- ^b - Watson, 1982
- ^c - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在文献已知的范围内

氨基酸组分-玉米籽粒

对玉米 TC1507 品系和对照杂交品种玉米籽粒氨基酸组分进行的估计平均值和 p 值, 根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

表 6 玉米籽粒的氨基酸分析

必需氨基酸				
反应变量 ^a	处理估计值	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^b
氨基乙酸	1507 品系平均=0.39	0.150	0.26 - 0.47 ^c	是
	对照品系平均=0.40		0.24 - 0.41 ^d	
苏氨酸	1507 品系平均=0.40	0.302	0.29 - 0.39 ^c	不
	对照品系平均=0.41		0.21 - 0.37 ^d	
缬氨酸	1507 株平均=0.51	0.902	0.21 - 0.52 ^c	是
	对照品系平均=0.52		0.25 - 0.67 ^d	
异亮氨酸	1507 品系平均=0.40	0.952	0.26 - 0.40 ^c	是
	对照品系平均=0.40		0.19 - 0.39 ^d	
亮氨酸	1507 品系平均=1.42	0.880	0.78 - 1.52 ^c	是
	对照品系平均=1.43		0.43 - 1.35 ^d	
苯丙氨酸	1507 品系平均=0.56	0.479	0.29 - 0.57 ^c	是
	对照品系平均=0.57		0.04 - 0.54 ^d	
组氨酸	1507 品系平均=0.29	0.822	0.20 - 0.28 ^c	是
	对照品系平均=0.30		0.21 - 0.32 ^d	
赖氨酸	1507 品系 平均 = 0.32	0.522	0.20 - 0.38 ^c	是
	对照品系 平均= 0.32		0.19 - 0.36 ^d	
精氨酸	1507 品系平均=0.44	0.672	0.29 - 0.59 ^c	是
	对照品系平均=0.45		0.28 - 0.55 ^d	

表 6 氨基酸组分-玉米籽粒 (续)

反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	文献中数值范围	在范围内 ^b
半胱氨酸	1507 品系 平均 = 0.21	<0.0001	0.12 - 0.16 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.23		0.13 - 0.27 ^d	
蛋氨酸	1507 品系 平均 = 0.19	0.020	0.10 - 0.21 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.20		0.12 - 0.26 ^d	
色氨酸	1507 品系 平均 = 0.08	0.065	0.05 - 0.12 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.08		0.05 - 0.10 ^d	
非必需氨基酸				
丝氨酸	1507 品系 平均 = 0.54	0.390	0.42 - 0.55 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.55		0.25 - 0.46 ^d	
丙胺酸	1507 品系 平均 = 0.84	0.727	0.64 - 0.99 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.85		0.37 - 0.81 ^d	
谷氨酸	1507 品系 平均 = 2.14	0.472	1.24 - 1.96 ^c	不
	对照品系 平均 = 2.18		0.89 - 2.02 ^d	
脯氨酸	1507 品系 平均 = 1.01	0.679	0.66 - 1.03 ^c	是
	对照品系 平均 = 1.03		0.43 - 1.01 ^d	
天冬氨酸	1507 品系 平均 = 0.77	0.102	0.58 - 0.72 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.81		0.37 - 0.80 ^d	
络氨酸	1507 品系 平均 = 0.20	0.954	0.29 - 0.47 ^c	是
	对照品系 平均 = 0.20		0.17-0.31 ^e	

^a - 占干重的百分比

^b - “在范围内” 是指 1507 玉米株的平均值是否在文献报道的范围内

^c - Watson, 1982.

^d - 对 22 种市售先锋牌杂交品种分析所获资料

^e - Iowa Gold Catalog, 1994.

维生素分析 - 玉米籽粒

玉米 TC1507 品系和对照杂交品种玉米籽粒样品维生素组分进行的估计平均值和 p 值, 根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

表 7 玉米籽粒的维生素分析

反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	玉米中数值范围	在范围内 ^c
氢氧化硫胺 (B1) ppm	1507 品系平均=3.64 对照品系平均=4.06	0.002	3.0 - 8.6 ^b	是
核黄素 (B2) ppm	1507 品系平均=1.67 对照品系平均=1.66	0.827	0.25 - 5.6 ^b	是
叶酸 ppm	1507 品系平均=0.151 对照品系平均=0.144	0.676	0.3 ^d	--
总维生素 E ppm	1507 品系平均=48.2 对照品系平均=41.6	0.0005	42 - 87 ^b	是

^a - 在干重基础上的百万分比 (ppm).

^b - Watson, 1982

^c - “在范围内” 是指 1507 品系的平均值是否在文献报道的范围内

^d - Watson, 1987 报道玉米籽粒中叶酸的平均值是 0.3mg/kg

抗营养物 - 玉米籽粒

1507 玉米品系和对照杂交品种玉米籽粒样品中抗营养物的估计平均值和 p 值, 根据 1998 年田间实验的结果, 同时列出了文献中关于每一特性的数值范围

表 8 玉米籽粒中抗营养物分析

反应变量 ^a	治疗评估	治疗效应 p-值	玉米中数值范围 ^b	在数值范围内 ^c
植酸 %	1507 品系 平均= 0.99 对照品系 平均= 0.96	0.146	0.7 - 1.0	是
胰蛋白酶抑制剂 TIU/g	1507 品系平均= < LOQ ^d 对照品系平均= < LOQ	--	NA	--

^a - 在干重基础上的百分比 (%) 或 mg/100 g。胰蛋白酶抑制剂是以在干重基础上每一克的胰蛋白酶抑制剂的酶的活性表示的。

- ^b - Watson, 1982.
 - ^c - “在范围内” 是指玉米 TC1507 品系的平均值是否在文献给出的范围内。
 - ^d - 在胰蛋白酶抑制剂定量水平 2000 TIU/g 以下。
- NA - 文献中没有相应的数值范围

表 9 天津市卫生防病中心检测抗营养因子结果

检验项目	检验依据	检验结果	
		转基因玉米TC1507	等位基因对照33T66
胰蛋白酶抑制剂, TIU/g	AACC 方法 71-10	262	270
植酸 mg/100g	GB/T17406-1998	870	814

由以上数据资料可见, 玉米 TC1507 品系与对照组品系的籽粒中蛋白质、ADF、NDF、和灰分含量均无显著性差异 ($p>0.05$), 仅脂肪含量有统计学差异 ($p<0.05$), 但在文献报道范围之内。二者的矿物质分析显示钙、铁、铜、镁、锌含量均无显著性差异 ($p>0.05$), 仅锰、钾含量有统计学差异 ($p<0.05$), 但在文献报道范围之内。

玉米 TC1507 品系与对照组品系的籽粒中脂肪酸含量分析表明, 仅棕榈酸两组无显著性差异 ($p>0.05$), 而硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸含量均有统计学差异 ($p<0.05$), 但棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸含量均在文献报道范围之内。

TC1507 品系与对照组品系玉米籽粒中氨基酸分析显示氨基乙酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、丝氨酸、丙氨酸、谷氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、络氨酸含量均无显著性差异 ($p>0.05$), 仅半胱氨酸、蛋氨酸含量有统计学差异 ($p<0.05$), 苏氨酸和谷氨酸的处理值不在文献的报道范围内, 但转基因组与对照组之间无显著差异, 其余氨基酸含量均在文献报道范围之内。

TC1507 品系与对照组品系玉米籽粒中维生素含量分析表明, 氢氧化硫胺 (B1)、核黄素 (B2)、总维生素 E 含量均在文献报道范围之内, 但两品系氢氧化硫胺 (B1)、核黄素 (B2) 含量有统计学差异 ($p<0.05$)。

TC1507 品系与对照组品系玉米籽粒中抗营养因子分析表明, 胰蛋白酶抑制剂含量在检测限 (2000 TIU/g) 以下, 植酸含量两组之间无显著性差异 ($p>0.05$) 且在文献报道范围之内。

通过与市场销售的玉米相比较, 并进行统计学处理; 普通玉米杂交种和 Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系杂交种之间营养素、抗营养素的组成成分类似, 由 Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系所加工的各种食品可以被认为与现有各种食品等同。

... 玉米蛋白... 的玉米成为人们摄入玉米的摄入量及相应的营养作用。

人类膳食中包含一小部分从几种苏云金芽孢杆菌来源的蛋白，这是由于该菌作为微生物杀虫剂而带来的，或者来源于修饰后表达Cry1A(b)蛋白的植物。Cry1F蛋白质在人类膳食的每天蛋白摄入量中仅占了很小的一部分。

下列资料可用于评估玉米Cry1F蛋白的含量。在每天摄入蛋白总量中可能含有Cry1F蛋白的部分可按下列方法计算。

玉米中的蛋白总量：

黄玉米：每100g鲜重（10.4%湿度，White和Pollak, 1995）中大约含有9.4g蛋白。

在BtCry1F玉米TC1507品系杂交玉米籽粒中测得的Cry1F蛋白的平均量是89.8pg/ μ g总蛋白。Cry1F蛋白在玉米总蛋白中占0.009%。89.8 μ g Cry1F蛋白/1g总蛋白 \times 9.4g总蛋白/100g玉米=844.1 μ g Cry1F蛋白/100g玉米籽粒。因此，1g玉米籽粒含有8.4 μ g Cry1F蛋白。

因此，在杂交玉米市场上应用BtCry1F玉米品系1507并不能显著的改变在人类膳食中Cry1F蛋白总量或相关的Bt蛋白量。预期在BtCry1F玉米TC1507品系的粮食中，PAT蛋白不能检出（LOD=<20pg/ μ g总蛋白）。

4.1.3转基因植物及其产品的主要成分的吸收利用率及对其他营养成分的影响，和食物利用率和营养代谢检测：

玉米 TC1507 品种进行的遗传改良并未造成玉米主要营养成分的改变。食品组分分析的结果证实 TC1507 玉米品种的各项指标与常规玉米相当，只观察到很小的变化：仅苏氨酸和谷氨酸含量在文献报道范围之外，但 TC1507 品系与对照组品系玉米相比无统计学差异，或个别成分含量有统计学差异，但在文献报道范围之内。由玉米 TC1507 品种生产的各种食品可被认为与由常规玉米生产的食品实质等同，不会影响这些营养成分的吸收利用率或对其它营养成分造成影响。

4.2 外源基因表达（物质）是否存在毒性的毒理学检测

插入序列在植物中表达 Cry1F 蛋白与微生物 Cry1F 蛋白的等同性分析

材料与方法：

材料：由玉米提取的 Cry1F 蛋白，由微生物提取的 Cry1F 蛋白

(1) SDS PAGE 被用来检测分子量

用 Bio-Rad 试剂盒，根据使用说明操作。样品与缓冲液按 1: 2 配制，煮沸 5 分钟然后加入倒 10%的聚丙烯酰胺凝胶中。电泳条件：200V,35-60min，蛋白用考马思亮兰染色，

用 Molecular Dynamica 325 激光扫描显像密度仪进行定量分析。

(2) 总蛋白用 Lowry 法进行比色测量

总蛋白含量由修饰的 Lowry 蛋白质分析法来确定

(3) 溶液中抗体的反应 (ELISA)

溶液中抗体的反应被用来以 ELISA 方法确定样品中的蛋白含量, 采用的标准为 SOP #PHIAR-SM-0001/01 和 PHIAR-SP-0001/01。以上标准描述的是一种用兔抗 Cry1F 的多克隆抗体的夹心酶联免疫法。

(4) Western blot 法

从 SDS PAGE 分离的蛋白用兔抗 Cry1F 的探针标记、印迹。

(5) N-端序列分析

将经 SDS PAGE 及由 Western 转印分离后的蛋白通过 Edman Degradation 反应, 进行 N 端序列分析, 同时配以气相序列分析。

(6) 糖基化作用

糖基化作用的检测是以电泳及用于检测糖基化作用的免疫标记试剂盒(Bio Rad)来检测的。

结果:

(1)含有 Cry1F 的植物和对照组的植物用考马斯亮兰染色后其 SDS-PAGE 无明显区别, 期望植物提取物中的 Cry1F 含量丰富, 微生物提取的 Cry1F 在实验中产生一条明显的条带, 与胰蛋白酶分解的 Cry1F 相符, 该条带的分子量为 66Kda, 预计由胰蛋白酶分解的 Cry1F 分子量为 65.912KDa, 二者基本相符。此外在微生物提取的样本中还出现了一些分子量大约在 100、45、20、15Kda 的条带。

(2)用兔抗-Cry1F 抗体进行 Western 技术检测表明植物提取的 Cry1F 中在大约 65KDa 出现了一对条带, 用考马斯亮兰染色均不明显, 氨基酸序列分析表明它不同于天然的 N-端蛋白, 也不同于由胰蛋白酶水解的 N-端蛋白序列, 其分子量大约在 3220Da, 这是在评价两种免疫活性多肽条带的分子量时观察到的。微生物得取的 Cry1F 和由胰蛋白酶 Cry1F 都含有一些与抗-Cry1F 抗体反应的条带, 最明显的是 65, 25, 20Kda。其中 65Kda 条带也是考马斯亮兰获得的条带, 它与由胰蛋白酶水解得到的分子量一致。

Cry1F 含量:

转基因植物: 0.158% (由 ELISA 确定)

微生物: 11.4% (由 SDS PAGE 确定)

非转基因植物: <0.00004% (由 ELISA 确定)

(3) 总蛋白比色实验:

表 10 总蛋白比色实验结果

	Lowry	Bradford
含有 Cry1F 的玉米	81.6%	84.2%
对照组玉米	93.4%	87.4%
含有 Cry1F 的微生物 1599-39	81.8%	nd
含有 Cry1F 的微生物 1599-45	85.4%	nd

Lowry 是研究项目中所规定的方法, Bradford 是在 ELISA 试验中需要的方法, 其中 Bradford 中的结果是三个试验结果的平均值“nd”表示对微生物样品未进行 ELISA 分析。

(4) N-端序列分析

从植物提取的 Cry1F 蛋白的 N-端被明显阻断, 但其 5 个氨基酸序列与所期望的 Cry1F 的 N-端被蛋白酶水解断裂所得到的序列一致, 观察到的序列是“²⁸STGRL”, 上标表示蛋白中的氨基酸残基。期望的 N-端由胰蛋白酶水解获得 (“²⁰VELINEER¹²⁸STGRLPLD”), 在微生物中得到的 Cry1F 中观察到两个序列和一个片断, “²⁰STGRLPL”, “⁴³FLLSEFV” 和 “³³PLDI”。片断开始于 ⁴³F 后跟一个胰蛋白酶位点。

(5) 糖基化作用

利用免疫印迹检测技术检测未发现由玉米表达的 Cry1F 有涉及糖基化作用的翻译后修饰。实验表明微生物提取的 Cry1F 大部分丧失反应活性, 由玉米提取的材料表明有大量的离散分子量的条带, 然而它们与由 Western Blot 法得到的具有免疫活性的条带不相符。

(6) 生物学

表 11 由 top-load 方法测得的 LC₅₀ 结果

材料	LC ₅₀ ng Cry1F/cm ²				
	欧洲玉米螟	烟草蚜虫	秋季粘虫	玉米幼虫	黑毛虫
植物 (1568-022B)	0.58	1.74	2.21	>>15.8*	22.7*
微生物 (1599-39)	0.58	1.88	2.49	51.6	69.2
Dipel 对照**	1.03	0.70	10.5	0.75	189

*:未能用最大剂量法检测出昆虫的 LC₅₀, 其 LC₅₀ 值是由 POLO-PC 程序, 是在急性试验数据之外用外推法计算出来的。

**阳性对照 Dipel® 2X 的 LC₅₀ (ppm 级)

由植物提取 Cry1F 其欧洲玉米螟用营养掺入法测得的 LC₅₀ 为 0.11ppm。微生物提取的

Cry1F 为 0.14ppm (见表 12)。

表 12 两种来源 Cry1F 蛋白杀虫比较

来源	LC ₅₀ ng Cry1F/cm ²			LC ₅₀ ppm Cry1F
	欧洲玉米螟	烟草蚜虫	秋季粘虫	欧洲玉米螟
玉米 Cry1F	0.58	1.74	2.21	0.11
微生物 Cry1F	0.58	1.88	2.49	0.14

已获得的数据已足以比较两种来源的 Cry1F 毒素的生理、生化特性。第一种来源是由基因修饰的玉米中表达的毒素；第二种是由微生物系统表达的毒素，其重组蛋白的产量很高。由 SDS PAGE 及 Western 方法测得的分子量与期望的相符 (68Kda 和 65KdaN-端序列分析)。用固相 Western 方法、液相 ELISA 方法已观察到由植物提取的原料的免疫活性与期望的相符。在控制组玉米中没有观察到交叉反应。由于微生物样品中存在低分子量免疫，故只分析固相免疫活性。

对不同材料的蛋白含量进行了检测，对敏感和非敏感条带分别进行了生物学测试，由植物提取的毒素和由微生物提取的毒素其敏感条带的 LC₅₀ 很难区分，表明了两种原料提取的 Cry1F 的生物等同性，毒素的制备相关活性同样很难区分。

在植物样品中 N-端序列被阻断，但其序列可由色谱推出，推出的序列与由胰蛋白酶水解 (从精氨酸断开) 的 N-端氨基的一致。这是在制备和浓缩毒素的过程中出现的。同样在微生物材料中也发现相同的 N-末端。

转基因玉米、微生物提取的毒素均未发现有糖基化作用。

以上几组实验结果表明：由转基因玉米提取的 Cry1F 蛋白与由微生物提取的 Cry1F 实质等同。由于转基因玉米中 Cry1F 蛋白的含量极低，且他们与微生物中的 Cry1F 实质等同，故在后面的实验中采用微生物中的 Cry1F 作为受试物。

4.2.1 转基因植物及其产品中新生成的物质 (蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、以及代谢产物等) 的特性和功能，表达产物在可食部位及其植物中的含量，特别是表达产物的膳食暴露对人群的影响。

TC1507 玉米品系中新生成的蛋白有两种：Cry1F 蛋白及 PAT 蛋白，Cry1F 蛋白能使 TC1507 玉米品系植物具有高度选择性的杀虫特性；PAT 蛋白可使 TC1507 玉米品系植物对除草剂草胺磷铵盐产生耐受性。Cry1F 蛋白在玉米粒中的含量为 8.4 μg/g，在其它部位的含量见表 1；PAT 蛋白只在叶子中有所表达，其含量的测量值在检测限 (20 pg/μg 总蛋白) 到 40.8 pg/μg 总蛋白之间。

人体接触：玉米中 Cry1F 蛋白在总蛋白中占 0.009%。如果每日蛋白摄入量是完全通过食用玉米获得的 (亦即 50-63g 蛋白/天)，则人类膳食每日摄入量少于 10mg Cry1F 蛋

白/天。此外PAT蛋白在BtCry1F玉米杂交品系1507中不能检出，因此对人类膳食的总蛋白没有显著影响。

4.2.2 外源基因表达（蛋白质）是否存在毒性的毒理学检测

4.2.2.1 外源基因表达蛋白质与已知有毒性的蛋白质和抗营养成分（如蛋白酶抑制剂、植物凝集素）在氨基酸序列相似性上的特征分析。

采用Metcalf等（1996）提出的方法来比较Cry1F蛋白和PAT蛋白与已知致敏原的相似性。至少8个相邻的氨基酸顺序完全相同才构成顺序的显著相似性，此情形下才有必要对其致敏特性作进一步的研究。根据先锋公司PHIGLP-13A/01标准程序进行相似性分析，采用Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) 数据库程序分析关键词为“致敏原”，查询标准DNA和蛋白序列。

Cry1F蛋白显示有15个最相近的不同植物、动物和细菌的蛋白序列，但逐个分析显示没有一种蛋白与Cry1F蛋白有8个或以上的氨基酸顺序完全相同。PAT蛋白显示有14个最相近的不同植物、动物和细菌的蛋白序列，但逐个分析显示没有一种蛋白与Cry1F蛋白有8个或以上的氨基酸顺序完全相同。未见Cry1F蛋白和PAT蛋白与已知致敏原具有相似性。另外，PAT蛋白在以往进行的遗传修饰植物中已经经过安全性评估，研究显示它没有潜在的致敏性（OECD，1999）。

4.2.2.2 外源基因表达蛋白质对热、加工过程和消化的稳定性研究

4.2.2.2.1 项目

体外模拟胃液消化实验、体外模拟肠液消化实验、高温、高压来检验由微生物衍生的Cry1F(tr)蛋白、PAT蛋白对热、加工过程和消化的稳定性。

4.2.2.2.2 方法

(1) 利用微生物产生的Cry1F，在体外用胃蛋白酶分解检测其消化作用来模拟胃消化；另外利用加热、高压来处理Cry1F蛋白；将Cry1F(tr)蛋白水溶液加入到的模拟肠液(SIF, 含1%胰酶)模型系统，同时以非致敏蛋白(植物中常见的酸性磷酸酶)和致敏蛋白(乳球蛋白和卵清蛋白)作为对照，37℃消化。分别于1、5、15、30、60、90和120分钟等时间点取样并进行SDS-PAGE电泳分析，经考马斯亮蓝G250染色后进行观察，然后根据电泳图谱分析各蛋白样品的消化情况。

含Cry1F蛋白的水性培养液在不同温度下放置30分钟后，制成人工食液，喂饲新生的烟草卷叶蛾。在喂饲6天后测定昆虫的死亡率和体重。

(2) PAT微生物蛋白(H-24124)与含水解胃蛋白酶的模拟胃液混合后，在恒温下测定其被消化的过程。消化液被分成相同的等份，在不同的时间点被取样并中和。中和后的

失活试样进行电泳测定。蛋白及消化的片段用电泳进行分离后用考马斯亮蓝染色。牛血清蛋白（BSA）和乳球蛋白分别被选作阳性和阴性对照。对照蛋白处理的条件与供试物质相同，在选定的时间点进行取样。

4.2.2.2.3 结果

（1）在模拟胃液中，微生物得到的Cry1F蛋白的消化性是将蛋白悬浮在室温的模拟胃液中确定的，该胃液中含有不同量的胃蛋白酶。Cry1F：胃蛋白酶（w/w）的范围为1：1~1：1000000，相当于摩尔比率1：2~1：1883000。Cry1F蛋白在摩尔比率为1：100（Cry1F：胃蛋白酶）的条件下，5分钟内全部分解为氨基酸和很小的肽片断。实验表明在摩尔比率为1：100（Cry1F：胃蛋白酶）条件下，Bt毒素在一分钟内被完全水解。Cry1F蛋白于整个实验时间段中（120分钟）在SIF中没有分解。作为对照的非致敏蛋白酸性磷酸酶和致敏蛋白（卵清蛋白）在实验时间段中亦没有分解。致敏蛋白（ β -乳球蛋白）在加入SIF后5分钟内分解。另外加热及高压使Cry1F蛋白失去了免疫活性。

生物测定表明，Cry1F蛋白被置于75℃-90℃之间30分钟后即可失活。

（2）PAT蛋白在5秒钟内被降解到可检测的范围以下。所有的蛋白及片段均用考马斯亮蓝染色。阳性对照BSA在1分钟的时候被消化，阴性对照乳球蛋白在10分钟以内未被消化。

PAT酶在20℃下的活性非常低，随着温度升高，活性逐渐增加，到60℃是达到最大值。在75℃或更高的温度下，半个小时后将完全失活。在pH为7-10的范围的溶液中，30分钟后PAT的活性可提高60%。在pH小于4的环境中，30分钟后，PAT将失活。

4.2.2.2.4 结论

实验结果表明：1) Cry1F在体外模拟胃液中一分钟内可完全水解。2) 离体SIF模型显然不能以实验终点的蛋白水解稳定性区分已知的非致敏蛋白与致敏蛋白。3) Cry1F蛋白于整个实验时间段在SIF中没有分解。在这一点及其它特性上，Cry1F与其它Cry蛋白具有共性。4) Cry1F蛋白被置于75℃-90℃之间30分钟后即可失活。

在体外模拟胃液中PAT可以很容易地被降解和失活。在有胃蛋白酶存在的模拟人体胃液中，纯化的PAT在5秒钟内就可被降解。PAT可以在胃液和肠液中很快被降解。PAT蛋白很容易在胃液和肠液中降解，具有酸性和热不稳定性。

4.2.2.3 外源基因表达蛋白质毒理学试验。

（1）苏云金芽孢杆菌Cry1F蛋白小鼠急性经口毒性试验。采用Albino小鼠进行了急性经口毒性试验，苏云金芽孢杆菌Cry1F蛋白用2%的羧甲基纤维素配制成15%的溶液，以33.7ml/kg. BW灌胃体重为24-29g小鼠10只（雌、雄各半），剂量为5050mg/kg. BW，观察14天。

(2) PAT微生物蛋白对CD-1小鼠急性经口毒性试验。采用CD-1小鼠进行了急性经口毒性试验, PAT微生物蛋白用2%的羧甲基纤维素配制成15%的溶液, 对体重为29.4-32.1g小鼠10只(雌、雄各半)灌胃, 剂量6000mg/kg.BW, (PAT纯蛋白含量约为5000 mg/kg.BW)。由于灌胃量超过2ml/kg.BW, 分两次进行, 间隔1小时。观察14天。

以上两实验过程中未发现临床中毒症状和死亡。供试物对体重的增加也无任何实质的作用。试验后的尸解未发现任何异常现象。1) 苏云金芽孢杆菌Cry1F蛋白的急性经口毒性半数致死剂量(LD₅₀)大于5050mg/kg.B.W。2) PAT微生物蛋白的急性经口毒性半数致死剂量(LD₅₀)大于6000mg/kg.B.W。

4.3 外源基因表达物质是否存在致敏性研究

4.3.1 蛋白质来源的安全性评价

Cry1F蛋白为Bt蛋白的一种, 是苏云金芽孢杆菌产生的一种对特定生物具有高度选择性的杀虫蛋白。Bt蛋白自二十世纪三十年代起作为天然杀虫剂在农业上逐渐得到广泛的应用。对Bt蛋白数十年的实际使用和安全试验证实, 它对人类和动物不具毒性, 对人类不具致敏性。

PAT蛋白由pat基因编码产生。pat基因是来自天然基因经遗传改造而得。目前尚无PAT蛋白对环境不利或毒理作用。BtCry1F玉米TC1507品系亦可被种植者当作耐草胺磷铵盐的品系。已有草胺磷铵盐被安全地用作玉米除草剂的历史。

苏云金芽孢杆菌(cy1F基因的供体)没有引起过敏的历史记载。PAT蛋白或绿色产色链霉菌(PAT基因的来源)都没有引起过敏的报道。

4.3.2 外源基因表达蛋白质与所有已知致敏原氨基酸序列的同源性分析。

将导入的蛋白氨基酸序列与已知的过敏原氨基酸序列进行对比, 对数据库以“过敏原”为关键词检索了标准DNA和蛋白质序列数据库。显著相似性定义为序列中连续8个或更多的氨基酸序列相同。与15个数据库中最接近的序列进行对比。以同样方法将PAT蛋白与已知蛋白过敏原的氨基酸序列进行对比

结果证实Cry1F蛋白及PAT蛋白与已知蛋白质过敏原均没有显著的氨基酸序列相似性。

4.3.3 外源基因表达蛋白质在植物中的含量

利用兔多克隆抗体, 采用直接双抗体夹心ELISA方法定量检测玉米籽粒中表达的Cry1F的含量为71.2-114.8pg/ μ g总蛋白。

利用兔多克隆抗体, 采用直接双抗体夹心ELISA定量检测玉米叶中的PAT蛋白含量为<LOD - 40.8 pg/ μ g总蛋白 (<LOD: 测量值低于20 pg/ μ g总蛋白的检测限度)。

4.3.4 外源基因表达蛋白质对热、加工过程和消化稳定性研究

见4.2.2.2

4.3.5 特异的血清学试验

国际食品生物技术委员会与国际生命科学研究院的致敏性和免疫研究所共同制定了一套分析遗传改良食品致敏性的树状分析法。当基因来自未知是否致敏的生物，如病毒、细菌、昆虫、非食品植物等，首先与已知的过敏蛋白比较氨基酸序列，若有同源性，则用对该过敏原敏感病人的血清做免疫反应；若无同源性，则继续分析该蛋白对消化和加工的稳定性的研究。

根据氨基酸序列分析结果，Cry1F蛋白及PAT蛋白的氨基酸序列与任何影响人类或动物健康的过敏原的氨基酸序列均无相似性和免疫学相关性，认为其不具有致敏性。未见有关特异的血清学试验相关报道。

4.4 无安全食用历史的蛋白质以外的其它成分的潜在毒性

根据公司所提供资料和检索的资料TC1507玉米未见无安全食用历史的蛋白质以外的其它成分。

4.5 植物因基因修饰而改变特性对健康所产生的毒性。

4.5.1 提供的全食品喂饲实验

4.5.1.1 项目 TC1507转基因玉米的大鼠13星期喂饲试验

4.5.1.2 方法

试验用成熟的Cr1:CD(SD) IGS BR大鼠，12只/性别/组。饲料中的配方分别为含33% 1507玉米的H-25346，含33% 33P66玉米的H-25347，含33% 33J56的H-25348，含11%TC1507玉米的H-25349和含11% 33P66玉米的H-25350。饲养天数约为90天。每星期测量受试动物的体重、进食情况及临床特征。在饲养实验开始之前和临近及结束时进行神经行为学及大体观察，并在实验临近结束时进行临床病理学观察。90天的喂养期结束后，解剖受试动物，进行病理全检和切片检查。所有饲料的各种营养组分含量相近，包括纤维/能量组分、氨基酸、矿物质、维生素和重金属。含有转基因Cry1F蛋白的TC1507玉米在相应配方中的含量分别为33%和11%，用Cry1F的ELISA法监测并用欧洲玉米螟（ECB）作生物测定。在实验开始前及临近结束时所作的监测表明，Cry1F蛋白在整个实验进程中含量稳定。

4.5.1.3 结果

喂饲过程中大鼠无一死亡。对雌、雄各组受试动物，就平均体重、体重增量及食物吸收而言，未观察到生物学意义上与食物相关的显著性差异，对雌性各组受试动物，未

观察到进食情况方面的差异。在雄性组中，统计表明喂饲33%TC1507玉米的大鼠进食量较喂饲33% 33P66玉米的大鼠为高，但两组动物在体重、体重增量及食物吸收方面均无显著差异。

就临床毒理特征、大体观察、神经行为学评估、临床病理学观测（包括血液学、临床化学、凝结特性及尿样分析指标）、器官重量、病理全检及切片检查等方面而言，均未观察到各组受试动物有任何与食物相关的毒理学显著性差异。

实验表明，喂饲含转基因玉米(TC1507)与喂饲含非转基因之等位基因品种(33P66)及非转基因常规品种玉米(33J56)的各组受试动物，在病理学上未见显著性差异。

4.5.1.4 结论

综上所述，未见转基因玉米TC1507对动物有不良影响。

4.5.2 国内检验机构进行的全食品喂饲试验。

4.5.2.1 项目 大鼠90天喂养实验

4.5.2.2 方法

按《转基因植物及其产品食用安全性检验—大鼠90天喂养试验》标准进行实验：选用体重63~77克SPF级SD大鼠120只，雌雄各半。按体重以随机均衡二步法分成3组，即转基因玉米组、传统亲本对照组和常规饲料对照组，每组40只动物，雌雄各半。转基因玉米组及传统亲本对照组均以大鼠常规饲料配方为框架，饲料中玉米比例为50%，其余按其营养成分补足蛋白质等必需营养素以满足动物的生长需要。

实验期间观察动物生长活动的一般情况，并对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标（白细胞计数及分类、血红蛋白、红细胞计数、血小板计数、网织红细胞计数）、生化指标（丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、尿素氮、胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白、肌酐、碱性磷酸酶）、脏器系数（心脏、肝脏、肾脏、脾脏、睾丸）和病理组织学指标（心脏、肝脏、肾脏、脾脏、睾丸、卵巢、胃及十二指肠）进行检测。各组数据均采用SPSS10.0 FOR WINDOWS中方差分析进行统计分析，方差不齐者采用非参数统计。

4.5.2.3 结果

将转基因玉米TC1507掺入饲料（比例为50%）喂饲大鼠90天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。各组动物之间的总增重、总进食量、总食物利用率差异均无显著性。实验中、末期各项血液学、生化指标均在本检测单位历史对照范围内。解剖动物时，大体观察未发现异常，各组动物脏器比值与对照组相比，差异均无显著性。病理学检查均未见由受试物引起的异常改变。

4.5.2.4 结论

综上所述，未见转基因玉米TC1507对动物体重、增重、进食量、食物利用率、血液学、生化指标、脏器系数和病理组织学有不良影响。

5 转基因食品的加工方式、加工条件（工业化生产和家庭式制作）对转基因食品关键营养成分生物利用率的改变或对涉及到食品安全的一些成分的影响。

TC1507玉米品种采用现有加工常规玉米的加工工艺进行，不需要采用新的加工工艺加工不会造成食品成分的改变。

6 转基因食品的耐药性

Bt Cry1F玉米TC1507品系中不存在抗生素耐药标记基因的DNA序列。质粒pHP8999含有对卡那霉素具有抗性的基因。这种基因被定名为npt II。这种叫做npt II的基因存在于质粒pHP8999中，其作用是在制备用来产生B. t .Cry1F玉米转化体的DNA过程中帮助选择含有这种质粒的微生物细胞。

pHP8999质粒中的npt II基因和其它载体部分在转化玉米细胞产生B. t .Cry1F玉米转化体TC1507以前已被删除，因此在Bt Cry1F 玉米TC1507品系中没有耐抗生素标记的DNA序列。

将玉米 TC1507 品系的两个世代（T1 和 BC4）中提取的 DNA 和质粒 pHP8999（阳性对照）的 DNA 采用多种限制性内切酶酶切后，并进行 Southern 分析。非转基因玉米中的 DNA 也进行相同酶切和分析，并以此为阴性对照。用于检测耐卡那霉素标记基因 npt II 的探针大小为 536bp，与 npt II 基因编码区域杂交。与预期结果一致，在阳性对照中检测到预期大小的 npt II 片段。在玉米 TC1507 品系 DNA 酶切物中没有任何片段与 npt II 探针杂交，在非转基因对照中亦未发现杂交。通过 Southern 分析证实该植物株中没有 npt II 基因。因此，TC1507 品系转基因玉米不具有耐药性。

7 其他

7.1 转基因植物及其产品中由于基因修饰而出现的新的成分（包括各类营养素）在必要时（如存在毒性、致病性、过敏性、抗营养作用等）及时消除的可能性。

除Cry1F蛋白和PAT蛋白外，未见TC1507玉米中有其他新成分的报道。

三、综合评价：

TC1507 玉米是美国杜邦公司利用重组 DNA 技术研制开发的转 *cry1F* 基因抗虫耐除草剂玉米，导入的 *cry1F* 基因来源于苏云金芽孢杆菌，可编码一种对欧洲玉米螟及其他害虫具有高度选择性的杀虫蛋白；导入的 *pat* 基因来源于天然微生物绿色产色链霉菌，可

编码 PAT 蛋白，使转基因玉米具有耐受除草剂的作用。本文根据国际机构及农业部对转基因植物及其产品食用安全性评价的要求，从受体植物（玉米）、基因供体（Bt 杆菌和绿色产色链霉菌）、转基因操作（微粒加速转化系统）以及转基因玉米（TC1507 玉米）成分分析、新表达蛋白毒性、致敏性等方面对 TC1507 玉米的食用安全性进行了评价。

1. 受体植物

受体植物为常见的农作物之一玉米，是世界三大粮食作物之一。早在公元前 2700 年，玉米在美洲就已经作为食用作物开始种植，现在世界各地几乎都种植玉米。饲喂动物是玉米的最大用途，只有 17%-30% 的玉米被人类直接消费，因此玉米作为人类食物和动物饲料有很长的安全食用史。

玉米不是一种常见的致敏食物，但是近期也有一些关于玉米引发过敏反应的报道，主要症状包括皮肤瘙痒、胃肠不适和呼吸困难。曾有极少数几起有关玉米导致过敏性事件的报道（见 White 和 Pollack, 1995 年）。因食品而引起该过敏反应的原因已被确认是一种脂转移蛋白（见 Pastorello 等, 2000 年）。

研究发现，玉米中天然存在的主要抗营养因子为植酸和胰蛋白酶抑制剂，两者的含量都很低，主要存在玉米的籽粒中。植酸在玉米中以植酸盐的形式存在，结合了 60-75% 的磷原子。由于和磷结合，该物质直接影响玉米中磷的生物利用率。对于非反刍动物来说，玉米中磷的生物利用率低于 15%，但由于反刍动物瘤胃中的微生物可产生植酸酶，后者可破坏植酸盐，释放出磷，所以反刍动物能够大量利用玉米中的磷。为了提高玉米基饲料中磷的生物利用率，通常在饲料中添加植酸酶。植酸在玉米干物质中的含量为 0.45-1.0%。玉米中含有少量的胰蛋白酶抑制剂。

玉米的加工方式多种多样，主要有湿磨法和干磨法两种（见图 1 和图 2）。前者主要生产玉米淀粉，后者则生产玉米粗粉和玉米面粉，他们是进一步生产糖浆、酒精等其它食品的原料。这两种加工方法的副产品可用来生产动物饲料。此外，玉米在碱存在的条件下加热到 85-95℃ 后可生产一种湿润粉糊（Masa），它是制作玉米圆饼和玉米卷的原料。上述玉米加工过程主要采用清洗、筛屑、浸泡、蒸煮、研磨、离心等机械手段，在生产糖浆和酒精等深加工过程时主要采用糖化、发酵和常规酶解方法，因此不认为这些加工过程会对玉米的原有安全性产生影响。

综上所述，受体植物玉米有着被安全食用的历史，在世界各地广泛种植。玉米一般被用作牲畜饲料，以提供丰富的高质量畜产品，并用以生产多种人类食品和大量的工业产品。玉米不是一种常见的致敏食物。玉米中天然存在的主要抗营养因子为植酸和胰蛋

白酶抑制剂，但两者的含量都很低。玉米的加工方式多种多样，主要有湿磨法和干磨法两种，目前没有证据证明这些加工过程会对玉米的原有安全性产生影响。

2. 基因供体

TC1507 玉米的转基因 (transgene) 包括 *cry1F* 基因和 *pat* 基因, 前者来源于苏云金芽孢杆菌黏泽变种的 PS811 品系, 后者来源于绿色产色链霉菌。Bt 杆菌是天然存在于土壤中的革兰氏阳性菌, 自 1958 年在美国被首次注册为杀虫剂后, 至今 40 多年来 Bt 杆菌一直是制造微生物杀虫剂的常用材料。在抗虫转基因作物的研制开发中, Bt 杆菌是转基因的最常用微生物供体之一。大量毒理学资料表明 Bt 杆菌不会产生毒性反应、哺乳动物感染和致病性。从 1995 年到 2001 年, 美国 FDA 对转基因食用作物中表达的各种 Bt 晶体蛋白 (CryI、Cry II、Cry III) 分别制定了容许量豁免 (Tolerance Exemption) 规定, 这些规定是建立在大量毒理学研究未发现 Bt 混合物和晶体蛋白对哺乳动物具有不良作用的基础之上。因此, 从 Bt 杆菌 40 多年来的在农业中的安全应用史来看, 未见该物质对哺乳动物产生健康危害的研究报道。

BtCry1F 玉米品系中的 *pat* 基因来源于天然微生物绿色产色链霉菌中的 *pat* 基因, 但经过了遗传修饰 (Eckes 等, 1989)。对基因进行修饰是为了将鸟嘌呤和胞嘧啶密码子比例改变到与植物 DNA 更近似的水平 (Van Wert, 1994), 与上文讨论的对 Cry1F 活性成分的遗传修饰一致。经遗传修饰后更适合植物表达的 *pat* 基因 PAT 蛋白表达量增加。无证据表明 TC1507 玉米基因供体有安全性问题。

3. 基因操作

杜邦公司采用颗粒加速转化技术 (particle acceleration method) 将外源的目的基因导入玉米组织。插入的基因序列含有 *cry1F* 基因和 *pat* 基因 (目的基因)。所用载体为质粒 pHP8999, 质粒 pHP8999 中不包含会引起质粒传播的 DNA 序列。在 pHP8999 质粒中的 *npt II* (标记基因) 和其它载体部分在转化玉米细胞产生 B. t. Cry1F 玉米转化体 TC1507 以前已被删除, 因此在 Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系中没有耐抗生素标记的 DNA 序列。通过 Southern 分析证实该植物株中没有 *npt II* 基因。

BtCry1F 玉米 TC1507 品系的 DNA 序列中的 9000 个以上的碱基对已经得到了确认。经过确认的区域包括完整的插入片段和末端区域 DNA 序列。在 5'端 3'端均确定了能够专一性鉴定 BtCry1F 玉米 TC1507 品系的序列区域。5'端序列鉴定的 DNA 序列部分进行了分析, 以确定玉米基因组的起点。序列分析结果与 Southern 印迹分析表明除去插入片段中的 *cry1F* 和 *pat* 基因的全长拷贝外, 还有另外一个 *cry1F* 基因片段和 2 个 *pat* 基因片

段。另外的 *cry1F* 基因片段位于全长插入片段的 5'端区域，一个 *pat* 基因片段也存在于全长插入片段的 5'端区域，第 2 个 *pat* 基因片段位于 BtCry1F 玉米 TC1507 品系的全长插入片段的 3'端区域。

在BtCry1F玉米TC1507品系中，*cry1F*和*pat*基因唯一的表达与预期的全长基因一样。采用与PHI8999A中*cry1F*基因1817bp个编码序列、ORF25终止子的723bp和*pat*基因的552bp序列相同的全长探针进行Northern分析证实了在TC1507中只具有预期的全长Cry1F和*pat*的mRNA转录子。Western分析表明只产生预期大小的Cry1F和PAT蛋白。对全部序列的分析证实该序列与能够编码已知致敏或毒性蛋白的氨基酸序列没有同源性。

插入的 *cry1F* 基因在 TC1507 玉米中的遗传分离符合孟德尔显性基因的遗传规律，可以在自授粉或交叉授粉过程中稳定遗传。该基因可以在植株的叶子、茎、谷粒、穗丝和花粉中表达，其中在茎中的表达量最大；但其表达量随着生长期而逐渐下降。*pat* 基因也可以在植株的某些部位表达，目前已在玉米叶子中检测到了 PAT 蛋白的存在 (<40.8 pg/μg 总蛋白)。插入序列自身带有启动子和终止子，不会与受体植物的基因组构成其它可转录的开放阅读框架。

4. 转基因植物及其产品安全性检测

TC1507 玉米各成分含量（蛋白质、脂肪、氨基酸、碳水化合物、灰份、矿物质、维生素 B1、B2、E 及叶酸；植酸和胰蛋白酶抑制因子）均在非转基因对照玉米成分含量的范围之内，而且绝大多数未超出文献报道的含量范围或非转基因对照玉米的历史范围。TC1507 玉米与亲本对照玉米在成分上存在一定的差异，但具有显著性差异的成分的含量范围均处在非转基因对照玉米成分含量的 95%容许区间（tolerance interval）之内。因此，TC1507 玉米与亲本对照玉米和非转基因对照玉米在成分组成上的差异对人体和动物并没有生物学意义和营养学意义，可以认为它们在成分上具有实质等同性。

TC1507玉米品系中新生成的蛋白有两种：Cry1F蛋白及PAT蛋白，Cry1F蛋白能使TC1507玉米品系植物具有高度选择性的杀虫特性；PAT蛋白可使TC1507玉米品系植物对除草剂草胺磷铵盐产生耐受性。Cry1F蛋白在玉米粒中的含量为8.4 μg/g，在其它部位的含量见表3；PAT蛋白只在叶子中表达，其含量的测量值在低于20 pg/μg总蛋白的检测限度到40.8 pg/μg 总蛋白之间。动物毒理学实验显示，Cry1F蛋白和PAT蛋白的小鼠急性经口毒性试验半数致死剂量（LD₅₀）均大于5000mg / kg. B. W，属实际无毒。人体接触方面，玉米中Cry1F蛋白在总蛋白中占0.009%。如果每日蛋白摄入量是完全通过食用玉米获得的（亦即，50-63g蛋白/天），则人类膳食每日摄入量少于10mgCry1F蛋白/天。

此外PAT蛋白在BtCry1F玉米杂交品系1507中不能检出，因此对人类膳食的总蛋白没有显著影响。

TC1507玉米的Cry1F蛋白和PAT蛋白的氨基酸序列与任何影响人类或动物健康的过敏原的氨基酸序列均无相似性和免疫学相关性。离体SIF模型显然不能以实验终点的蛋白水解稳定性区分已知的非致敏蛋白与致敏蛋白。Cry1F蛋白于整个实验过程中在SIF中没有分解。在这一点及其它特性上，Cry1F与其它Cry蛋白具有共性。Cry1F蛋白在离体模拟胃液中很容易被降解（~~1~~¹分钟内）。Cry1F蛋白被置于75℃-90℃之间30分钟后即可失活，具有热不稳定性。在模拟的人体胃液中PAT可以很容易地被降解和失活。在有胃蛋白酶存在的模拟人体胃液中，纯化的PAT在5秒钟内就可被降解。PAT酶在20℃下的活性非常低，随着温度升高，活性逐渐增加，到60℃达到最大值。在75℃或更高的温度下，半个小时后将完全失活。在PH为7-10的范围的溶液中，30分钟后PAT的活性可提高60%。在PH小于4的环境中，30分钟后，PAT将失活。即PAT蛋白很容易在胃液和肠液中降解，具有酸性和热不稳定性。

TC1507转基因玉米的大鼠13星期喂饲试验，试验用成熟的Cr1:CD(SD) IGS BR大鼠，12只/性别/组。饲料中的配方分别为含33% 1507玉米的H-25346，含33% 33P66玉米的H-25347，含33% 33J56的H-25348，含11%TC1507玉米的H-25349和含11% 33P66玉米的H-25350。饲养天数约为90天。每星期测量受试动物的体重、进食情况及临床特征。在饲养实验开始之前和临近及结束时进行神经行为学及大体观察，并在实验临近结束时进行临床病理学观察。90天的喂养期结束后，解剖受试动物，进行病理全检和切片检查。所有饲料的各种组分含量相近，包括纤维/能量组分、氨基酸、矿物质、维生素和重金属。含有转基因Cry1F蛋白的TC1507玉米在相应配方中的含量分别为33%和11%，用Cry1F的ELISA法监测并用欧洲玉米螟（ECB）作生物测定。在实验开始前及临近结束时所作的监测表明，Cry1F蛋白在整个实验进程中含量稳定。

喂饲过程中大鼠无一死亡。对雌、雄各组受试动物，就平均体重、体重增量及食物吸收而言，未观察到生物学意义上与食物相关的显著性差异，对雌性各组受试动物，未观察到进食情况方面的差异。在雄性组中，统计表明喂饲33%TC1507玉米的大鼠进食量较喂饲33% 33P66玉米的大鼠为高，但两组动物在体重、体重增量及食物吸收方面均无显著差异。

就临床毒理特征、大体观察、神经行为学评估、临床病理学观测（包括血液学、临床化学、凝结特性及尿样分析指标）、器官重量、病理全检及切片检查等方面而言，均未观察到各组受试动物有任何与食物有关的毒理学显著差异。

实验表明，喂饲含转基因玉米(TC1507)与喂饲含非转基因之等位基因品种(33P66)及非转基因常规品种玉米(33J56)的各组受试动物，在病理学上未见显著性差异。

天津市卫生防病中心进行的大鼠90天喂养试验表明，将转基因玉米TC1507掺入饲料(比例为50%)喂饲大鼠90天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。各组动物之间的总增重、总进食量、总食物利用率差异均无显著性。实验中、末期各项血液学、生化指标均在本检测单位历史对照范围内。解剖动物时，大体观察未发现异常，各组动物脏器比值与对照组相比，差异均无显著性。病理学检查均未见由受试物引起的异常改变。综上所述，未见转基因玉米TC1507对动物体重、增重、进食量、食物利用率、血液学、生化指标、脏器系数和病理组织学有不良影响。说明转基因玉米TC1507的营养价值及使用安全性与普通非转基因玉米是没有差别的。

5. 转基因食品的加工方式

玉米常用水磨加工来制作食品和动物饲料。水磨被用于榨取玉米谷物所含的成分，如淀粉、谷蛋白和胚芽，这些东西可用于生产各种各样的食品，还可用于医药和工业。干磨的玉米一般被用于酿造工业，用以制造宠物饲料和谷类早餐食品。这些生产加工过程并不会影响到玉米的食用安全性。

6. 转基因食品的耐药性

Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系中不存在抗生素耐药标记基因的 DNA 序列。质粒 pHP8999 含有对卡那霉素具有抗性的基因。这种基因被定名为 npt II。这种叫做 npt II 的基因存在于质粒 pHP8999 中，其作用是在制备用来产生 B. t .Cry1F 玉米转化体的 DNA 过程中帮助选择含有这种质粒的微生物细胞。

pHP8999质粒中的npt II基因和其它载体部分在转化玉米细胞产生B. t .Cry1F玉米转化体TC1507以前已被删除，因此在Bt Cry1F 玉米TC1507品系中没有耐抗生素标记的DNA序列。

将玉米 TC1507 品系的两个世代 (T1 和 BC4) 中提取的 DNA 和质粒 pHP8999 (阳性对照) 的 DNA 采用多种限制性内切酶酶切后，并进行 Southern 分析。非转基因玉米中的 DNA 也进行相同酶切和分析，并以此为阴性对照。用于检测耐卡那霉素标记基因 npt II 的探针大小为 536bp，与 npt II 基因编码区域杂交。与预期结果一致，在阳性对照中检测到预期大小的 npt II 片段。在玉米 TC1507 品系 DNA 酶切物中没有任何片段与 npt II 探针杂交，在非转基因对照中亦未发现杂交。通过 Southern 分析证实该植物株中没有 npt II 基因。因此，TC1507 品系转基因玉米不具有耐药性。

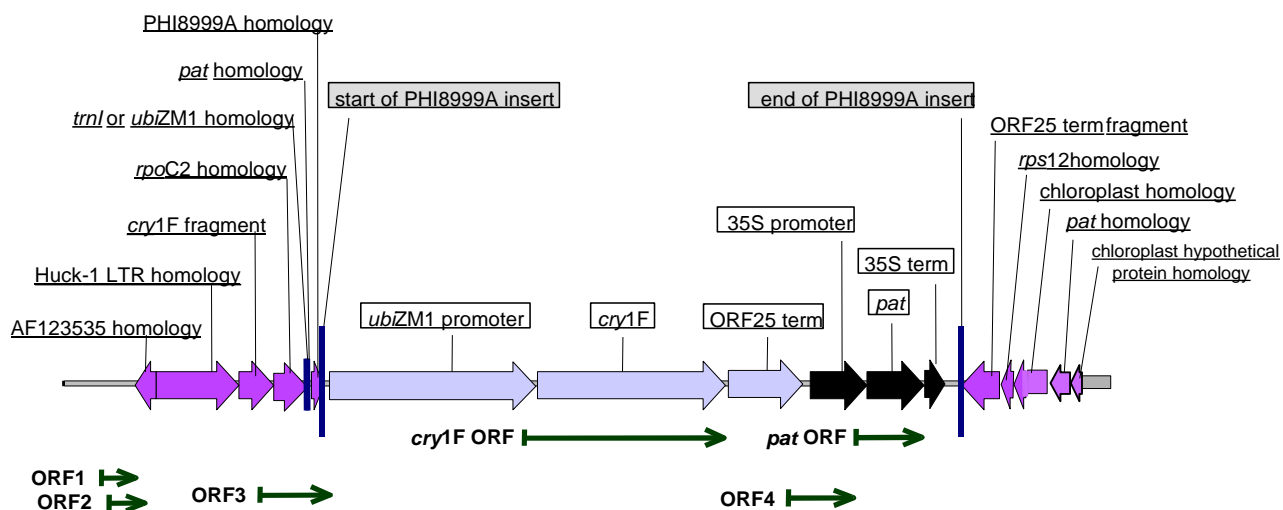
综上所述，利用微粒加速技术，将包含 Cry1F 和 pat 目的基因的 pHP8999 质粒转化到具有很长安全食用历史的玉米基因组中，所形成的 TC1507 玉米可以稳定表达对欧洲玉米螟及其他害虫具有特异毒性而对哺乳动物无害的 Cry1F 蛋白和对除草剂草胺磷产生耐性的 PAT 蛋白，这两种蛋白属实际无毒物且不具有致敏性，不会对人体健康造成不良影响。TC1507 玉米的成分及其含量与对照玉米无生物学意义上的差异。哺乳动物（大鼠）食用含有该玉米的饲料亦无任何毒性反应。因此，可以认为 TC1507 玉米与其亲本对照玉米具有实质等同性。

六、安全性评价附件资料

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列；
2. 目的基因与载体构建的图谱
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）；
4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术
5. 各试验阶段审批书的复印件（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）；
6. 各试验阶段的安全性评价试验总结报告（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）；
7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告；
8. 食品安全性的综合评价报告，包括：A) 必要的动物毒理试验报告；B) 食品过敏性评价试验报告；C) 与非转基因植物比较，其营养成分及抗营养因子分析报告等；
9. 该类转基因植物国内外生产应用概况；
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；
11. 境外公司出口的转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件（境内单位申请安全证书的，本项不填写）；
12. 审查所需的其它相关资料。

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

1.1 目的基因在 Bt Cry1F 玉米 1507 品系中的边缘区域和全长插入序列



Homology:同源体

8999A 插入片段起点

Fragment: 片段

插入片段终点

Promoter:启动子

Term fragment: 终止子片段

体

Chloroplast homology: 叶绿体同源体

Start of PHI8999A insert : PHI

End of PHI8999A insert: PHI 8999A

Term: 终止子

Chloroplast hypothetical: 假定的叶绿

Protein homology: 蛋白同源体

完整的 1507 玉米插入 DNA 序列

核酸序列为公司商业机密，在此公开版本中删除

1.2 细菌产生的 Cry1F 蛋白(MR872)，转化植物产生的 Cry1F 蛋白(Cry1F syn) 和 *Bt* Cry1F 完整蛋白 (Cry1F) 的 δ 内毒素蛋白的氨基酸序列对比

在编码 Cry1F 蛋白的三种基因型中一致的序列代表着相同的残基。假定的蛋白酶剪切位点在活性核心蛋白的起始（大约在第 28 或 31 残基）和末端（大约在第 612 或 615 残基），以 ↓ 标记。请注意转基因 Cry1F 多肽中的单一的 F₆₀₄L 替换。这个差异是由于引入了限制酶切位点以便对完整蛋白的 C 末端部分进行基因克隆而改变了密码子引起的。

MR872 = 用于毒理学研究的细菌产生的 CRY1F 蛋白氨基酸序列

CRY1F syn = TC1507 玉米品系的 CRY1F 蛋白氨基酸序列

CRY1F = *Bacillus thuringiensis var. aizawai* 的 CRY1F 蛋白的氨基酸序列

1			↓ ↓		50
MR872	MENNIQNCV	PYNCLNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Cry1Fsyn	MENNIQNCV	PYNCLNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Cry1F	MENNIQNCV	PYNCLNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
Consensus	MENNIQNCV	PYNCLNPEV	EILNEERSTG	RLPLDISLSL	TRFLLSEFVP
	51				100
MR872	GVGVAFLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Cry1Fsyn	GVGVAFLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Cry1F	GVGVAFLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
Consensus	GVGVAFLFD	LIWGFITPSD	WSLFLQIEQ	LIEQRIETLE	RNRAITTLRG
	101				150
MR872	LADSYEYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Cry1Fsyn	LADSYEYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Cry1F	LADSYEYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
Consensus	LADSYEYIE	ALREWEANPN	NAQLREDVRI	RFANTDDALI	TAINNFTLTS
	151				200
MR872	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Cry1Fsyn	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Cry1F	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
Consensus	FEIPLLSVYV	QAANLHLSLL	RDAVSFGQGW	GLDIATVNNH	YNRLINLIHR
	201				250
MR872	YTKHCLDYN	QGLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Cry1Fsyn	YTKHCLDYN	QGLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Cry1F	YTKHCLDYN	QGLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
Consensus	YTKHCLDYN	QGLENLRGTN	TRQWARFNQF	RRDLTLTVLD	IVALFPNYDV
	251				300
MR872	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPHLMDFM

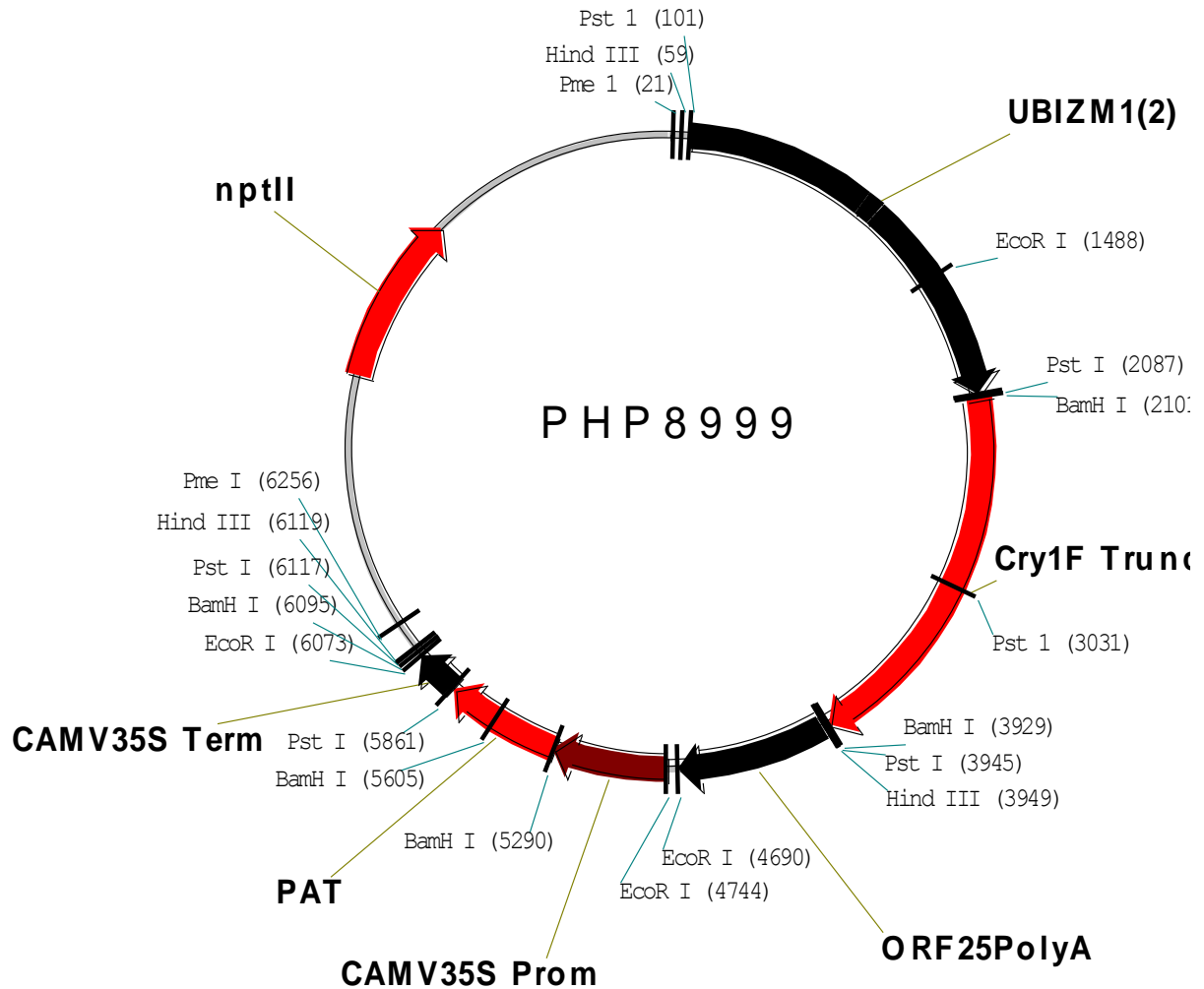
Cry1Fsyn	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPLMDFM
Cry1F	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPLMDFM
Consensus	RTYPIQTSSQ	LTREIYTSSV	IEDSPVSANI	PNGFNRAEFG	VRPPLMDFM
	301				350
MR872	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIADE
Cry1Fsyn	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIADE
Cry1F	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIADE
Consensus	NSLFVTAETV	RSQTVWGGHL	VSSRNTAGNR	INFPSYGVFN	PGGAIWIADE
	351				400
MR872	DPRPFYRTLS	DPV FVRGGFG	NPHYVLGLRG	VAFQQGTGNH	TRTFRNSGTI
Cry1Fsyn	DPRPFYRTLS	DPV FVRGGFG	NPHYVLGLRG	VAFQQGTGNH	TRTFRNSGTI
Cry1F	DPRPFYRTLS	DPV FVRGGFG	NPHYVLGLRG	VAFQQGTGNH	TRTFRNSGTI
Consensus	DPRPFYRTLS	DPV FVRGGFG	NPHYVLGLRG	VAFQQGTGNH	TRTFRNSGTI
	401				450
MR872	DSLDEIPPQD	NSGAPWNDYS	HVLNHVTFVR	WPGEISGSDS	WRAPMFSWTH
Cry1Fsyn	DSLDEIPPQD	NSGAPWNDYS	HVLNHVTFVR	WPGEISGSDS	WRAPMFSWTH
Cry1F	DSLDEIPPQD	NSGAPWNDYS	HVLNHVTFVR	WPGEISGSDS	WRAPMFSWTH
Consensus	DSLDEIPPQD	NSGAPWNDYS	HVLNHVTFVR	WPGEISGSDS	WRAPMFSWTH
	451				500
MR872	RSATPTNTID	PERITQIPLV	KAHTLQSGTT	VVRGPGFTGG	DILRRTSGGP
Cry1Fsyn	RSATPTNTID	PERITQIPLV	KAHTLQSGTT	VVRGPGFTGG	DILRRTSGGP
Cry1F	RSATPTNTID	PERITQIPLV	KAHTLQSGTT	VVRGPGFTGG	DILRRTSGGP
Consensus	RSATPTNTID	PERITQIPLV	KAHTLQSGTT	VVRGPGFTGG	DILRRTSGGP
	501				550
MR872	FAYTIVNING	QLPQRYRARI	RYASTTNLRI	YVTVAGERIF	AGQFNKMTMD
Cry1Fsyn	FAYTIVNING	QLPQRYRARI	RYASTTNLRI	YVTVAGERIF	AGQFNKMTMD
Cry1F	FAYTIVNING	QLPQRYRARI	RYASTTNLRI	YVTVAGERIF	AGQFNKMTMD
Consensus	FAYTIVNING	QLPQRYRARI	RYASTTNLRI	YVTVAGERIF	AGQFNKMTMD
	551				600
MR872	GDPLTFQSFS	YATINTAFTF	PMSQSSFTVG	ADTFSSGNEV	YIDRFELIPV
Cry1Fsyn	GDPLTFQSFS	YATINTAFTF	PMSQSSFTVG	ADTFSSGNEV	YIDRFELIPV
Cry1F	GDPLTFQSFS	YATINTAFTF	PMSQSSFTVG	ADTFSSGNEV	YIDRFELIPV
Consensus	GDPLTFQSFS	YATINTAFTF	PMSQSSFTVG	ADTFSSGNEV	YIDRFELIPV
	601		↓ ↓		650
MR872	TATFEAEYDL	ERAQKAVNAL	FTSINQIGIK	TDVTDYHIDR	VSNLVECLSD
Cry1Fsyn	TATLE*
Cry1F	TATFEAEYDL	ERAQKAVNAL	FTSINQIGIK	TDVTDYHIDQ	VSNLVDCLSD
Consensus	TAT-E-----	-----	-----	-----	-----
	651				700
MR872	EFCLDEKKEL	SEKVKHAKRL	SDERNLLQDP	NFRGINRQLD	RGWRGSTDIT
Cry1Fsyn
Cry1F	EFCLDEKREL	SEKVKHAKRL	SDERNLLQDP	NFKGINRQLD	RGWRGSTDIT
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
	701				750
MR872	IQGGDDVFKE	NYVTLGTFD	ECYLTYLYQK	IDESKLKAYT	RYQLRGYIED
Cry1Fsyn
Cry1F	IQRGDDVFKE	NYVTLPGTFD	ECYPTYLYQK	IDESKLPYPT	RYQLRGYIED
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----
	751				800
MR872	SQDLEIYLIR	YNAKHETVNV	PGTGLWRLS	APSPI.
Cry1Fsyn
Cry1F	SQDLEIYLIR	YNAKHETVNV	LGTGLWPLS	VQSPIRKCGE	PNRCAPHLEW
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----

	801		850
MR872GKCAHSHH FSLDIDVGCT DLNEDLGVWV	IFKIKTQDGH
Cry1Fsyn
Cry1F	NPDLDCSCRD	GEKCAHSHH FSLDIDVGCT DLNEDLDVWV	IFKIKTQDGH
Consensus	-----	-----	-----
	851		900
MR872	ARLGNLEFLE	EKPLVGEALA RVKRAEKKWR DKREKLEWET	NIVYKEAKES
Cry1Fsyn
Cry1F	ARLGNLEFLE	EKPLVGEALA RVKRAEKKWR DKREKLELET	NIVYKEAKES
Consensus	-----	-----	-----
	901		950
MR872	VDALFVNSQY	DRLQADTNIA MIHAADKRVH SIREAYLPEL	SVIPGVNAAI
Cry1Fsyn
Cry1F	VDALFVNSQY	DQLQADTNIA MIHAADKRVH RIREAYLPEL	SVIPGVNVDI
Consensus	-----	-----	-----
	951		1000
MR872	FEELEGRIFT	AFSLYDARNV IKNGDFNGL SCWNVKGHVD	VEEQNNHRSV
Cry1Fsyn
Cry1F	FEEKGRIFT	AFFLYDARNV IKNGDFNGL SCWNVKGHVD	VEEQNNHRSV
Consensus	-----	-----	-----
	1001		1050
MR872	LVVPEWAEV	SQEVRCVCPGR GYLVRTAYK EGYGEGCVTI	HEIENNTDEL
Cry1Fsyn
Cry1F	LVVPEWAEV	SQEVRCVCPGR GYLVRTAYK EGYGEGCVTI	HEIENNTDEL
Consensus	-----	-----	-----
	1051		1100
MR872	KFSNCVEEEV	YPNNTVTCND YTATQEEYEG TYTSRNRGYD	GAYESNSSVP
Cry1Fsyn
Cry1F	KFSNCVEEEV	YPNNTVTCND YTANQEEYGG AYTSRNRGYD	ETYGSNSSVP
Consensus	-----	-----	-----
	1101		1150
MR872	ADYASAYEEK	AYTDGRRDNP CESNRGYGDY TPLPAGYVTK	ELEYFPETDK
Cry1Fsyn
Cry1F	ADYASVYEEK	SYTDGRRDNP CESNRGYGDY TPLPAGYVTK	ELEYFPETDK
Consensus	-----	-----	-----
	1151		1175
MR872	VWIEIGETEG	TFIVDSVELL LMEE*	
Cry1Fsyn	
Cry1F	VWIEIGETEG	TFIVDSVELL LMEE*	
Consensus	-----	-----	

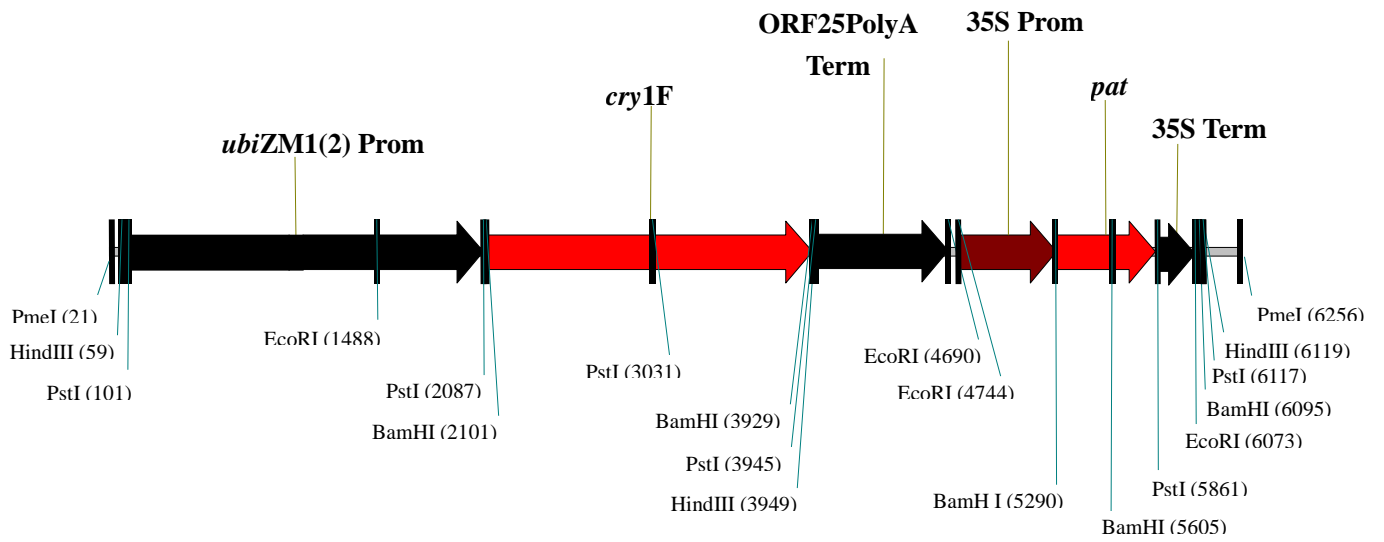
2. 目的基因与载体构建的图谱

2.1 质粒 PHP8999

有关的限制位点与遗传因子均已标出。B.t.Cry1F 玉米第 1507 品系已被含 6235 碱基对的 DNA 片段进行转化，该 DNA 片段是经限制性内切酶的酶切而产生的。



2.2 插入序列 PHI8999A



2.3 抗虫玉米 TC1507 中 PHI8999A 插入序列所包含的遗传因子

在 PHI8999A 插入序列上的位置 (起始碱基对位置)	在 PHP8999 质粒上的位置 (起始碱基对位置)	遗传因子	大小 (bp)	功能
1 – 80	21 – 100	多接头区	80	包含为克隆遗传因子所需的限制位点
81 – 2066	101 – 2086	<i>ubiZM1(2)</i>	1986	来自玉米的 <i>ubiquitin</i> 启动子 (加 5' 端非翻译区) (见 Christesen 等 1992 年发表的材料)
2067 – 2089	2087 – 2109	多接头区	23	包含为克隆遗传因子所需的限制位点
2090 – 3907	2110 – 3927	<i>cry1F</i>	1818	从苏云金芽孢杆菌 (修饰后适合植物表达) 中剪切的合成 <i>cry1F</i> 基因
3908 – 3953	3928 – 3973	多接头区	46	包含为克隆遗传因子所需的限制位点
3954 – 4667	3974 – 4687	ORF25PolyA	714	来自根瘤农杆菌 pTi15955 的终止子
4668 – 4723	4688 – 4743	多接头区	56	包含为克隆遗传因子所需的限制位点
4724 – 5277	4744 – 5297	CaMV 35S 启动子	554	来自花椰菜花叶病毒的启动子 (奥德尔等人 1985 年发布的材料)
5278 – 5829	5298 – 5849	<i>pat</i>	552	合成的耐草胺磷基因 (修饰后适合植物表达), 该基因以来自 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> 的 PPT 乙酰基转化酶基因序列为基础 (见沃莱本等人 1988 年出版的著作和埃克斯等人 1989 年出版的著作)。
5830 – 5846	5850 – 5866	多接头区	17	包含为克隆遗传因子所需的限制位点
5847 – 6050	5867 – 6070	CaMV 35S 终止子	204	来自花椰菜花叶病毒的终止子 (见皮特尔扎克等人 1986 年出版的著作)
6051 – 6235	6071 – 6255	多接头区	185	包含为克隆遗传因子所需的限制位点

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）；

PCR 检测

玉米 TC1507 转化体特异性定性和定量检测方法为公司商业秘密，
在此公开版本中删除

Southern 杂交分析

玉米 TC1507 目的基因整合到受体基因组的分子检测报告

摘要：利用 Southern 印迹杂交确定玉米转化品系 1507 中 *Cry1F* 和 *PAT* 基因插入片段的固有属性。来源于转基因玉米根样品（1507 转化品系：T1S1 和 BC4 世代）和非转基因 GS3 样品的基因组总 DNA 用特定限制性核酸内切酶进行消化，然后用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳分离，以对其基因组中的线性插入片段 PHI8999 进行定性描述。被分离的 DNA 被转移并固定于带正电荷的尼龙膜上，然后与放射标记探针杂交。电泳可以分离大小约为 20,000 个碱基对到 300 个碱基对的片段。标准绘图法分析是，利用来源于与限制性内切酶消化的基因组 DNA 片段特异性杂交的报告探针的自显影信号，从而对插入基因定位。通过使用特定引物来扩增质粒 PHP8999 的五个定义区间，获得报告探针。随后，这些探针用以分别确定插入基因的特定的区间。使用的探针分别为“泛素”、“*cry1F*”、“*pat*”、“CaMV35S”和“卡那霉素”。这些探针采用随机引物法用同位素 ³²P 进行放射性标记。利用放射性信号分析基因组中的转基因结构。

本研究结果表明，玉米 TC1507 的 T1S1 和 BC4 世代含有完整的转基因插入片段。数据也显示在这两个世代中存在预转入基因的不完整的——部分插入片段，此部分插入片段含有全部或部分的 *cry1F* 编码序列。本研究的结果也表明这两个世代都不含有卡那霉素抗性基因。

引言

TC1507转基因玉米的产生是从质粒PHP8999（参看附件2）中由PmeI消化（PHI8999）分离出的一个6235个碱基对的片段，然后用粒子轰击法把这个线性片段插入到玉米基因组中。目的片段（也叫做转基因）含有两个基因表达的区域：*cry1F*（提供抗虫性）和*pat*（提供草铵膦抗性），以及这两种基因表达必需的调控元件（参看附件2）。草铵膦抗性被用作筛选转基因的标记。筛选程序产生了两个世代（T1S1和BC4世代）的玉米，它们的DNA被用于本研究分析。本研究的目的是对外源插入的转基因稳定性进行分析，并证明转基因中不存在编码卡那霉素抗性的基因。在本研究中，分别对来源于玉米1507 T1S1和BC4世代的四个重复（标记为a、b、c和d）的基因组总DNA样品用Southern印迹杂交分析法进行分析。

材料与方法

A. 测试样品

本研究中使用两种测试样品：玉米TC1507中T1S1和BC4世代的基因组DNA。每个测试样品由每个世代4个编号（a、b、c和d）的样品组成（参看表1）。

每种测试样品由主办方提供，状态为透明液体。在Haskell实验室对每种样品的DNA浓度进行测定。样品的浓度范围为1.3-2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。把每个世代中的每个样品的等量的DNA混合一起作为一个基因池，每个基因池分别对应的标记为“T1S1”或者“BC4”。样品混合后，测定每种混合物的终浓度，T1S1的终浓度大约为1.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，BC4大约为1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。在进行限制性内切酶消化之前，每一个测试样品池都要进行短暂的混匀。测试样品在本研究的贮存条件下稳定。未经消化的原始DNA样品采用琼脂糖凝胶电泳检测，用溴化乙锭进行染色。证实，在收到这些测试样品之前，DNA已有少量的降解，但在整个研究过程中降解的量没有发生变化。没有观察到明显的不稳定现象，例如颜色或者物理状态的变化。

B. 对照样品

本研究中使用两种对照样品：GS3玉米的基因组DNA和质粒PHP8999的DNA。GS3是一种非转基因玉米品系，这个品系的基因组DNA被用作阴性对照样品来证

明：1) 杂交探针不存在非特异性的结合，以及2) 区分内源的和转基因泛素启动子区域。质粒PHP8999被用作阳性对照样品，以证明本研究中所使用的杂交探针的特异性。对照样品的批号（适用时）列入表2。

每种对照样品DNA为透明液体，由主办方提供。在Haskell实验室对每种对照的DNA浓度进行测定。PHP8999的浓度大约为1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，GS3的浓度大约为0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。为了提高其浓度，一份的GS3用酒精进行沉淀，然后重新用水进行悬浮溶解。测定处理后的浓度，发现其浓度大约在1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。每种对照样品在进行限制性内切酶消化之前要进行简短的混合。对照样品在本研究的贮存条件下表现稳定。没有观察到明显的不稳定现象，例如颜色或者物理状态的变化。

C. DNA 探针

使用主办方提供的五种探针来分析玉米1507 T1S1和BC4世代的插入基因。每种探针通过对质粒PHP 8999进行PCR扩增而获得，这些探针为：泛素探针（对ubiZM (1)启动子具有特异性）、*cryIF*探针（对*cryIF*基因具有特异性）、CaMV35S探针（对CaMV35S启动子具有特异性）、*pat*探针（对*PAT*基因具有特异性）和卡那霉素探针（对*nptII*卡那霉素抗性具有特异性）。提供的这些探针为未标记的PCR扩增的DNA片段。每种探针相对于质粒PHP8999序列的位置和大小见表3。PHP8999的物理图见附件2。

每种探针均为透明液体，并且由主办方提供，也提供每种探针的DNA浓度。泛素探针、*cryIF*探针、CaMV35S探针、*pat*探针和卡那霉素探针的DNA浓度分别为74、0.56、75、0.56和67 ng/ μl 。这些探针在本研究的贮存条件下表现稳定。没有观察到明显的不稳定现象，例如颜色或者物理状态的变化。

D. 限制性酶和消化

质粒PHP 8999 DNA，GS3基因组DNA，和玉米TC1507 T1S1和BC4世代的基因组DNA由下列限制性酶（或者酶组合，不同酶之间用“/”表示）进行消化：*Pme* I, *Hind* III, *Pst* I, *Bam*H I, *Eco*R I和*Bam*H I/*Eco*R I。对于每个消化反应，每 μg 基因组DNA使用三个单位的每种酶（对于质粒PHP8999使用五个单位的每种酶），反应在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行大约2.5小时。然后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放，直到进行电泳实验。将每个消化反应得到的样本等分后（参看表4）和市售的分子量Marker分别

在五个不同的琼脂糖（0.8%）凝胶中进行分离，然后转移和固定于五个独立带正电荷的尼龙膜上。因此在这五个凝胶/膜上的DNA量是一样的。每个膜按表5与一种特异性探针反应。

由于存在与膜/杂交溶液不相容的技术问题，#1和#2号膜的结果不可用。在确定完全排除CaMV35S 和*pat* 探针后，#3和#4号膜随后分别用泛素和*cry1F*探针进行杂交。在确定完全排除卡那霉素探针后，#5号膜也与泛素探针重新杂交，以便于解释观察到的结果。

E. 标记和杂交

所有探针都采用随机引物法用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 进行标记。用于杂交的标记探针DNA总量见表6。反应液由待标记的DNA、并且有20 μM dCTP, 20 μM dGTP, 20 μM dTTP, 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 的存在，随机引物缓冲液和3个单位Klenow片段组成。每种反应在25 $^{\circ}\text{C}$ 持续进行大约1小时，然后用pH值为8.0、浓度为0.5M/L的EDTA终止反应。用苯酚和氯仿进行抽提，用酒精沉降的方法来除去标记探针中没有结合的脱氧核糖核苷三磷酸盐。用标准TCA沉降法和闪烁计数法确定标记探针的总量。杂交前，在碱性条件下使标记探针变性。

为了在以后的放射自显影中找出分子量Marker，0.5 μg 经*Hind* III消化 λDNA （Roche分子生物化学（Basel瑞士）也利用一处切口移位法用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 进行标记。反应液由待标记DNA、20 μM dCTP, 20 μM dGTP, 20 μM dTTP, 2 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 存在、切口移位缓冲液、和酶（DNA聚合酶I和脱氧核糖核酸酶I）组成。反应在15 $^{\circ}\text{C}$ 温度下进行大约35分钟，然后用pH值为8.0、浓度为0.2M/L的EDTA冷却并加热约10分钟至65 $^{\circ}\text{C}$ 。用苯酚和氯仿进行抽提，用酒精沉降的方法来除去标记探针中没有结合的脱氧核糖核苷三磷酸盐。用标准TCA沉降法和闪烁计数法确定标记探针的总量。用水进行适当的稀释，使得每种杂交的计数大约为40000次。杂交前，在碱性条件下使标记探针变性。

杂交时，每个膜与对应的变性探针和40000次计数的*Hind* III消化的 λ 变性探针进行杂交。膜和探针在10%葡聚糖硫酸酯、1%SDS、1M NaCl和0.5毫克经修饰和变性的鲑鱼精DNA中在65 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。第二天，在室温条件下用2倍SSC洗膜两次，每次大约5-10分钟。然后在60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用2倍SSC和1%SDS洗两次，每次

15-30分钟。最后在室温条件下用0.1倍SSC洗大约15-30分钟。然后将膜用自封袋进行包裹,随即放在磷光板下过夜。用分子动力学磷光影像扫描分析仪进行扫描,对扫描所得的图像进行注释和打印。然后,将装有膜的自封袋放于-80℃有增光屏的盒子里面的X光胶片下面。曝光后,用柯达显影剂冲洗胶片。

表7表明:如果目的基因完整的插入基因组,那么使用的五种不同探针的每一种都会获得预期大小的片段。应该注意的是如果卡那霉素基因污染了原有的转化,那么卡那霉素探针会获得预期大小的片段。

用*Pme* I酶切理论上会产生一个可以用泛素、*cryIF*、CaMV35S和*pat*探针检测的 ≥ 6235 个碱基对的片段,以及产生一个可以用卡那霉素探针检测的大小为3269个碱基对的片段。

用*Hind* III酶切理论上会产生一个可以用泛素和*cryIF*探针检测的大小为3890个碱基对的片段,和可以用CaMV35S和*pat*探针检测的一个大小为2170个碱基对的片段,以及产生一个可以用卡那霉素探针检测的大小为3444个碱基对的片段。

用*Pst* I酶切理论上会产生一个可以用泛素探针检测的大小为1986个碱基对的片段,和可以用*cryIF*探针检测的大小为914个碱基对和944个碱基对的片段,并且产生一个可以用CaMV35S和*pat*探针检测的大小为1916个碱基对的片段,以及产生一个可以用卡那霉素探针检测的大小为3488个碱基对的片段。

用*Bam*H I酶切理论上会产生一个可以用泛素探针检测的 >2080 个碱基对的片段,产生一个可以用*cryIF*探针检测的大小为1828个碱基对的片段,产生一个可以用CaMV35S探针检测的大小为1361个碱基对的片段,产生一个可以用*pat*探针检测的大小为315个碱基对和一个它可以用卡那霉素探针检测的大小为490个碱基对的片段和5510个碱基对的片段。

用*Eco*R I酶切理论上会产生一个可以用泛素探针检测的 >1467 个碱基对的片段,产生一个可以用*cryIF*探针检测的大小为3202个碱基对的片段,产生一个可以用CaMV35S和*pat*探针检测的大小为1329个碱基对的片段,以及产生一个可以用卡那霉素探针检测的大小为4919个碱基对的片段。

用*Bam*H I/*Eco*R I酶切理论上会产生一个可以用泛素探针检测的 >1467 个碱基对

的片段，产生一个可以用*cryIF*探针检测的大小为1828个碱基对的片段，产生一个可以用CaMV35S探针检测的大小为546个碱基对的片段，一个可以用*pat*探针检测的大小为315个碱基对和一个大小为468个碱基对的片段，以及产生一个可用卡那霉素探针检测的大小为4897个碱基对的片段。

请应注意，利用*Hind III*，*Pst I*，和*BamH I*进行限制性酶切消化的主要目的是对*cryIF*基因及其泛素启动子进行分析。*Hind III*限制性酶切泛素启动子5'端和*cryIF*编码序列的3'端。*Hind III*酶切消化的目的是确定是否存在完整长度的*cryIF*基因，其启动子是否完整。*Pst I*酶切消化主要是提供一个完整泛素启动子是否存在的资料，因为这种酶主要在这个启动子的两端进行剪切。*BamH I*酶切消化的目的是提供一个完整*cryIF*编码序列是否存在的资料，因为这种酶对这种编码序列的5'端和3'端进行剪切。

利用*BamH I*，*EcoR I*以及*BamH I*和*EcoR I*组合进行限制性酶切消化的主要目的是对*PAT*基因及其CaMV35S启动子进行分析。*BamH I*酶切位点在*PAT*基因5'端和3'端之间，大小约为150个碱基对的范围内。*EcoR I*酶切位点在CaMV35S启动子的5'端和*PAT*基因的CaMV35S终止子。这两种酶切消化的目的是提供一个完整*PAT*基因及其CaMV35S启动子是否存在的资料。利用*BamH I*和*EcoR I*进行额外酶切消化是为了确定：与CaMV35S启动子相对应的一个大小为546个碱基对的片段在与CaMV35S探针杂交后是否能够检测得到。

*Pme I*酶切消化的目的是分离用于玉米TC1507的整个插入片段（PHI8999）。

结 果

利用每种探针观察到的片段大小，总结见表8。注意与阴性对照栏中的大小相同的片段带（在印迹中标记为“1”）用“a”表示。预期大小的片段用“b”表示。

A. 泛素探针

如图1所示，泛素探针在T1S1和BC4样品中检测到了一个大小为23000个碱基对的*Pme I*酶切片段；大小为3890和6500个碱基对的*Hind III*酶切片段；大小为1986和23,000个碱基对的*Pst I*酶切片段；大小分别为9000，15,000和20,000个碱基对的*BamH I*酶切片段；大小分别为1700，3000，3500，4000，4100，9400和23,000个碱基对的*EcoR I*酶切片段；以及大小分别为1700，3000，4000和9000个

碱基对的*BamH I/EcoR I*酶切片段。在阴性对照GS3DNA中也检测到了大小为23,000个碱基对的*Pme I*酶切片段，大小为6500个碱基对的*Hind III*酶切片段，大小为1986和23,000个碱基对的*Pst I*酶切片段，大小分别为9000，15,000，和20,000个碱基对的*BamH I*酶切片段，大小为1700，4000和4100个碱基对的*EcoR I*酶切片段，以及大小为1700个碱基对的*BamH I/EcoR I*酶切片段。在标记为“4”（质粒对照栏）的栏中看到的谱带，它可以表明杂交使用的泛素探针的特异性。在质粒对照栏中，对于*Pst I*，*EcoR I*和*BamH I/EcoR I*酶切消化而言，可以观察到非预期的谱带（在预期谱带下面）。出现这种情况可能是由于片段的再循环，导致其比凝胶中的线性同等物的分辨率要低。

B. *cryIF* 探针

如图2所示，*cryIF*探针在T1S1和BC4样品中检测到了大小为一个23000个碱基对的*Pme I*酶切片段；大小为1000，2000，3890和4000个碱基对的*Hind III*酶切片段；大小为914，944，6500和23,000个碱基对的*Pst I*酶切片段；大小为1828和8000个碱基对的*BamH I*酶切片段；大小为3000，3202和23,000个碱基对的*EcoR I*酶切片段；以及大小为1828，3000，5000和8000个碱基对的*BamH I/EcoR I*酶切片段。在阴性对照GS3DNA中也检测到了大小为23,000碱基对的*Pme I*酶切片段，大小为1000和2000个碱基对的*Hind III*酶切片段，大小为23,000个碱基对的*Pst I*酶切片段，以及大小为5000个碱基对的*BamH I/EcoR I*酶切片段。在标记为“4”的栏中看到的带表明了杂交使用的*cryIF*探针的特异性。在质粒对照栏中，对于*Pst I*酶切消化观察到非预期的谱带（在预期谱带的下面）。出现这种情况可能是由于片段的再循环，导致其比凝胶中的线性同等物的分辨率要低。

C. CaMV35S 探针

如图3所示，CaMV35S探针在T1S1和BC4样品中检测到了一个大小为23000个碱基对的*Pme I*酶切片段；大小为2170个碱基对的*Hind III*酶切片段；大小为1916个碱基对的*Pst I*酶切片段；大小为1361个碱基对的*BamH I*酶切片段；大小为1329个碱基对的*EcoR I*酶切片段；以及大小为546个碱基对的*BamH I/EcoR I*酶切片段。在标记为“4”的栏中看到的带表明了杂交使用的CaMV35S探针的特异性。在质粒对照栏中，对于*Pst I*酶切消化观察到非预期的谱带（在预期谱带的下面）。出现这种情况可能是由于片段的再循环，导致其比凝胶中的线性同等物的分辨率

要低。

D. *pat* 探针

如图4所示, *pat*探针在T1S1和BC4样品中检测到了一个大小为23000个碱基对的*Pme* I酶切片段; 大小为2170个碱基对的*Hind* III酶切片段; 大小为1916个碱基对的*Pst* I酶切片段; 大小为315和490个碱基对的*Bam*H I 酶切片段; 大小为1329个碱基对的*Eco*R I酶切片段; 以及大小为315和468个碱基对的*Bam*H I/*Eco*R I酶切片段。在标记为“4”的栏中看到的带表明了杂交使用的*pat*探针的特异性。在质粒对照栏中, 对于*Pst* I酶切消化观察到非预期的谱带(在预期谱带的下面)。出现这种情况可能是由于片段的再循环, 导致其比凝胶中的线性同等物的分辨率要低。

E. 卡那霉素探针

如图5所示, 卡那霉素探针在T1S1和BC4样品的酶切消化结果中没有检测到任何谱带。在标记为“4”的栏中看到的谱带表明了杂交使用的卡那霉素探针的特异性, 并且成功地进行了杂交。在质粒对照栏中, 对于*Pst* I酶切消化观察到非预期的谱带(在预期谱带的下面)。出现这种情况可能是由于片段的再循环, 导致其比凝胶中的线性同等物的分辨率要低。

讨论

本研究的结果明确了玉米TC1507在亲本DNA中插入了一个PHI 8999完整长度的片段, 而且含有*cry*IF的一个非预期部分。并且也表明了玉米TC1507中不含有卡那霉素抗性基因*npt*II。

得出玉米TC1507中含有一个完整长度的插入片段PHI 8999这样的结论是基于以下几个杂交试验的结果。在与对泛素启动子和*cry*IF特异性的探针杂交后, *Hind* III酶切消化产生了预期的大小为3890个碱基对的片段。泛素启动子被认为是完整的, 其理由是用*Pst* I酶切消化后与泛素探针杂交产生了一个预期的大小为1986个碱基对的片段。当基因组DNA用*Bam*H I酶切消化及与*cry*IF探针杂交后存在预期的大小为1828个碱基对的片段, 表明存在完整的*cry*IF编码序列。*Eco*R I限制性内切酶在*PAT*基因的CaMV35S启动子的5'端和CaMV35S终止子3'端切开, 如果玉米TC1507中含有*PAT*基因完整部分和CaMV35S启动子, 它就会产生一个大小为1329个碱基对的片段。在与*pat*和CaMV35S探针杂交后可以观察到这个大

小为1329个碱基对的片段。完整*PAT*基因被证实是存在的，因为*BamH I*酶切消化并且与*pat*探针杂交后观察到了预期的片段。证实了存在完整的CaMV35S启动子，因为在进行*BamH I*和*EcoR I*双酶切消化并且与CaMV35S探针杂交后，观察到了预期的大小为546个碱基对的片段。另外，如果存在的是完整长度的片段，*Hind III*酶切消化会产生一个大小为2170个碱基对的含有CaMV35S启动子和 *pat* 基因的片段；在与CaMV35S和*pat* 探针杂交后观察到了这个预期大小的片段。

用*Pme I*进行酶切消化，目的是释放完整序列的插入片段PHI 8999。然而，没有观察到预期的大小为6235个碱基对谱带，最大可能是由于PHI 8999插入片段的3'端或5'端，也可能是由于两端都丢失了*Pme I*位点。

*cryIF*序列非预期部分的证据是*Hind III* 和 *Pst I*酶切消化并且与*cryIF*和泛素探针杂交后得到的试验结果。*Hind III*酶切消化和与*cryIF*探针杂交得到两条谱带：一条是预期的大小为3890个碱基对的带，另外一条是非预期部分，它比较大，估计大小为4000个碱基对。*Hind III*酶切消化产物与泛素探针杂交得到一条预期大小的谱带，没有大约为4000个碱基对大小的带出现。这表明启动子区在这个非预期部分中要么不存在，要么就是不完整。本研究使用的泛素DNA探针不能检测出小部分的泛素启动子，因为这种探针是从大小为120个碱基对至大小为1707个碱基对的泛素启动子的片段中制备的。换句话说，这个探针对大小约为300个碱基对的*cryIF*基因5'端的泛素启动子区域是不能检测的。其他的酶切消化都不是为提供非预期*cryIF*基因的泛素启动子是否存在的证据而特别设计的。用泛素探针观察到了另外的片段，特别是进行*EcoR I*和/或*BamH I*酶切消化后。然而，这些都被认为是来源于玉米内源泛素启动子。另外，在用*Pme I*和*Pst I*酶切消化后使用泛素和*cryIF*探针观察到了较大的片段（大小约为23000 kb）。这两种特定限制性内切酶产生的主要片段大小大约为23000 kb，与总DNA用溴化乙锭染色检测到的结果（数据未列出）相同。此外，与CaMV35S、*pat*和卡那霉素印迹相比，泛素和*cryIF*印迹的非特异性背景总体水平较高。这可能是由于泛素和*cryIF*探针是其他探针大约两倍长度的原因，使得它们更可能发生非特异性结合。因此，除了存在玉米内源泛素启动子的原因外，用泛素和*cryIF*探针观察到的非预期的大片段可能是由于非特异性结合而产生的。

结论

从本研究结果可以得出以下结论：

- 玉米TC1507 T1S1和BC4世代插入了一个PHI 8999完整长度的片段。本研究中采用的基于限制性内切酶消化结合探针技术观察预期片段大小的方法，证实了这个结论。但是，出现了用泛素和*cryIF*探针观察到非预期片段的异常情况，这被认为是玉米内源泛素启动子存在的而造成的，或者可能是由于泛素和*cryIF*探针的非特异性结合引起的。
- 玉米TC1507 T1S1 和BC4世代含有*cryIF*基因非预期片段；用*Hind III*酶切消化并且与*cryIF*探针杂交后可以观察到一个大小约为4000个碱基对的片段。非预期*cryIF*片段在玉米TC1507基因组中的位置和大小目前仍不清楚。根据资料还不能确定这些非预期的片断是否含有泛素启动子区域。
- 玉米TC1507 T1S1 和BC4世代不含有卡那霉素抗性基因*nptII*。

记录和样品存放

样本(如果有的话)、原始数据和最终报告应存放在特拉华纽华克杜邦Haskell实验室，或者存放于特拉华威尔明顿的铁山档案管理处，邮编19802。

表格

表 1: 玉米 TC1507 基因组 DNA 编号

玉米TC1507基因组DNA			
T1S1 世代		BC4 世代	
编号	Haskell编号	编号	Haskell编号
T1S1-1507-1A	H-24258	BC4-1507-4A	H-24262
T1S1-1507-1B	H-24259	BC4-1507-4B	H-24263
T1S1-1507-1C	H-24260	BC4-1507-4C	H-24264
T1S1-1507-1D	H-24261	BC4-1507-4D	H-24265

表 2: 对照样品 DNA 的编号

非转基因玉米 (GS3; 阴性对照)		质粒PHP 8999 (阳性对照)	
编号	Haskell编号	编号	Haskell编号
不适用	H-24365	15472	不适用

表 3: 相对于质粒 PHP 8999 的探针位置汇总

杂交探针	探针大小 (单位: kb)	质粒PHP 8999 位置 (单位: bp)	注释
泛素	1587	120-1707	与 <i>cry1F</i> 泛素启动子区杂交
<i>cry1F</i>	979	2548-3527	与 <i>cry1F</i> 的编码区杂交
CaMV35S	438	4791-5229	与 <i>pat</i> 的CaMV35S启动子区杂交
<i>pat</i>	309	5537-5846	与 <i>pat</i> 的编码区杂交
卡那霉素	536	7497-8033	与卡那霉素编码区杂交

表 4: 每个酶切消化 DNA 的上样量和分子量 Marker 上样量

DNA 消化	每份数量
T1S1	5 µg
BC4	5 µg
GS3	5 µg
PHP 8999	9.5 pg (相当于1个拷贝)
噬菌体(<i>Hind</i> III消化)	1 µg

表 5: 杂交探针与膜的对应关系

杂交探针	膜 (凝胶) 号分配
泛素	1
<i>cry</i> 1F	2
CaMV35S	3
<i>pat</i>	4
卡那霉素	5

表 6: 标记反应中杂交探针使用量

杂交探针	标记反应中的使用量
泛素	37 ng
<i>cry</i> 1F	10 ng
CaMV35S	37.5 ng
<i>pat</i>	10 ng
卡那霉素	33.5 ng

表 7：预期的杂交片段大小汇总（单位：个碱基对）

限制性内切酶	杂交探针名称				
	泛素	<i>cry 1F</i>	CaMV35S	<i>pat</i>	卡那霉素
<i>Pme I</i>	≥6235	≥6235	≥6235	≥6235	3269
<i>Hind III</i>	3890	3890	2170	2170	3444
<i>Pst I</i>	1986	914 944	1916	1916	3488
<i>BamH I</i>	>2080	1828	1361	315 490	5510
<i>EcoR I</i>	>1467	3202	1329	1329	4919
<i>BamH I/EcoR I</i>	>1467	1828	546	315 468	4897

表 8: T1S1 和 BC4 样本中观察到的片段大小汇总 (估计大小 (单位: bp))

限制性内切酶	杂交探针名称				
	泛素	<i>cry</i> 1F	CaMV35S	<i>pat</i>	卡那霉素
<i>Pme</i> I	23,000 ^a	23,000 ^a	23,000	23,000	未观察到片段
<i>Hind</i> III	3890 ^b 6500 ^a 20,000 ^c	1000 ^a 2000 ^a 3890 ^b 4000	2170 ^b	2170 ^b	未观察到片段
<i>Pst</i> I	1986 ^{a,b} 23,000 ^a	914 ^b 944 ^b 6500 23,000 ^a	1916 ^b	1916 ^b	未观察到片段
<i>Bam</i> H I	9000 ^a 15,000 ^a 20,000 ^a	1828 ^b 8000	1361 ^b	315 ^b 490 ^b	未观察到片段
<i>Eco</i> R I	1700 ^a 3000 3500 4000 4100 ^a 6500 ^c 9400 23,000	3000 3202 ^b 23,000	1329 ^b	1329 ^b	未观察到片段
<i>Bam</i> H I/ <i>Eco</i> R I	1700 ^a 3000 4000 ^a 6500 ^c 9000	1828 ^b 3000 5000 ^a 8000	546 ^b	315 ^b 468 ^b	未观察到片段

^a 也在阴性对照中观察到

^b 预计片段

^c 仅在阴性对照中观察到

图

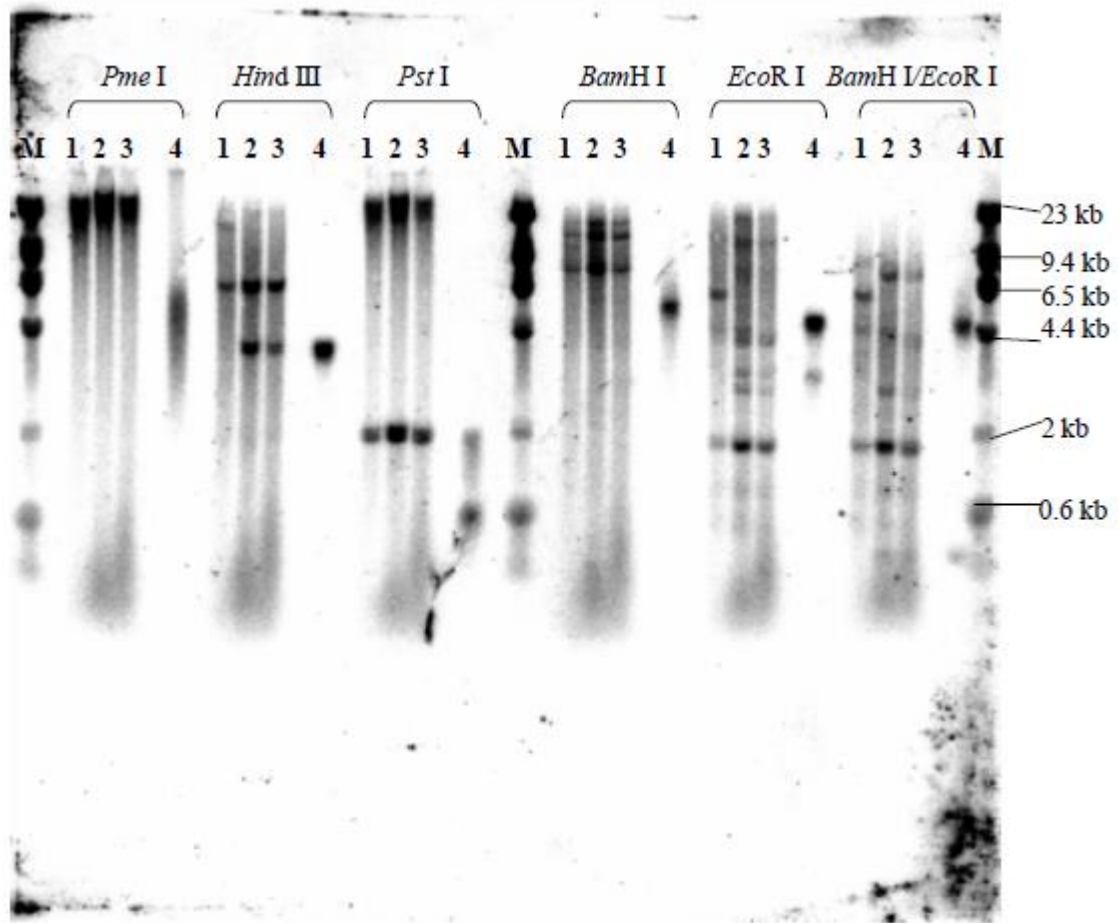


图 1 Southern 印迹分析玉米 TC1507-泛素探针

泳道包括:

- 1: G3 非转基因对照(5 μ g)
- 2: T1S1 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 3: BC4 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 4: 质粒 PHP8999 对照(9.5 pg, 相当于 1 个拷贝)
- M: 标准分子量刻度(用 *Hind*III 切割的 Λ DNA)

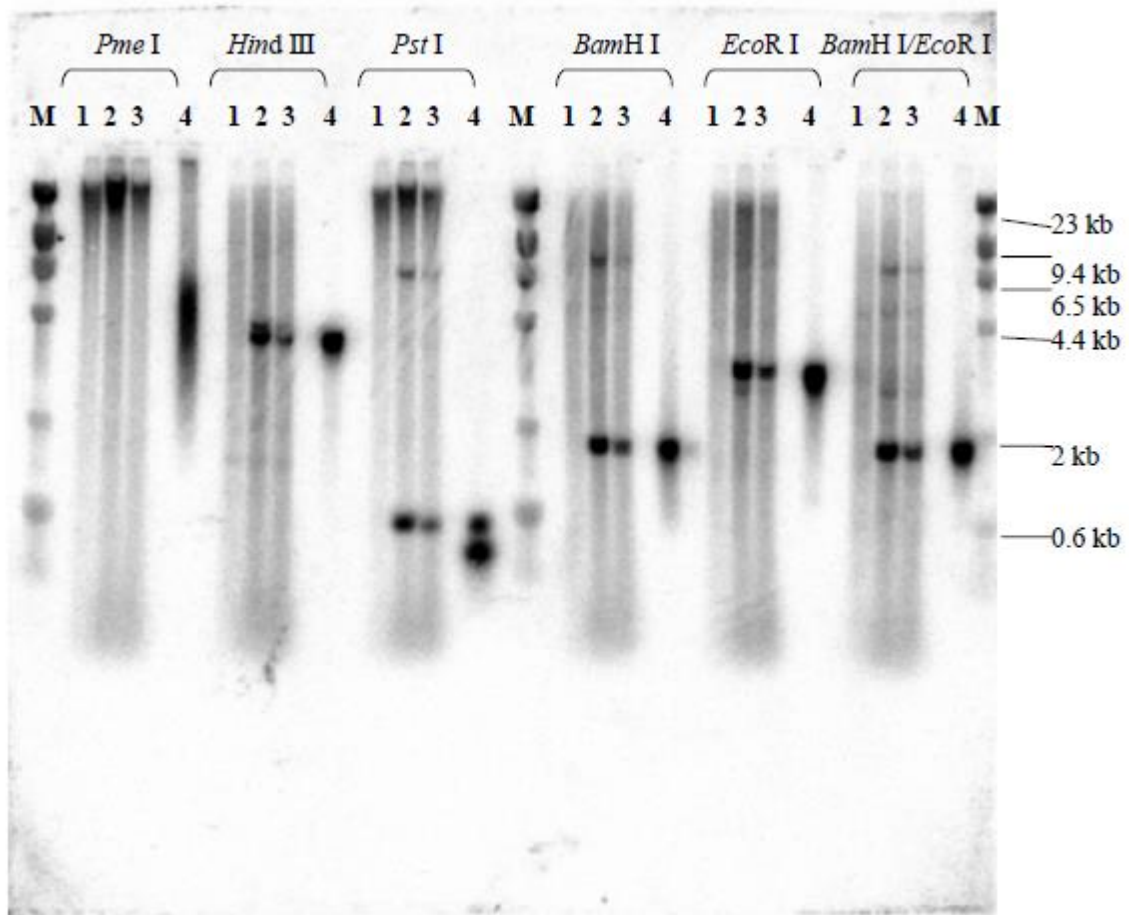


图2 Southern 印迹分析玉米 TC1507-*cry1F* 探针

泳道包括:

- 1: G3 非转基因对照(5 μ g)
- 2: T1S1 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 3: BC4 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 4: 质粒 PHP8999 对照(9.5 pg, 相当于 1 个拷贝)
- M: 标准分子量刻度(用 HindIII 切割的 Lambda DNA)

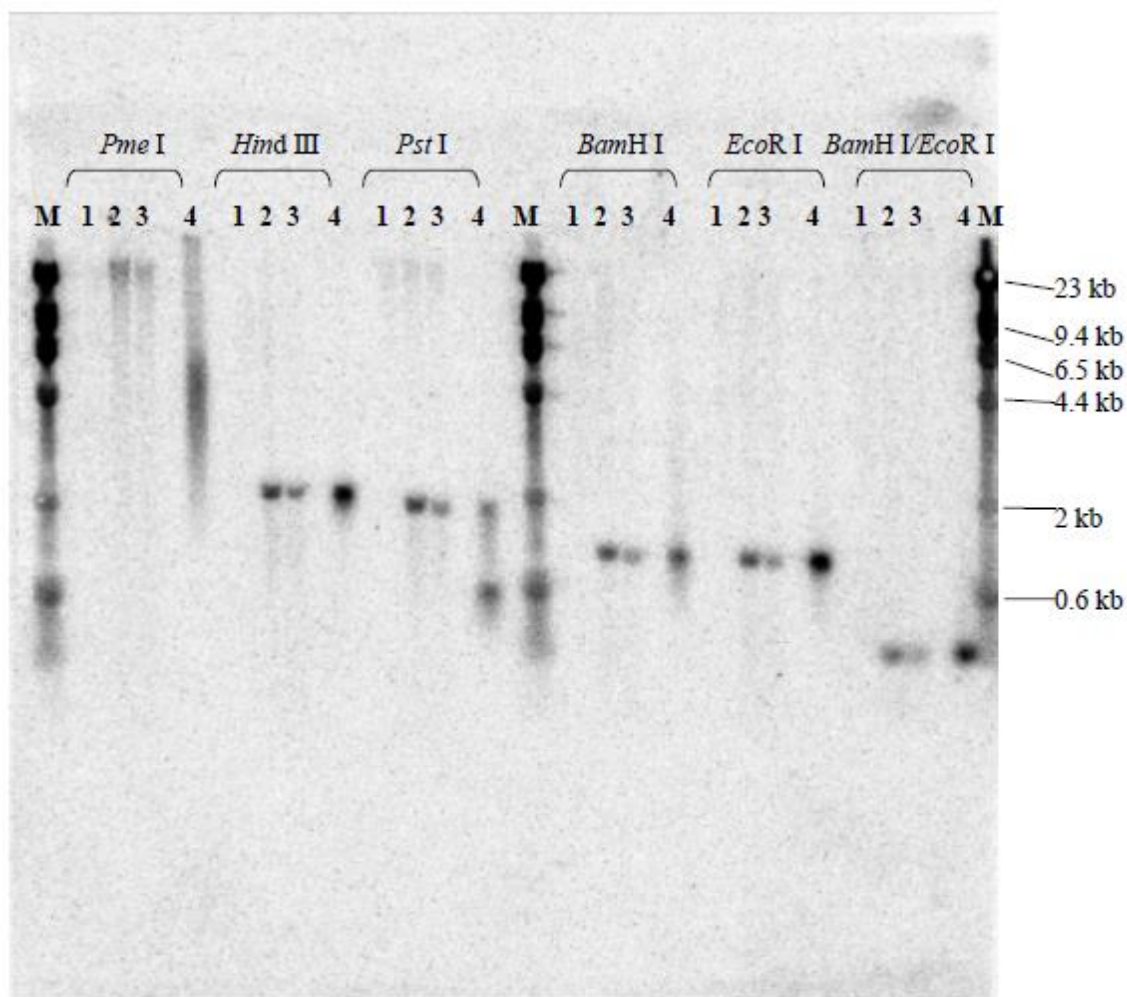


图3 Southern 印迹分析玉米 TC1507-CaMV35S 探针

泳道包括:

- 1: G3 非转基因对照(5 μ g)
- 2: T1S1 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 3: BC4 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 4: 质粒 PHP8999 对照(9.5 pg, 相当于 1 个拷贝)
- M: 标准分子量刻度(用 HindIII 切割的 Lambda DNA)

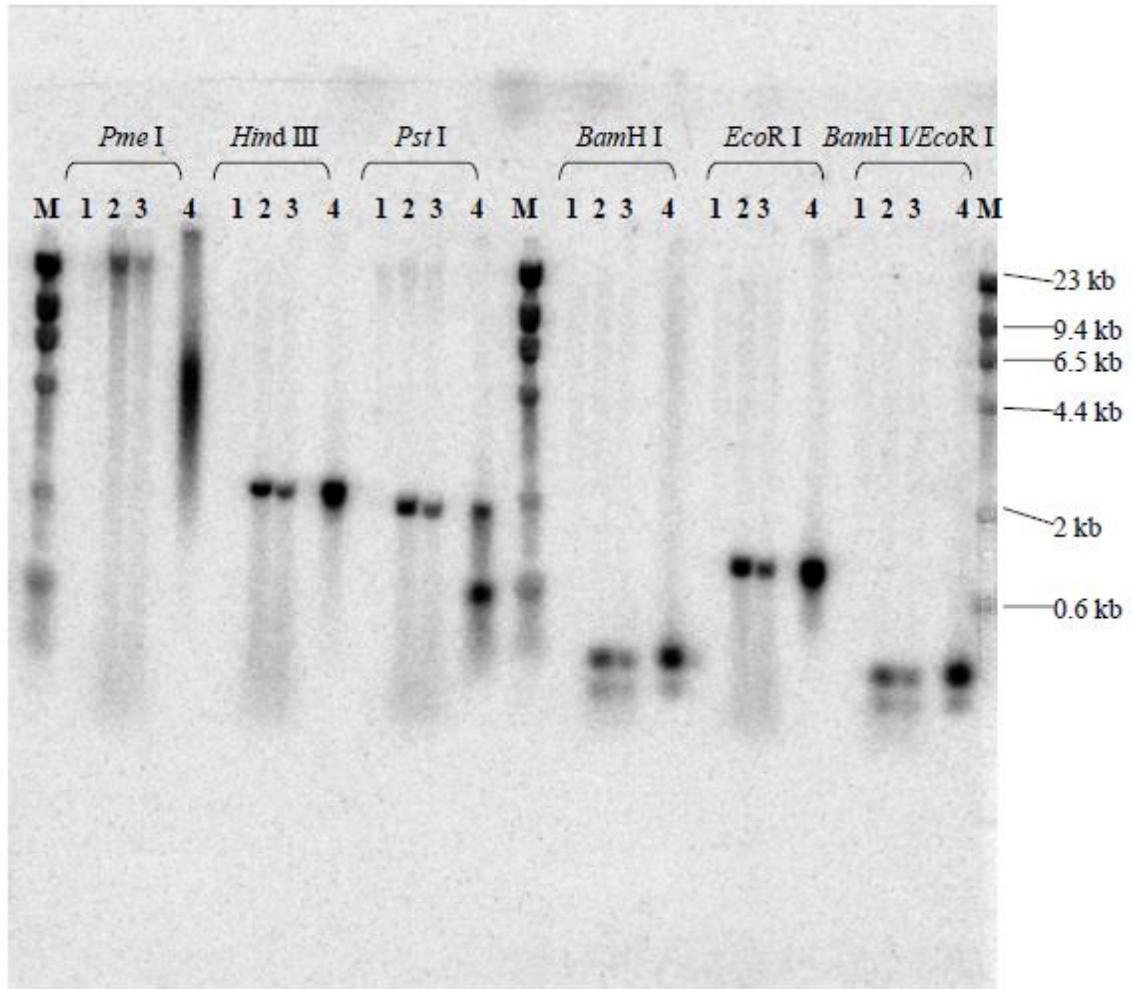


图4 Southern 印迹分析玉米 TC1507-pat 探针

泳道包括:

- 1: G3 非转基因对照(5 μ g)
- 2: T1S1 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 3: BC4 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 4: 质粒 PHP8999 对照(9.5 pg, 相当于 1 个拷贝)
- M: 标准分子量刻度(用 HindIII 切割的 Lambda DNA)

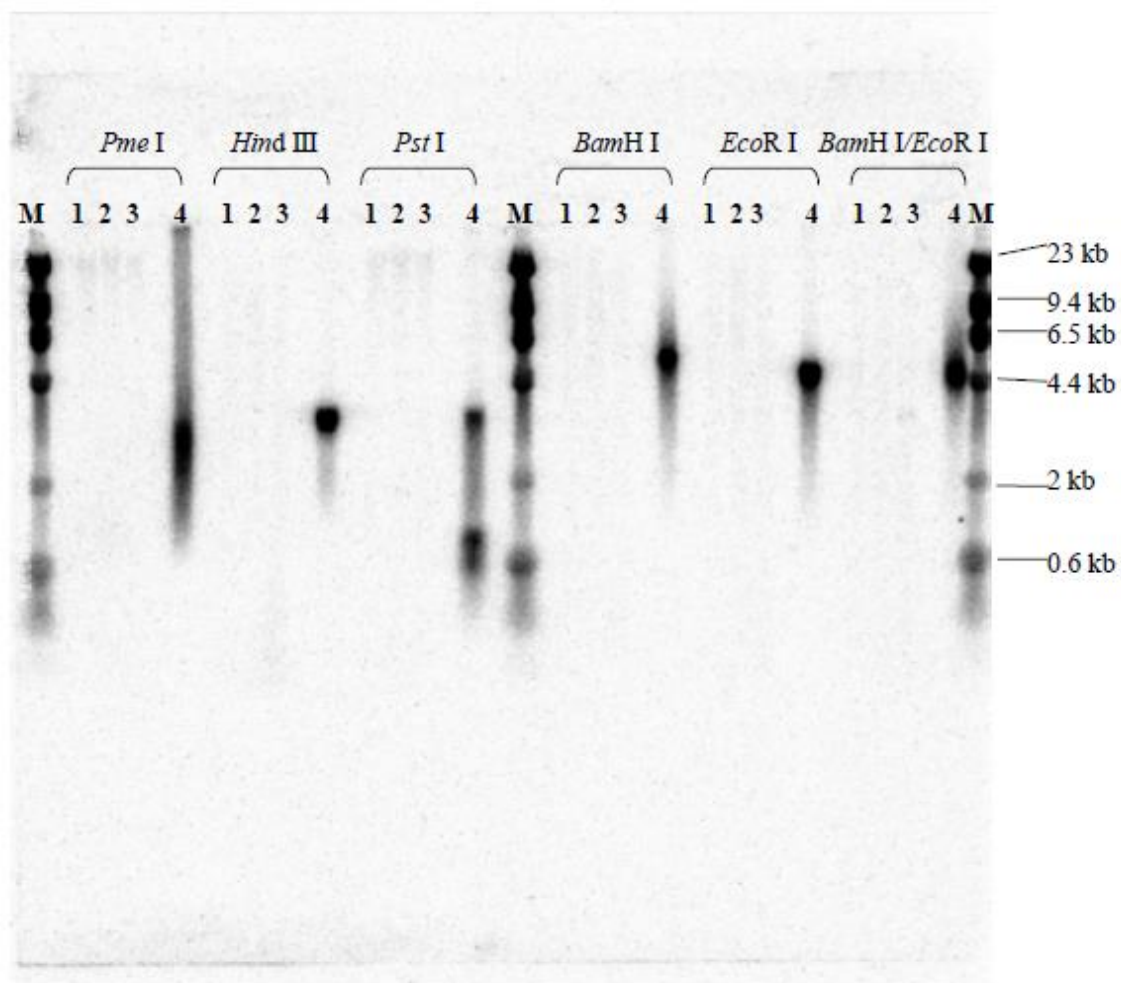


图5 Southern 印迹分析玉米 TC1507- 卡那霉素探针

泳道包括:

- 1: G3 非转基因对照(5 μ g)
- 2: T1S1 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 3: BC4 代汇集的 DNA (5 μ g)
- 4: 质粒 PHP8999 对照(9.5 pg, 相当于 1 个拷贝)
- M: 标准分子量刻度(用 HindIII 切割的 Lambda DNA)

4.转基因性状及产物的检测和鉴定技术

采用直接双抗体夹心 ELISA 定量检测经遗传改良的玉米表达 Cry1F 蛋白的表达水平。该方法采用了 Cry1F 蛋白的兔多克隆抗体以捕获测定板微孔中的 Cry1F 蛋白。被捕获的蛋白用结合了生物素的同样的多克隆抗体进行检测。生物素化的抗体与捕获的 Cry1F 蛋白的结合用 SA/AP (streptavidin-alkaline phosphatase) 结合物进行检测。Cry1F 蛋白的 ELISA 浓度以 pg/ μ g 总蛋白表示。

PAT 蛋白的 ELISA 检测同样也采用了直接双抗体夹心法。该方法应用了上述对 PAT 蛋白专一的兔多克隆抗体和 SA/AP。PAT 蛋白的定量根据 PAT 标准蛋白浓度曲线进行推算 (基于样本的吸光度 (OD 值))。PAT 蛋白的 ELISA 浓度以 pg/ μ g 总蛋白表示。

1 从玉米 TC1507 中收集的组织中测量的 Cry1F 蛋白水平

组织	平均 Cry1F (pg/ μ g 总蛋白)	标准差	最小值/最大值 范围
叶片	110.9	27.2	56.6-148.9
花粉	135.5	13.5	113.4-168.2
丝	50.3	16.5	26.8 – 79.8
茎	550.0	104.0	355.9 – 737.4
全株植物	1063.8	361.7	803.2 – 1572.7
玉米籽粒	89.8	23.3	71.2 – 114.8
老化全株植物	714.3	95.5	622.2 – 845.3

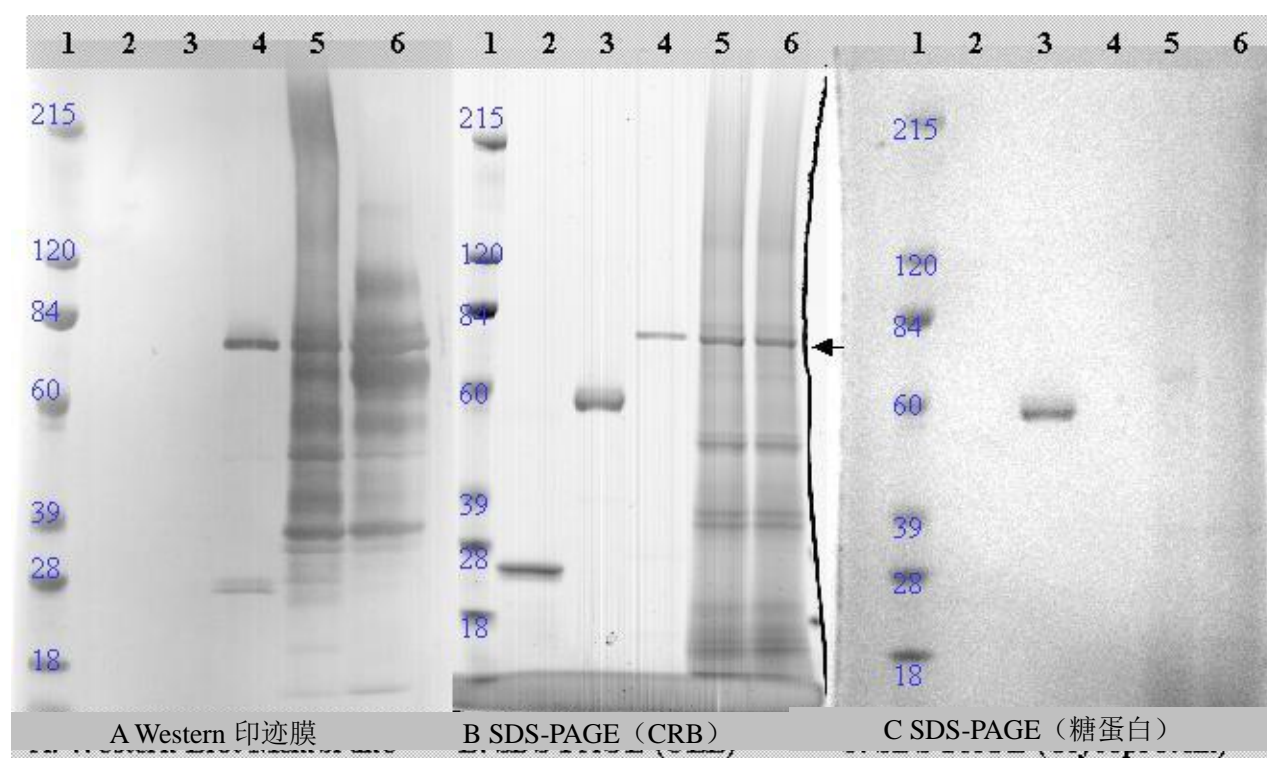
2 从玉米 TC1507 中收集的组织中测量的 PAT 蛋白水平

组织	平均 PAT (pg/ μ g 总蛋白)	标准差	最小值/最大值 范围
叶片	<LOD	NA	<LOD – 40.8
花粉	<LOD	NA	<LOD
丝	<LOD	NA	<LOD
茎	<LOD	NA	<LOD
整体植物	<LOD	NA	<LOD
玉米籽粒	<LOD	NA	<LOD
老化整体植物	<LOD	NA	<LOD

<LOD: 测量值低于 20 pg/ μ g 总蛋白的检测限度

NA: 不适用

3 微生物和玉米衍生的 Cry1F 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析



A 组：采用兔抗 Cry1F 多克隆抗体进行 Western 印迹检测

B 组：SDS-PAGE，4-20%梯度胶，考马斯亮蓝染色

C 组：SDS-PAGE，4-20%梯度胶，GelCode 糖蛋白染色

1 道：预染的分子量标记(Pierce Chemical, BlueRanger)

2 道：大豆胰酶抑制剂(MW: 20.1 kDa), 1.25 g/道

3 道：芥末过氧化物酶(MW: 44 kDa), 1.25 g/道

4 道：Pseudomonas fluorescensMR872 衍生的 Cry1F, 0.14 g/道

5 道：玉米衍生的 IAC 纯化的 Cry1F(组分 10)

6 道：玉米衍生的 IAC 纯化的 Cry1F(组分 11)

*箭头 指示 Cry1F 蛋白

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）；

进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写

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

进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告；

转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告

2003年，山东省农业科学院植物保护研究所开展了转基因玉米TC1507的生态风险评估的工作，并于2003年5月至2003年12月根据农业部有关标准实施试验。研究结果如下：

1) 转基因玉米1507生存竞争性检测

1.1) 荒地条件下生存竞争能力检测

在荒地试验中，1507及其对照品种在长势、株型、生育期等方面无显著差异，两个玉米试验区内杂草种类和杂草长势也无明显差异。

1.1.1) 地表撒播

撒播条件下，1507及其对照品种的出苗率均在10%以下，在自然荒地试验中1507及其对照品种的玉米总覆盖度为4~10%，杂草总覆盖度为75~85%，两个品种之间差距不明显；在拓荒地试验中，1507及其对照品种的玉米总覆盖度为15~20%，两个品种之间差异不显著杂草总覆盖度为90~99%，

1.1.2) 正常深度播种

正常深度播种条件下，1507及其对照品种的出苗率均在85%以上，在自然荒地试验中1507及其对照品种的玉米总覆盖度为45~55%（第一次播种）和80~90%（第二次播种），杂草总覆盖度为60~65%和45~70%，两个品种之间差距不明显；在拓荒地试验中，1507及其对照品种的玉米总覆盖度为65~75%，杂草总覆盖度为65~75%，两个品种之间差异不显著，荒地1507及其对照品种的平均株高无显著差异。

1.2) 栽培地条件下的生存竞争能力检测

1.2.1) 株高

栽培地1507及其亲本对照玉米在长势、株型、生育期等方面无显著差异，栽培地1507及其亲本对照株高分别为212.8cm、209.7cm，二者株高相当，当地对照品种鲁玉10号的株高为218.5cm，稍高于1507及其亲本对照。

1.2.2) 产量

栽培地1507及亲本对照的产量分别为2.75kg、2.77kg，二者之间差异不显著，均低于鲁玉10号产量（3.24kg）

1.2.3) 发芽率

对收获的玉米种子按GB/T 3543.3规定的方法进行发芽率检验，1507及亲本对照玉米的种子发芽率分别为92%和95%，发芽率差异不显著。

1.3) 杂草性

玉米种子的生存取决于温度、种子湿度、基因型、外壳保护与生育期，只有在合适的气候条件下才能越冬，在中国，没有杂草和玉米有亲合性。转基因玉米

和非转基因玉米自生苗的出现几率都很低，没有显著差异。因此，在中国种植转基因玉米的“杂草化”的风险较小。

1507 和非转基因对照区的杂草种类、数量，以及杂草和玉米的总覆盖率，不存在显著差异，表明二者与杂草之间的相互作用是相同的，并没有由于基因的插入而改变，不会因此有杂草化的趋势。

（本部分详细材料见保密附件“转基因玉米环境安全监测报告：生存竞争能力检测”）

保密附件为公司的商业秘密，在此公开版本中删除

2) 基因流散风险分析

2.1) 隔离距离对玉米花粉漂移与异交率的关系

不同距离玉米花粉的漂移率与距离成正相关，显著性检验结果表明，不同距离上玉米的漂移率差异显著。

2.2) 风向和风力对玉米花粉漂移与异交率的影响

不同方向（东北、西北、西南、东南）上玉米花粉的传播频率存在差异，东北方向最高，西北、东南次之，西南最低，显著性检验表明，在 0.05 水平上，东北与东南和西南方向上异交率差异显著，西北与西南差异显著。不同方向上异交率的差异与试验地玉米花期风力和风向直接相关，根据试验记载，当时风向主要为东和北方向，所以东北和西北方向异交率大些，比较 2002 年和 2003 年的试验结果，2002 年的玉米花期风力高于 2003 年，各个方向的异交率值也相应高。

2.3) 影响异交率的其它因子

除了受风力和风速影响玉米花粉的传播距离和频率，影响到异交率的大小外，植株的株高、花粉量以及气象因素如降水、温、湿度都会影响花粉的传播、沉降和存活，进而影响到异交率的大小。

2.4) 基因向近缘种扩散的可能性

目前已知只有少数植物种类能和玉米杂交，能杂交的均属美洲大陆物种类，如分布墨西哥和危地马拉某些地区墨西哥类蜀黍（*Zea mays* ssp. *mexicana* Schrad.），以及大刍草（teosinte）。但根据相关文献，我国没有这些可以与玉米进行杂交的玉米近缘种。同时在我国也未发现玉米田及周边杂草能够和玉米进行杂交的记载，所以转基因玉米基因向其他物种间基因漂移的可能性很小。

（本部分详细材料见保密附件“转基因玉米环境安全监测报告：外源基因流散的生态风险检测”）

保密附件为公司的商业秘密，在此公开版本中删除

3) 对玉米田主要靶标和非靶标生物的影响

3.1) 玉米田主要靶标和非靶标生物种类

田间检测结果表明，三种处理 TC1507、TC1507 亲本对照、当地品种农大 108 田间主要捕食性天敌为瓢虫类、蜘蛛类、小花蝽类、蚂蚁类；寄生蜂以小蜂类和茧蜂类为主，瓢虫类主要是龟纹瓢虫。主要鳞翅目害虫有棉铃虫、粘虫、灯蛾、玉米螟等，四种害虫优势度相当；玉米田间蚜虫数量较多，其它主要害虫有各种蝽象、甲虫、叶蝉、蓟马和叶螨等。

3.2) 转基因玉米对靶标生物玉米螟及其它鳞翅目害虫的影响

转基因抗虫玉米 TC1507 对靶标害虫玉米螟有很好的控制作用，幼虫存活数及隧道长度显著低于其亲本对照，也低于当地品种农大 108，由于 2003 年玉米螟发生较轻，总体上二者差异不显著。对棉铃虫、桃蛀螟的危害也有一定的控制作用。

3.3) 转基因植物对非靶标生物的影响

转基因玉米 TC1507、非转基因对照及当地品种农大 108 天敌总量基本一致，无明显差异。

转基因玉米 TC1507 与非转基因对照天敌在瓢虫种群数量动态上基本一致，没有显著差异。农大 108 瓢虫总量显著高于转基因抗虫玉米 TC1507 及其非转基因对照，可能与品种自身特性有关，与转基因本身无关。

转基因玉米 TC1507 与非转基因对照蜘蛛的种群消长动态基本一致，与当地品种农大 108 蜘蛛的发生略有差异。

转基因玉米 TC1507 与非转基因对照小花蝽种群发生动态基本一致，当地品种农大 108 小花蝽有两个明显的高峰期，8 月 28 日达到最高，平均每 5 株小花蝽数量可以达 61.3 头，与转基因品种 TC1507 及其对照有显著差异。

转基因玉米 TC1507、非转基因对照及当地品种农大 108 蓟马发生量没有明显差异，发生量不大。

转基因玉米 TC1507、非转基因对照蚜虫发生量较一致，没有显著差异。当地品种农大 108 在玉米生育前有明显的高峰，这与品种自身的品种特性有关。

转基因玉米 TC1507、非转基因对照叶螨发生量相当，显著高于当地品种农大 108 叶螨发生量，是品种差异所致。

三种处理其它节肢动物发生数量很少，未见明显差异。

3.4) 转基因植物对玉米田病害的影响

转基因玉米 TC1507、非转基因对照，除了玉米大斑病外，其它病害的发生没有显著差异，在大斑病上虽然存在显著差异，但由于发病程度很轻，不具有代表性。转基因玉米 TC1507 与农大 108 在发病上存在一定程度差异，是由于品种间的抗病性差异所致，同转基因本身没有必然联系。

3.5) 转基因植物对农田生态系统的影响

检测表明：排除品种间差异及物种分布不均等因素的影响，转基因玉米 TC1507 及其亲本对照田及农大 108 田中的节肢动物的种类和优势度没有明显

差异，说明转基因玉米对玉米田昆虫群落没有明显的影响。

（本部分详细材料见保密附件“转基因玉米环境安全监测报告：生物多样性检测”）

保密附件为公司的商业秘密，在此公开版本中删除

3.6) 引发新的病虫害的可能性

在 TC1507 及其亲本对照品种上未见新病害发生。由于其转基因操作并未影响到品种本身其它性状，因此，如果不是种子本身或植物其它组织携带有病虫害，由于转基因引起的病虫害的可能性几乎不存在。

4) 先锋公司对 Cry1F 玉米品系 TC1507 环境安全研究最新进展

4. 1 Cry1F 蛋白在土壤中的稳定性研究：

为了测定 Cry1F 活性蛋白残留在土壤中的持续性，我们利用昆虫抗虫性生物测试定量分析方法(Herman, Wolt and Halliday, 2002)在实验室评价了 Cry1F 蛋白在土壤中的稳定性。在每个连续的培养间隔得出的 GI_{50} 值（有效地抑制 50% 昆虫生长的浓度）表明 Cry1F 蛋白在土壤中的活性是随着时间递减的。同时，通过测定 Cry1F 蛋白在土壤中的半衰期 DT_{50} 值（50% 分解的时间）和 DT_{90} 值（90% 分解时间）分别为 0.6 天和 6.9 天，这个快速降解的数据与实验室评估的其它 Bt 蛋白的降解结果是一致的。

4. 2 田间非靶标节肢动物研究：

为了检测转基因 TC1507 玉米对田间非靶标节肢动物种群的影响，我们利用邻近非转基因玉米作为基线，于 2002 年分别在北美洲与欧洲进行了转基因 TC1507 玉米对田间非靶标节肢动物的影响研究 (Higgins, 2002; Lefko, 2002)。主要节肢动物种类的数量检测结果表明转基因 TC1507 玉米对田间非靶标昆虫种群没有影响。

国内外研究结果均表明：转基因玉米 TC1507 与非转基因亲本对环境的影响没有显著差异。

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

A) 必要的动物毒理试验报告

国内检验机构进行的全食品喂饲试验

2003年天津市卫生防病中心对转基因玉米1507及其非转基因亲本对照进行了90天大鼠喂养试验,报告结论如下:

将转基因玉米TC1507掺入饲料(比例为50%)喂饲大鼠90天,动物活动自如,被毛有光泽,鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因玉米TC1507对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数和病理组织学均未见不良影响。

B) 食品过敏性评价

1) 蛋白质来源的安全性评价

苏云金杆菌(*Cry1F*基因的来源)无引起过敏反应的历史。

在1901年,石渡繁胤报道蚕的软化病是由杆状细菌引起的,并命名为淬倒芽孢杆菌。1911年,Berliner发现在德国苏云金省的面粉厂的地中海粉螟中分离出了一种细菌,可以使昆虫死亡,在1915年正式命名为苏云金芽孢杆菌。在一个多世纪的研究中,目前已发现了许多苏云金芽孢杆菌的亚种。这些亚种目前已有许多应用于生物农药的研究和基因工程的研究。在1938年,法国开始生产第一个商品制剂的苏云金芽孢杆菌,用于防治地中海粉螟,此后,苏云金芽孢杆菌生产的各种制剂广泛在世界许多国家作为生物防治手段应用于农业,包括中国、美国、前苏联、英国、日本、加拿大、德国、罗马尼亚、比利时、埃及、瑞士、芬兰、意大利、南斯拉夫、印度、希腊等几十个国家。在经过了60多年的使用,目前还没有发现对苏云金芽孢杆菌动物和人体不会产生毒性、过敏性、抗营养作用和致病性。作为微生物农药,该产品在粮食作物上被商业化应用已三十多年,其间并无苏云金杆菌蛋白引起过敏反应的报告,亦无与生产含有苏云金杆菌之产品有关的职业性过敏反应(美国环境保护局,1998年)。该微生物成分已应用在多种作物上(包括新鲜蔬菜),且无过敏反应的报告。以上资料充分表明,*Cry1F*蛋白并无引起过敏之虑。

PAT蛋白和链霉菌 *Streptomyces viridochromogenes* (*pat* 基因的来源)亦均无引起过敏反应之历史(美国环境保护局,1995年;美国环境保护局,1997年;Van Wert, 1994年)。

绿色产色链霉菌是一种格兰氏阳性的芽孢土壤微生物,属于放线菌。它产

生磷化麦黄酮—N-乙酰转移酶，这种酶对 PPT 三肽有抗性，草丁膦类除草剂双丙氨膦是一种三肽抗生素，由草丁膦、一种 L-谷氨酸类似物和两个丙氨酸残基组成。在植物细胞内，内源肽酶可以除掉两个丙氨酸残基，剩下的 L-PPT 部分能强烈抑制谷胱甘肽合成酶的活性。谷胱甘肽合成酶在植物体内氨基酸的代谢中起解除氨毒的作用。L-PPT 导致植物组织中胺的堆积，从而使植物死亡。由于动物和人与植物不同，因此，草丁膦类除草剂对人畜是低毒的。绿色产色链霉菌是芽孢土壤微生物，在目前的研究报道中，还没有发现该细菌对植物、人或动物有毒性、过敏性、抗营养作用、致病性。

2) 外源基因表达蛋白质与所有已知致敏原氨基酸序列的同源性分析

Cry1F 蛋白

对 Cry1F 蛋白，当根据 Gendel (1998 年)、国际粮农组织 / 世界卫生组织联合专家咨询组 (2001 年) 和 Codex Ad Hoc Open-ended Working Group on Allergenicity 制定的序列评估方案进行研究时，未发现其序列与已知的蛋白过敏原之间具有同源性。具有显著免疫同一性的序列，至少要有八个连续的氨基酸顺序相同，或在八十一个以上氨基酸残基中，至少有 35% 相同。本作物种转入的杀虫晶体蛋白，并不符合上述两种情形。

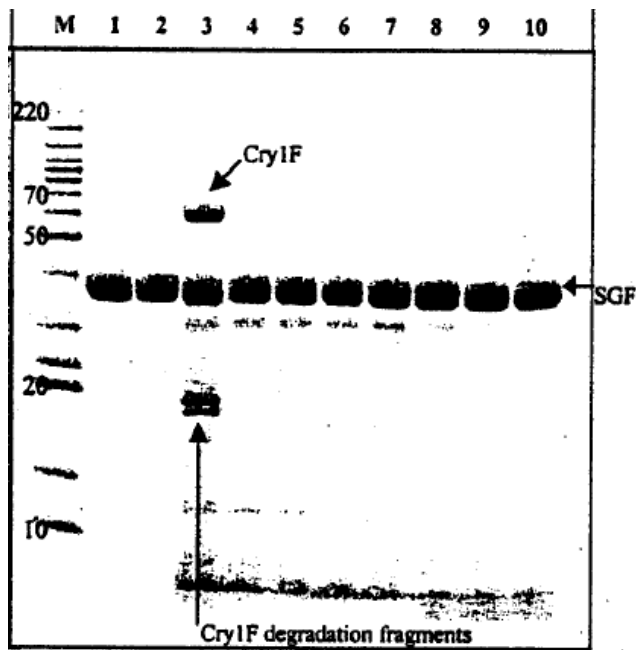
PAT 蛋白

- 方法：在公共的数据库 GenBank、EMBL、PIR、NRL3D of RCSB、PDB、SwissProt 共查询到了 804 个与过敏有关的序列。在这 804 个序列中，含有复制序列和非过敏序列，通过 FASTA 进行再次验证后，最后有 659 个过敏原蛋白形成一个数据库 ALLERGENS3。利用 GCG 软件 (version 10.0) 的 SHUFFLE 功能随机产生一个蛋白质的序列，用作检验氨基酸的偏差和作为阴性对照。用 FASTA 功能与 TOXIN4 数据库中数据进行比较，就可以得到与毒素蛋白相似性的比较。找出同源性较高的组合，通过 STRINGSEARCH 功能进行验证。要求验证的蛋白质和数据库中毒素蛋白质在结构上的相似性是通过计算同源百分比和 *E* 值来评估的。最后，利用 FASTA 和 IDENTITYSEARCH 功能对 PAT 蛋白与过敏原进行免疫学相似性的比较，查询是否存在连续 8 个氨基酸与过敏原序列相同。
- 结果：在数据库的 659 个过敏原和醇溶蛋白进行比较后，同源性最高的过敏原有 14 个，分别是 penaeid shrimps、cladosporium herberum、timothy grass、pea、lepidoglyphus destructor、corylus avellana、lolium perenne、homo sapiens、parietaria judaica 等。在通过 FASTA 和 IDENTITYSEARCH 与数据库 ALLERGENS3 比较后，没有发现 PAT 蛋白与过敏原存在连续 8 个氨基酸序列相同，表明该蛋白不具有过敏原具备的 IgE 免疫原性。
- 结论：通过生物信息分析，PAT 蛋白在蛋白质结构方面与已知的过敏蛋白没有相似性，在免疫学方面，没有 8 个连续的氨基酸与已知的过敏蛋白相同，

也就不会有过敏反应的抗原决定簇。因此，PAT 蛋白成为过敏原的可能性不大。

3) 外源基因表达蛋白质对消化稳定性研究

一般来说，大多数食品过敏原，在消化系统的消化液和酸性条件下稳定，并能到达肠粘膜，引起过敏反应 (Metcalf 等, 1996 年)。通过体外试验，对 Cry1F 蛋白的可消化性进行了评估，以便确定其成为食品过敏原的能力。在模拟胃环境中 (SGF, 其中含有胃蛋白酶, pH 值为 1.2), Cry1F 蛋白能够被快速消化 (15 秒内)。



Cry1F 蛋白在模拟胃液中消化的 SDS-PAGE 检测

M: 蛋白 Mark

1: SGF 空白对照, 0 分钟水浴

2: SGF 空白对照, 15 分钟水浴

3: Cry1F(0.58 ug), 0 分钟消化

4: 15 秒消化

5: 30 秒消化

6: 1 分钟消化

7: 2 分钟消化

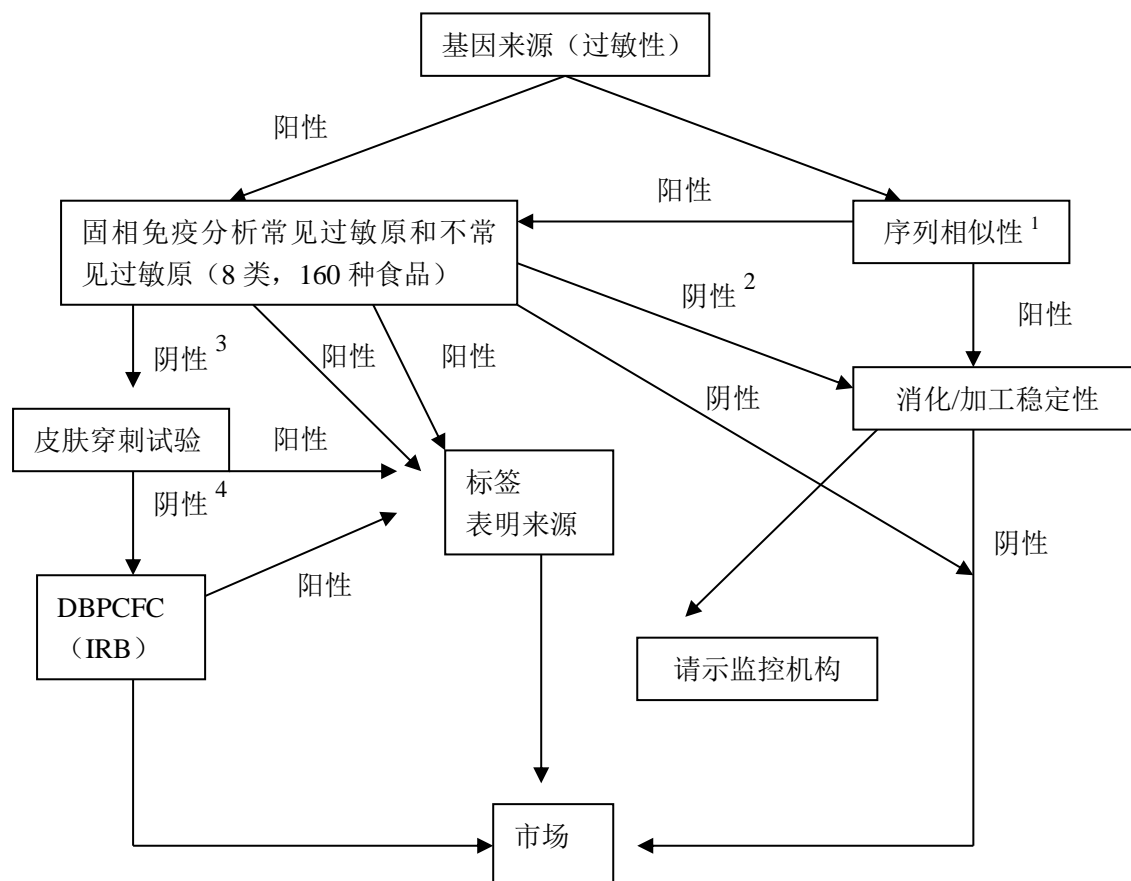
8: 5 分钟消化

9: 10 分钟消化

10: 15 分钟消化

4) 特异的血清学试验

在对外源基因表达蛋白质消化稳定性的研究中已经表明，Cry1F 蛋白可以被很快的消化掉，因此根据国际食品生物技术委员会与国际生命科学研究院的制定了一套分析遗传改良食品过敏性树状分析法和 2001 年由 FAO/WHO 制订的过敏原决定树，确定该蛋白不是过敏原，不需要进行特异的血清学试验。



FAO/WHO（2001）制订的过敏原决定树

综上所述，在过敏性方面，通过分析发现转基因玉米中外源蛋白基因的微生物对人类没有过敏史；在通过与公共数据库中毒性蛋白进行生物信息学分析，证明外源蛋白在结构上和免疫性方面与已知过敏原蛋白在氨基酸序列上同源性很差；在模拟消化液试验中，发现外源蛋白在模拟胃液中很快被消化。根据国际食品生物技术委员会与国际生命科学研究院的制定了一套分析遗传改良食品过敏性树状分析法和 2001 年由 FAO/WHO 制订的过敏原决定树，确定该蛋白不是过敏原，不需要进行特异的血清学试验。因此，转基因玉米 1507 新生产的蛋白质不会对人产生过敏作用。

C) 与非转基因植物比较，其营养成分及抗营养因子分析报告

9.1 抗营养物 - 玉米籽粒

1507 玉米品系和对照杂交品种玉米籽粒样品中抗营养物的估计平均值和 p-值，根据 1998 年田间实验的结果，同时列出了文献中关于每一特性的数值范围

反应变量 ^a	治疗评估	治疗效应 p-值	玉米中数值范围 ^b	在数值范围内 ^c
植酸 %	1507 品系 平均= 0.99 对照品系 平均= 0.96	0.146	0.7 - 1.0	是
胰蛋白酶抑制剂 TIU/g	1507 品系 平均= < LOQ ^d 对照品系 平均= < LOQ	--	NA	--

^a - 在干重基础上的百分比 (%) 或 mg/100 g。胰蛋白酶抑制剂是以在干重基础上每一克的胰蛋白酶抑制剂的酶的活性表示的。

^b - Watson, 1982.

^c - “在范围内”是指玉米 1507 品系的平均值是否在文献给出的范围内。

^d - 在胰蛋白酶抑制剂定量水平 2000 TIU/g 以下。

NA - 文献中没有相应的数值范围

9.2 饲料组分分析

对 1998 年种植田间试验中玉米 1507 品系和对照杂交品种生产的饲料进行组分分析得出得估计平均值和 p 值。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

反应变量 ^a	处理评估 (平均值)	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^c
脂肪 %	1507 品系 平均 = 2.44 对照品系 平均 = 2.42	0.653	0.7 - 6.7 ^b	是
蛋白 %	1507 品系 平均 = 7.83 对照品系 平均 = 7.85	0.932	3.5 - 15.9 ^b	是
ADF %	1507 品系 平均 = 26.97 对照品系 平均 = 27.96	0.039	30 ^d	--
NDF %	1507 品系 平均 = 47.96 对照品系 平均 = 48.28	0.698	51 ^d	--
灰 %	1507 品系 平均 = 5.66 对照品系 平均 = 5.72	0.724	1.3 - 10.5 ^b	是

^a - 干重基础上的百分比

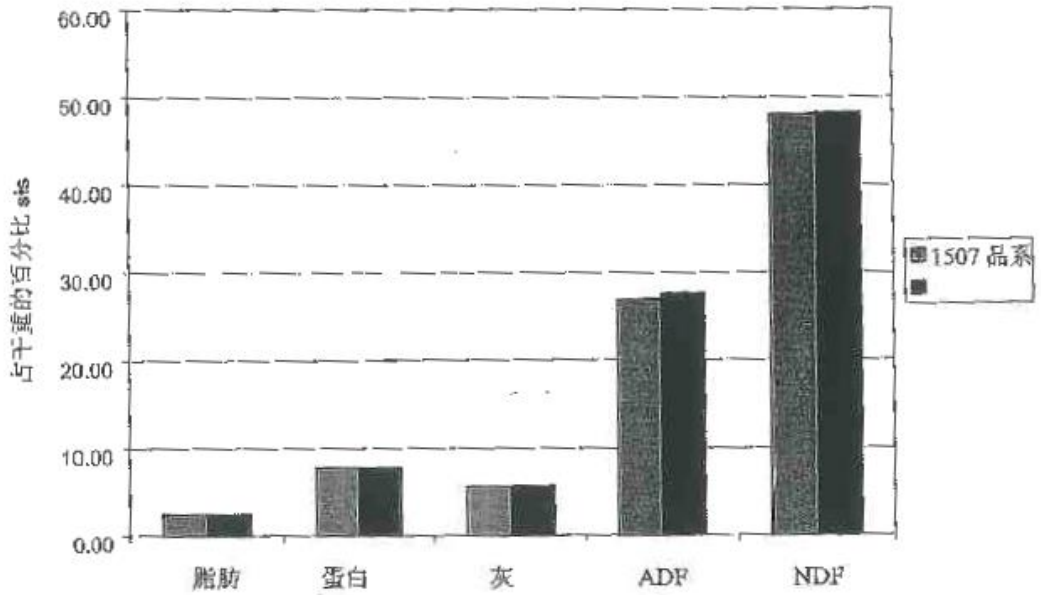
^b - Watson, 1982

^c - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在已知的范围内

^d - Watson, 1982 报道 ADF 的平均值是 30%，NDF 是 51%

9.3 组分分析-饲料

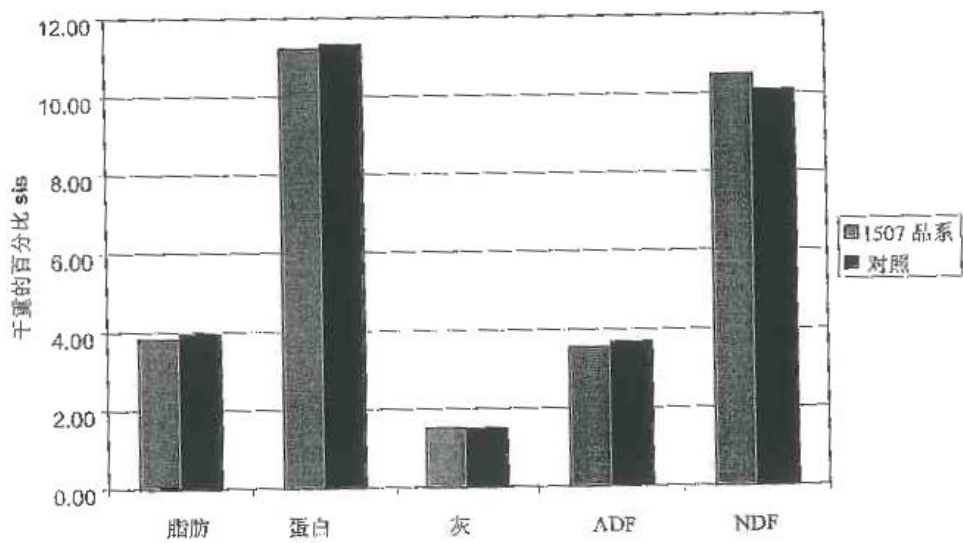
将 Cry1F 1507 品系和对照杂交品系反应变量的平均值进行作图



9.4 组分分析 - 玉米籽粒

将 Cry1F 1507 品系和对照杂交品种反应变量的平均值进行画图

组分 -- 玉米粒



9.5 矿物质分析 - 玉米籽粒

对玉米 1507 品系和对照杂交品种进行的组分分析中估计的平均值和 p 值, 根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

玉米籽粒的矿物质分析				
反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^b
钙 %	1507 品系 平均 = 0.0036 对照品系 平均 = 0.0031	0.620	0.01-0.10 ^c	是
磷 %	1507 品系 平均 = 0.33 对照品系 平均 = 0.32	0.161	0.26-0.75 ^c	是
铜 ppm	1507 品系 平均 = 2.03 对照品系 平均 = 2.11	0.845	0.9-1.0 ^c	是
铁 %	1507 品系 平均 = 0.0025 对照品系 平均 = 0.0025	0.549	0.0001-0.01 ^c	是
镁 %	1507 品系 平均 = 0.12 对照品系 平均 = 0.13	0.524	0.09-1.0 ^c	是
锰 %	1507 品系 平均 = 0.0005 对照品系 平均 = 0.0006	0.0003	0.00007-0.0054 ^c	是
钾 %	1507 品系 平均 = 0.40 对照品系 平均 = 0.36	0.023	0.32-0.72 ^c	是
锌 %	1507 品系 平均 = 0.002 对照品系 平均 = 0.002	0.141	0.0012-0.0030 ^c	是

^a - 干重基础上的百分比或干重基础上的百万分比 (ppm)

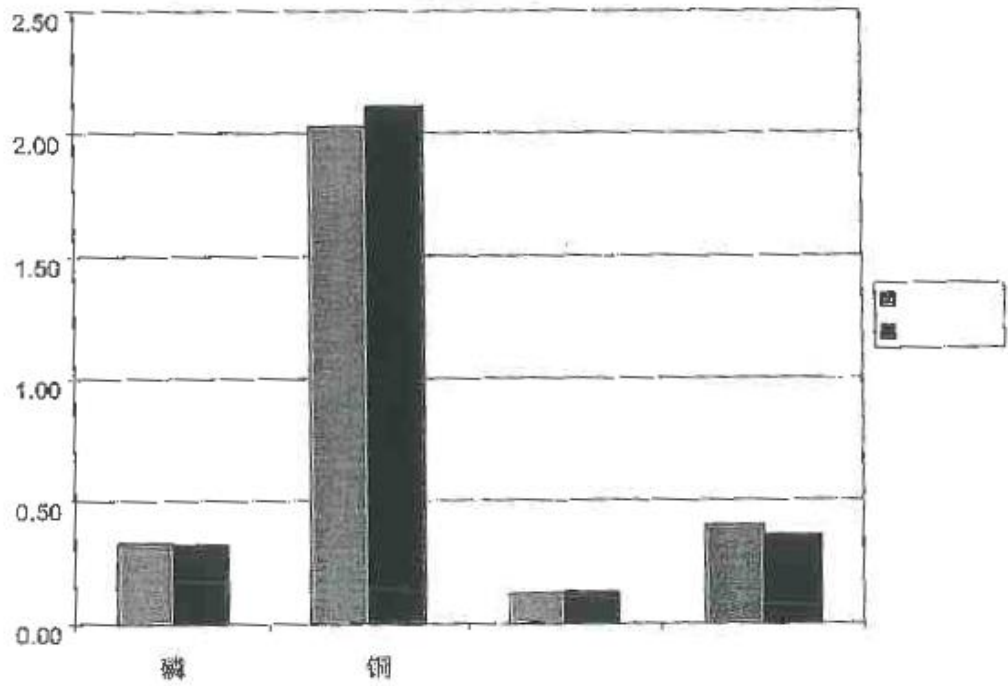
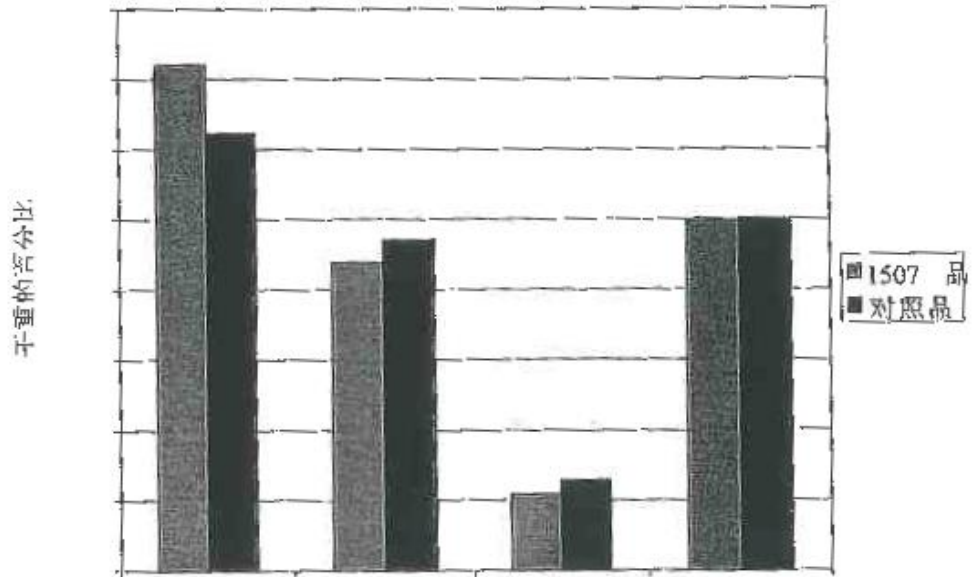
^b - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在已知的范围内

^c - Watson, 1982

^d - 对 22 种市售先锋牌杂交品种分析的资料

9.6 矿物质分析 - 玉米籽粒

将 Cry1F 1507 品系和对照杂交品种反应变量的平均值进行画图（每一图的数据轴不同。）



9.7 组分分析 - 玉米籽粒

对玉米 1507 品系和对照杂交品种的玉米籽粒进行的组分分析中估计的平均值和 p 值，根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

玉米籽粒的组分分析				
反应变量 ^a	处理评估(平均)	处理效应 p-值	文献报道的数值范围	在范围内 ^c
脂肪 %	1507 品系 平均 = 3.83 对照品系 平均 = 3.94	0.046	3.1 - 5.7 ^b	是
蛋白质 %	1507 品系 平均 = 11.20 对照品系 平均 = 11.32	0.611	6.0 - 12 ^b	是
ADF %	1507 品系 平均 = 3.55 对照品系 平均 = 3.68	0.250	3.0 - 4.3 ^d	是
NDF %	1507 品系 平均 = 10.47 对照品系 平均 = 10.08	0.315	8.3 - 11.9 ^d	是
灰 %	1507 品系 平均 = 1.51 对照品系 平均 = 1.50	0.335	1.1 - 3.9 ^d	是

^a - 在干重基础上的百分比

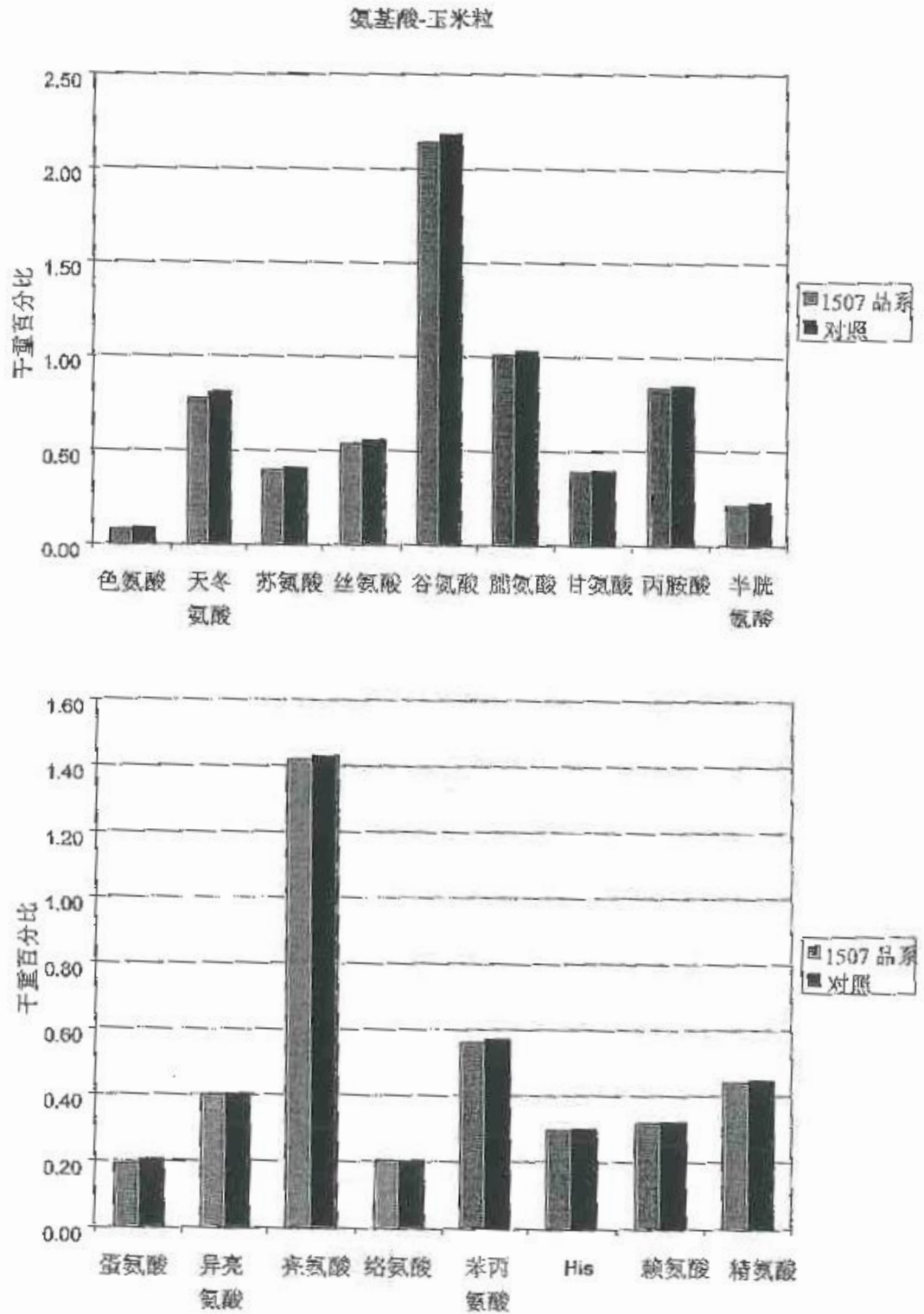
^b - Watson, 1987.

^c - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在已知的范围内。

^d - Watson, 1982.

9.8 氨基酸组分-玉米籽粒

Cry1F 玉米 1507 品系和对照杂交品种氨基酸含量平均值进行作图 (不同图中数据轴不同)



9.9 维生素分析 - 玉米籽粒

玉米 1507 品系和对照杂交品种玉米籽粒样品维生素组分进行的估计平均值和 p 值，根据 1998 年田间实验的结果。同时列出了文献中报道的每一特性的数值范围。

玉米籽粒的维生素分析				
反应变量 ^a	处理评估	处理效应 p-值	玉米中数值范围	在范围内 ^c
氢氧化硫胺 (B1) ppm	1507 品系 平均 = 3.64 对照品系 平均 = 4.06	0.002	3.0 - 8.6 ^b	是
核黄素 (B2) ppm	1507 品系 平均 = 1.67 对照品系 平均 = 1.66	0.827	0.25 - 5.6 ^b	是
叶酸 ppm	1507 品系 平均 = 0.151 对照品系 平均 = 0.144	0.676	0.3 ^d	--
总维生素 E ppm	1507 品系 平均 = 48.2 对照品系 平均 = 41.6	0.0005	42 - 87 ^b	是

^a - 在干重基础上的百万分比 (ppm).

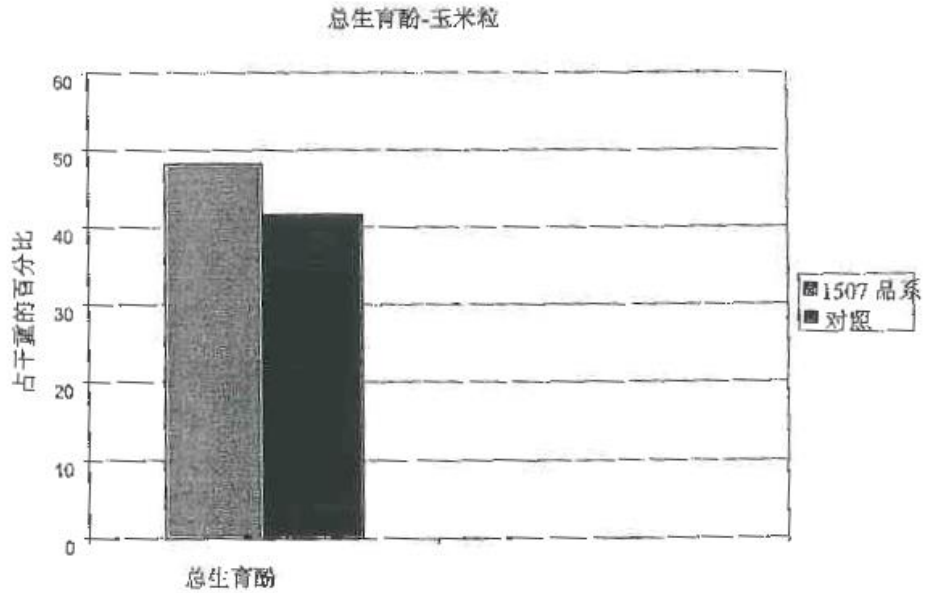
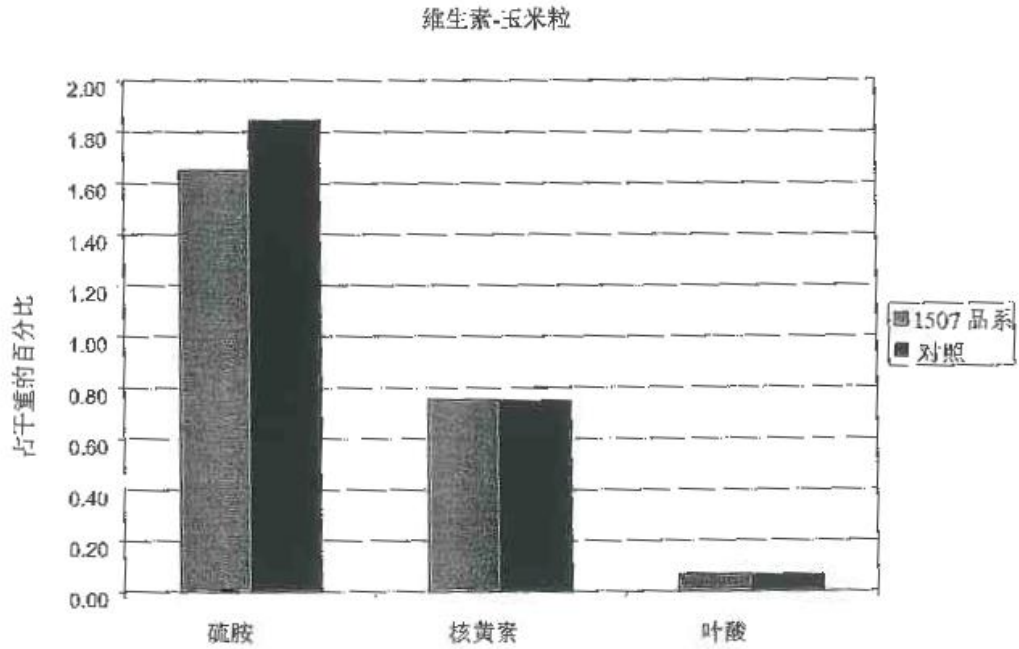
^b - Watson, 1982

^c - “在范围内”是指 1507 品系的平均值是否在文献报道的范围内

^d - Watson, 1987 报道玉米籽粒中叶酸的平均值是 0.3mg/kg

9.10 维生素分析-玉米籽粒

将 1507 品系和对照杂交品系维生素和总生育酚反应变量平均值进行作图，注意每一图的数据轴不同



结论:

综上所述，玉米品系 1507 的营养成分分析表明其与商品化杂交玉米相似。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况；

转 Cry1F 抗虫玉米 TC1507 国际进展

自 2001 年以来，转 Bt 基因 Cry1F 抗虫玉米 TC1507 已经分别在美国，加拿大和阿根廷的主要玉米产区获得商业化种植许可。2004 年至 2011 年间，转 Bt 基因 Cry1F 玉米品系 TC1507 已经在美国，加拿大、阿根廷和巴西等国家的主要玉米产区累计种植 3800 多万公顷，在转基因作物种植面积里占有相当大的比重。

2002 年以来转 Bt 基因 Cry1F 玉米品系 TC1507 分别获得加拿大、韩国、南非、阿根廷、澳大利亚/新西兰、墨西哥、台湾、菲律宾、中国、欧盟、日本和瑞士等 19 个国家和地区的食品与饲料的加工原料进口许可。

转 Bt 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 自 2001 年在美国，2002 年加拿大主要玉米产区商业化种植的田间表现证明：先锋公司的转 Bt 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 田间表现优秀，没有由于 Bt 基因 *Cry1F* 导入而导致的农艺性状退化或者抗病性减弱等现象发生；TC1507 在玉米虫害严重发生的年份，产量显著高于非转基因玉米；由于转基因抗虫玉米能有效地保护玉米穗和玉米籽粒免遭玉米螟侵食，减少虫伤粒，继而减少真菌感染、降低玉米中真菌毒素的含量，所以 TC1507 玉米品质大大提高；TC1507 玉米不仅能抗欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)，还能抗其它害虫，如西南玉米螟 (*Diatraea grandiosella*)，豆切根虫(*Striacosta albicosta*)，粘虫(*Spodoptera frugiperda*)，地老虎(*Agrotis ipsilon*)，和甘蔗螟 (*Diatraea saccharalis*)，而且对美洲棉铃虫(*Helicoverpa zea*)也有一定的抗性。抗虫性多年来保持在高抗水平，未发现抗虫性降低现象。

国内 Bt 玉米研究进展

在国内，中国农业大学、中国科学院微生物研究所等单位分别用子房注射法、超声波技术和基因枪法成功地将 Bt 毒蛋白基因导入玉米中，试验表明其再生转基因植物具有杀虫作用。转基因抗虫玉米已经在国内进入生产性试验阶段。中国农业科学院生物技术研究所的专家也研制成功了转 Bt 基因抗虫玉米，田间实验表明对玉米螟有很好的抗性。

近年来，国家正式启动实施了“转基因生物新品种培育科技重大专项”，投入经费数亿元。通过几年的努力，我国转基因植物研究取得了很大的成绩。由于玉米在我国农业生产中的地位，转基因玉米得到国家和广大科技工作者的重视，我国转基因玉米研究进展较快，转基因玉米在我国即将进入生产阶段，转基因抗虫的产业化蓄势待发。我国已克隆一批具有自主知识产权的功能基因，并已培育一批性状优异的转基因玉米材料。

转基因玉米的经济与环境效益

转基因作物的推广应用取得了巨大的经济与社会环境效益，美国种植转基因玉米的收益每公顷增加了约 20-50 美元，从美国和加拿大种植转基因玉米对玉米

螟的控制效果十分突出，抗虫玉米与同品种非转基因对照比，平均增产 7%-9%。转基因玉米的推广减少施用农药 10%，增加 20%的免耕面积。

转基因抗虫玉米在微生物毒素和农药残留方面表现优异。转基因抗虫玉米中黄曲霉毒素等微生物毒素含量比常规玉米低。转基因抗虫玉米由于减少施用农药的次数和数量，因此降低了产品中农药的残留量，提高了食品的安全性。

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；

抗虫玉米 TC1507 的用途是作为进口加工原料，所以田间监控方案不适用于进口加工原料的产品。为了保证抗虫玉米 TC1507 在进口加工过程中的安全使用，我们进行了相关研究并采取了如下措施：

为了确保转 Bt 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 的安全使用，我们对其安全性作了进一步的研究，结果进一步表明：

Cry1F 蛋白与已知过敏原没有同源性；转基因 TC1507 玉米与非转基因玉米的营养价值是等同的；*Cry1F* 蛋白在土壤中迅速降解，其半衰期 DT_{50} 值(50%分解的时间)和 DT_{90} 值(90%分解时间)分别为 0.6 天和 6.9 天；转基因 TC1507 玉米对田间非靶标昆虫种群没有影响；*Cry1F* 蛋白对田间非靶标鳞翅目昆虫蓝蝶种群的影响可以忽略。

在转基因玉米 TC1507 进口安全证书的使用上，杜公司严格遵守中国的相关法律法规以及安全证书的要求。在提供安全证书复印件给境外贸易商时，要求贸易商采取下述监控措施来保证 TC1507 进口过程中的安全，并签订相关协议书：

1. **遵守相关法律法规：** 在进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中提出的要求和条件。
2. **包装和标识：** 包装要牢固，标识要清楚。要与其它相似的非转基因产品明显区分开。
3. **运输环节：**
 - 1) **产地国内陆运输：** 要求使用专门的运输工具用以装载转基因产品。对运输工具在使用前将进行充分地清洗，以避免其他转基因生物污染。
 - 2) **出口终端：** 对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其他转基因生物污染。在确认其出口装船之前，将接受出口国相关部门的检验。
 - 3) **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。
 - 4) **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。

- 5) **卸货：**当船只到达中国口岸时，要求中国进口商严格执行中国农业部所制定的转基因安全管理条例，避免在港口卸货和中转中，有转基因产品流入农业生产领域，确保中国的农业生物安全。将督促国内收货人，对其用于进口转基因产品的包装物和运输工具进行必要的清洗和标识。将要求国内收货人和中国有关港务部门，将进口转基因产品与在港的其他农产品分开存放，以确保不发生可能的污染。
4. **监测和报告：**不定期地访问进口商并对进口产品进行监视。如发现任何违反规定操作和意外事件发生，将立即向当地的农业行政主管部门和农业部（MOA）报告。
5. **技术指导和支持：**在必要时，杜邦公司会向贸易商提供技术指导和支持。

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

美国农业部（USDA）及动植物检验检疫局批准件

2001 年 6 月 28 日

Cynthia Stauffer 女士

先锋良种国际公司

552 号信箱

约翰斯顿，依阿华州 50131-1000

Stauffer 女士鉴：

贵公司编号 00-136-01P 为抗鳞翅目昆虫及耐草胺磷玉米 TC1507 解除管制状态而提出的申请已获批准。该决定不久即将予以公布，即转化植物体 1507 不再被当作应按 7 CFR 340 条款予以管制的物品。

若申请者了解到任何与申请书及环境分析报告存在实质差异的讯息，必需在 5 日内以书面方式向动植物健康监督局（APHIS）报备。

附件中包括环境评估报告的副本及无显著影响的结论。如对该文件有任何垂询，请致电（301）734 – 4885 Kay Peterson 女士。

Michael Firko 博士

助理局长

植物健康局

植物保护与检疫

抄送：

K. Peterson, file 00-136-01p

R. Stoaks, WR, Sacramento, CA

S. Wood, ER, Raleigh, NC

对 Mycogen 种子公同经由陶氏益农有限公司与先锋良种国际公司申请
对 Bt Cry1F 抗虫、耐草胺磷玉米品系 1507 实施非管制状态之批准

环境评估报告及未发现显著影响之结论

2001 年 6 月

美国农业部（USDA）动植物健康监督局（APHIS）在批准 Mycogen 种子公同经由陶氏益农有限公司与先锋良种国际公司对 Bt Cry1F 抗虫、耐草胺磷玉米品系 1507 实施非管制状态之申请（APHIS 编号：00-136-01p）前曾根据 APHIS 法规 7 CFR 340 部分条款进行有关环境评估（EA）。该申请之内容 1507 玉米系能通过转基因技术表达两种外源蛋白 – 剪切 Cry1F 杀虫蛋白及 PPT 乙酰基转化酶，并从而形成对特定鳞翅目昆虫的抗性和对草胺磷除草剂的耐受性。APHIS 曾于 2001 年 4 月 18 日在联邦登记公告（66 FR 19915-19916, Docket no. 00-070-2）中将该环境评估报告予以公布并征求意见。在 30 天的意见征求期内未收到意见，但该环境评估报告仍进行了修改以反映美国环保署与食品及药物管理局对该玉米品系作为农药及作为食品与饲料所作的结论。根据该报告之分析，APHIS 兹作出未发现显著影响（FONSI）之结论，并决定玉米 1507 品系及其后代不再作为管制物品之决定。

Michael Firko 博士
植物健康局 助理局长
植物保护与检疫
动植物健康监督署
美国农业部
日期：2001 年 6 月 14 日



JUN 28 2001

United States
Department of
Agriculture

Marketing and
Regulatory
Programs

Animal and
Plant Health
Inspection
Service

4700 River Road
Riverdale, MD 20737

Ms. Cynthia Stauffer
Pioneer Hi-Bred International, Inc.
Post Office Box 552
Johnston, IA 50131-1000

Dear Ms. Stauffer:

Your petition number 00-136-01p for a determination of nonregulated status for lepidopteran insect resistant and phosphinothricin tolerant corn event 1507 has been approved. A notice advising the public of our determination that the transformation event 1507 is no longer considered a regulated article under 7 CFR 340 will be published soon.

APHIS must be notified within 5 days in writing if any information comes to the applicant's attention that differs substantially for what was described in the petition and our environmental analysis.

Copies of the environmental assessment and the finding of no significant impact are enclosed. Should you have any questions about these documents, please contact Ms. Kay Peterson at (301) 734-4885.

Sincerely,

Michael Firko, Ph.D.
Assistant Director
Plant Health Programs
Plant Protection and Quarantine

cc:
K. Peterson, file 00-136-01p
R. Stoaks, WR, Sacramento, CA
S. Wood, ER, Raleigh, NC



APHIS - Protecting American Agriculture

An Equal Opportunity Employer



Approval of Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc.
Request (00-136-01p) Seeking a Determination of Non-regulated Status For *Bt* Cry1F Insect
Resistant, Glufosinate Tolerant Corn Line 1507

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

June 2001

The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), United States Department of Agriculture (USDA), has prepared an environmental assessment (EA) prior to approving a petition (APHIS Number 00-136-01p) for a determination of nonregulated status received from Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc. under APHIS regulations at 7 CFR Part 340. The subject of this petition, corn line 1507, is genetically engineered to express two foreign proteins, a truncated Cry1F insecticidal protein and a phosphinothricin-N-acetyltransferase enzyme, which confer resistance to certain lepidopteran insect pests and tolerance to glufosinate herbicide, respectively. On April 18, 2001, APHIS published a notice in the *Federal Register* (66 FR 19915-19916, Docket no. 00-070-2) announcing the availability of the EA for public review and comment. No comments were received during the designated 30 day comment period; however the EA was revised to reflect the current status of recent conclusions by the U.S. Environmental Protection Agency and the Food and Drug Administration regarding the use of this corn line as a pesticide and as food or feed. Based on the analysis carried out in the EA, APHIS has reached a finding of no significant impact (FONSI) to the environment from its determination that corn line 1507 and progeny derived from it shall no longer be considered regulated articles.

A handwritten signature in cursive script that reads "M. J. Firko".

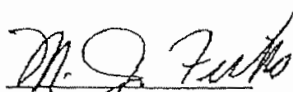
Michael J. Firko, Ph.D.
Assistant Director, Plant Health Programs
Plant Protection and Quarantine
Animal and Plant Health Inspection Service
U.S. Department of Agriculture

Date: 6/14/01

Appendix E. Determination of non-regulated status for *Bt* Cry1F corn line 1507.

In response to a petition (designated 00-136-01F) received from Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc., APHIS has determined that genetically-engineered corn line 1507 and progeny derived from it will no longer be considered regulated articles under APHIS regulations at 7 CFR Part 340. Permits or acknowledged notifications that were previously required for environmental release, importation, or interstate movement under those regulations will no longer be required for line 1507 corn and its progeny. Importation of seed of line 1507 corn and its progeny is still, however, subject to the restrictions found in the Foreign Quarantine Notices (regulations at 7 CFR Part 319), just as they apply to other importation of corn seeds. This determination is based on APHIS' analysis of field and laboratory data and literature references provided in the petition and other relevant information as described in this environmental assessment that indicate that corn line 1507 and its progeny will not pose a plant pest risk for the following reasons: (1) They exhibit no plant pathogenic properties - although DNA from plant pathogens was used in the development of line 1507 corn, these plants are not infected by these organisms, nor can they incite disease in other plants. (2) They are no more likely to become weeds than insect or herbicide tolerant corn that is currently being cultivated. (3) Introgression from line 1507 corn into wild relatives in the United States and its territories is extremely unlikely and is not likely to increase the weediness potential of any resulting progeny nor adversely effect genetic diversity of related plants any more than would introgression from traditional corn hybrids. (4) They are similar in plant forage composition and in kernel composition and quality characteristics to nontransgenic corn and should have no adverse impact on raw or processed agricultural commodities. (5) They exhibit no potential to have a significant adverse impact on organisms beneficial to agriculture. (6) Compared to current agricultural practices, cultivation of line 1507 corn should not reduce the ability to control insects or weeds in corn or other crops. In addition to our finding of no plant pest risk, there will be no affect on threatened or endangered species under the conditions of the current pesticide registrations (EPA Reg. Numbers 29964-3 and 68467-2) granted for field corn originating from maize line 1507.

APHIS also has concluded that there may be new varieties bred from line 1507 corn; however they are unlikely to exhibit new plant pest properties, i.e., properties substantially different from any observed for corn already produced from line 1507 and field tested, or those observed for other corn varieties not considered regulated articles under 7 CFR Part 340.



Michael J. Firko, Ph.D.
Assistant Director, Plant Protection and Quarantine
Animal and Plant Health Inspection Service
U.S. Department of Agriculture

Date: 6/14/07

Environmental Assessment

美国食品与药物管理局（FDA）批准件

健康与人类服务署

卫生处

2001 年 5 月 18 日

食品和药物管理局
华盛顿特区 20204

Penny Hunst 博士

陶氏益农有限公司

9330 Zionsville 路

印第安纳波利斯，印第安纳州 46268

亲爱的 Hunst 博士：

Mycogen 子公司经由陶氏益农有限公司和先锋良种国际公司在 2000 年 6 月 28 日提交了关于转基因的玉米系 1507 的咨询文件，这是对该文件的回复。根据陶氏益农公司所述，玉米系 1507 经过改良后可以表达两种新的蛋白，Cry1F 和 PAT。Cry1F 蛋白能够抵御特定的鳞翅目有害昆虫。PAT 蛋白具有对草胺磷除草剂的耐受性，在培育抵御昆虫和耐草胺磷的玉米系 1507 时，可以用做筛选标志。所有与该咨询有关的资料均将置于编号为 BNF000073 的档案中，将由上市前批准办公室保存。

为使该咨询案结案，陶氏益农提交了一份转基因玉米株 1507 安全性和营养评价的总结。这些文件向食品与药物管理局（FDA）通报了陶氏益农为使该产品符合 FDA 有关规定所将采取的各种步骤。根据你们提交的关于安全性和营养评估的文件，我们的理解是陶氏益农认为玉米株 1507 与市场上的传统玉米在成分、安全性或其他相关参数方面没有实质差别，因此不存在需要上市前评价和 FDA 的批准的情况。

由于农药物质和农药成分由环境保护署（EPA）负责管理，FDA 没有评价有关 Cry1F 和 PAT 蛋白安全性的资料。在由玉米系 1507 发展而来的食品或种子上市前，陶氏益农有责任获得所有相关的批准，包括 EPA 和美国农业部的批准。

第二页- Penny Hunst 博士

根据陶氏益农提交给 FDA 的资料，目前我们对转基因玉米系 1507 没有进一步的问题，但是，如您所知，陶氏益农仍继续有责任确保上市产品的食品安全、有益健康，并符合所有现行的法律和管理条例。

商祺

Alan M.Rulis 博士

食物安全和应用营养中心

上市前批准办公室 主任



May 18, 2001

Food and Drug Administration
Washington DC 20204

Penny Hunst, Ph.D.
Dow AgroSciences LLC
9330 Zionsville Rd.
Indianapolis, IN 46268

RECEIVED
MAY 24 2001
REGISTRATION

Dear Dr. Hunst:

This is in regard to the consultation on genetically modified maize line 1507 that Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International, Inc., initiated with the Agency on June 28, 2000. According to Dow AgroSciences, the maize line 1507 has been modified to express two new proteins, Cry1F and PAT. The Cry1F protein confers resistance to certain lepidopteran insects. The PAT protein confers tolerance to the herbicide glufosinate ammonium and was used as a selectable marker in the development of the insect resistant and glufosinate tolerant maize line 1507. All materials relevant to this consultation have been placed in a file that has been designated BNF 000073 and will be maintained by the Office of Premarket Approval.

As part of bringing the consultation regarding this product to closure, Dow Agrosciences submitted a summary of its safety and nutritional assessment of the genetically engineered maize line 1507. This communication informed FDA of the steps taken by Dow AgroSciences to ensure that this product complies with those legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment you have conducted, it is our understanding that Dow AgroSciences has concluded that the maize line 1507 is not materially different in composition, safety, or other relevant parameters from maize currently on the market, and that it does not raise issues that would require premarket review or approval of 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 Cry1F and PAT proteins. It is Dow AgroScience'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 maize line 1507.

Page 2- Dr. Penny Hunst

Based on the information Dow AgroSciences has presented to FDA, we have no further questions concerning the bioengineered maize line 1507 at this time. However, as you are aware, it is Dow AgroSciences LLC's continued responsibility to ensure that foods the firm markets are safe, wholesome, and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely yours,



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

12. 审查所需的其它相关资料。

进口过程中采取的安全监控措施及有效性的总结报告

在转基因抗虫玉米 TC1507 进口安全证书的使用上，先锋国际良种公司严格遵守中国的相关法律法规以及安全证书的要求。在提供安全证书复印件给境外贸易商时，要求贸易商采取下述监控措施来保证抗虫玉米 TC1507 进口过程中的安全，并签订相关协议书：

1. **遵守相关法律法规：**在进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中提出的要求和条件。
2. **包装和标识：**包装要牢固，标识要清楚。要与其它相似的非转基因产品明显区分开。
3. **运输环节：**
 - 1) 产地国内陆运输：要求使用专门的运输工具用以装载转基因产品。对运输工具在使用前将进行充分地清洗，以避免其他转基因生物的污染。
 - 2) 出口终端：对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其他转基因生物的污染。在确认其出口装船之前，将接受出口国相关部门的检验。
 - 3) 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。
 - 4) 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。
 - 5) 卸货：当船只到达中国口岸时，要求中国进口商严格执行中国农业部所制定的转基因安全管理条例，避免在港口卸货和中转中，有转基因产品流入农业生产领域，确保中国的农业生物安全。将督促国内收货人，对其用于进口转基因产品的包装物和运输工具进行必要的清洗和标识。将要求国内收货人和中国有关港务部门，将进口转基因产品与在港的其他农产品分开存放，以确保不发生可能的污染。
4. **监测和报告：**不定期地访问进口商并对进口产品进行监视。如发现任何违反规定操作和意外事件发生，将立即向当地的农业行政主管部门和农业部（MOA）报告。
5. **技术指导和支持：**在必要时，先锋国际良种公司会向贸易商提供技术指导和支持。

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

转 Bt Cry1F 玉米第 1507 品系自 1997 年以来已在北美和欧洲的主要玉米产区进行过田间试验，美国农业部、美国环保署和美国食品与药物管理署已于 2001 年 6 月为 Bt Cry1F 玉米 TC1507 品系颁发了批准书。自 2001 年以来，转 Bt 基因 Cry1F 玉米品系 TC1507 已经分别在美国，加拿大、阿根廷和巴西的主要玉米产区获得商业化种植许可。

杜邦先锋种业生物安全委员会(简称IBC)对转基因抗虫玉米杂交种TC1507 进口安全证书申请的审查结论如下：

(1) 转基因玉米TC1507中没有引入编码对人类有毒或具抗生素抗性的蛋白质的核酸序列；

(2) 转基因玉米TC1507品系的籽粒和全株植物饲料样品中，主要营养成分与抗营养因子因子的含量，和已发表文献中的资料一致；

(3) Cry1F蛋白及PAT蛋白与已知的毒蛋白或过敏原无同源性，这三种蛋白在人工模拟胃肠液中迅速水解，在转基因植物中的表达不会对动物和人类产生不利影响；

(4) 食用安全验证试验表明：转基因玉米TC1507与其非转基因亲本具有实质等同性，具有与亲本同样的营养、抗营养、毒性。按照目前以玉米为原料的食品加工方式，可以保证转基因玉米TC1507对人体健康不会产生不利的影

(5) 环境安全检测试验结果表明：转基因玉米TC1507与非转基因亲本对玉米田昆虫的种类及群落优势度的影响没有显著差异，对玉米田节肢动物多样性没有显著影响，在荒地与栽培条件下其生存竞争能力与非转基因对照没有显著差异。

杜邦先锋生物安全委员会同意转基因玉米 TC1507 品系在中国进口安全证书的申请。并保证我公司严格按照中国的转基因生物安全管理条例与法规对进口的转基因玉米 TC1507 产品采取安全管理措施，确保对人类与环境的健康。

(盖章/签字)

杜邦先锋种业生物安全委员会

2004 年 03 月

八、本单位审查意见

转 *Bt Cry1F* 玉米第 1507 品系自 1997 年以来已在北美和欧洲的主要玉米产区进行过田间试验，美国农业部、美国环保署和美国食品与药物管理署已于 2001 年 6 月为 *Bt Cry1F* 玉米 TC1507 品系颁发了批准书。自 2001 年以来，转 *Bt* 基因 *Cry1F* 玉米品系 TC1507 已经分别在美国，加拿大、阿根廷和巴西等国的主要玉米产区获得商业化种植许可。

国内外研究均表明，转基因玉米 TC1507 中外源蛋白与已知毒蛋白或过敏源没有同源性；没有抗生素抗性；主要营养成分与抗营养素因子与非转基因对照一致；按照目前以玉米为原料的食品加工方式，可以保证转基因玉米 TC1507 对人体健康不会产生不利的影响；食用安全评价与环境安全性评价与非转基因对照没有显著差异。多年的进口实践中，没有发生一例安全性事故。我公司同意转基因玉米 TC1507 品系在中国进口安全证书的续申请。并保证严格按照中国的转基因生物安全管理条例与法规对进口的转基因玉米 TC1507 产品采取安全管理措施，确保对人类与环境的健康。

(盖章/签字)

杜邦中国集团有限公司

2004 年 03 月