

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申报书

转 *oxy* 基因抗除草剂溴苯腈双低油菜 Oxy-235 安全证
书（进口）申请

拜耳作物科学公司

2004 年 03 月 30 日

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申报书

项目名称: 转 *oxy* 基因抗除草剂溴苯腈双低油菜 Oxy-235 安全证书(进

口) 申请

申请单位: 拜耳作物科学公司

申请人:

地 址: 北京市朝阳区东三环南路 2 号航华科贸中心二号楼 7 层

邮政编码: 100022

电 话:

传 真:

e-mail:

填报日期: 2004 年 3 月 30 日

中华人民共和国农业部制

填 写 说 明

1. 在填写申报书之前，应认真阅读《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理条例》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；转基因植物的品种命名应符合《农业植物品种命名规定》；首次申请农业转基因生物品种（或品系）生产应用安全证书的，需提供《农业转基因生物品种（或品系）生产应用综合评价报告》，主要包括对我国生产、贸易、社会等方面影响。

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

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

10. 申请者可以注明哪些资料需要保密并说明理由。

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

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

目 录

附件目录.....	I
公司名称声明.....	II
商业保密资料声明.....	III
一、申请表.....	1
二、项目内容摘要.....	3
三、工作目的和意义.....	5
四、国内外研究的相关背景材料.....	6
五、安全性评价.....	8
六、相关附件资料.....	45
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见.....	78
八、本单位审查意见.....	79

附件目录

(商业保密信息)

国内检测报告

附件 1: 转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告 (生存竞争能力检测) —中国农业科学院油料作物研究所

附件 2: 转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告 (转基因油菜和油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率检测) —华中农业大学

附件 3: 转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告 (生物多样性检测) —华中农业大学

附件 4: 转基因油菜 Oxy-235 大鼠 90 天喂养试验报告—天津市卫生防病中心

附件 5: 转基因油菜 Oxy-235 抗营养因子检测—天津市卫生防病中心

拜耳作物科学公司研究报告

附件 6: 转基因油菜转化事件 Oxy-235 插入特征的描述

附件 7: 转基因油菜 Oxy-235 中插入序列的测定

附件 8: 油菜 Oxy-235 中的基因表达水平

附件 9: 腈水解酶蛋白的氨基酸全序列与已知毒素和过敏原的同源性检索

附件 10: 苯腈类除草剂和 oxy 编码的腈水解酶

附件 11: Oxy-235Westar (*B. napus*) 及其亲本和 8 个商品化油菜品种的成分分析

附件 12: 抗除草剂 (杂交) 油菜转化事件 Oxy-235 的环境风险评估

公司名称声明

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

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

商业保密资料声明

本申报书《转oxy基因抗除草剂油菜Oxy-235安全证书（进口）申请》为拜耳作物科学公司申请资料，包含了拜耳作物科学公司开发并拥有的商业保密资料。这些保密资料除了提供产品的食品安全和环境安全方面的信息外，还包含了最基本的产品分子特征信息和关键的遗传序列信息。此外，保密商业资料还包括为获得抗除草剂油菜Oxy-235产品商业化批准而开展的相关研究必不可少的研究思路。这些技术和数据是拜耳作物科学公司花费了大量的人力和财力获得的，目前，拜耳作物科学公司只向各国农业转基因生物行政主管部门提交这些保密商业资料，用于法规安全评价和审批。商业保密信息应受到保护以免泄漏，一旦拜耳作物科学公司的竞争对手获得这些资料，他们将会以很少人力物力投入在短时间内开发出类似的相应产品，会对拜耳作物科学公司在同行业的竞争中造成实质性的危害。

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

一、申请表

农业转基因生物安全证书申请表

项目概况	项目名称	转 <i>oxy</i> 基因抗除草剂溴苯腈双低油菜 Oxy-235 安全证书（进口）申请					
	项目来源	拜耳作物科学公司					
转基因生物概况	类别	动物 <input type="checkbox"/>		植物 <input checked="" type="checkbox"/>	微生物 <input type="checkbox"/> (选 <input checked="" type="checkbox"/>)		
	转基因生物名称		抗除草剂溴苯腈油菜 Oxy-235				
	受体生物	中文名	油菜（甘蓝型）	学名	<i>Brassica napus</i> L. <i>Oleifera</i>		
		分类学地位	十字花科芸薹属	品种（品系）名称	Westar	安全等级	I
	目的基因 1	名称	<i>oxy</i>	供体生物	肺炎克雷伯氏臭鼻亚种 (<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>)		
		生物学功能	抗除草剂溴苯腈 (bromoxynil)				
		启动子	P35S	终止子	3'nos		
	载体 1	pRPA-BL-235		供体生物	根瘤农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)		
	* 标记基因 1	名称	无	供体生物	无		
		启动子	无	终止子	无		
	* 报告基因 1	名称	无	供体生物	无		
		启动子	无	终止子	无		
	调控序列 1	名称	Rubisco SSU	来源	玉米		
		功能	稳定腈水解酶的表达				
转基因方法	农杆菌介导转化方法		基因操作类型	2			
转基因生物品系（株系）名称	无		转基因生物品系（株系）个数	无			
转基因生物安全等级	I		转基因生物产品安全等级	I			
试验概况	中间试验情况	转基因生物名称及编号	可以不填写				
		批准文号	可以不填写				
		试验的时间、地点和规模	可以不填写				
	环境释放情况	转基因生物名称及编号	可以不填写				
		批准文号	可以不填写				
		批准时间、地点和规模	可以不填写				
	生产性试验情况	转基因生物名称及编号	可以不填写				
		批准文号	可以不填写				

况	批准时间、地点和规模	可以不填写				
拟申请使用范围(省、自治区、直辖市)		境内				
拟申请使用年限		3年				
申请单位概况	单位名称	拜耳作物科学公司		地 址	北京市朝阳区东三环南路2号 航华科贸中心二号楼7层	
	邮 编	100022		电 话		
	传 真			电子邮件		
	单位性质	境内单位(事业 <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			电 话		
	传 真			电子邮箱		
	联系人姓名			电 话		
	传 真			电子邮箱		
研制单位概况	单位名称	拜耳作物科学公司		法人代表		
	联系人姓名			电 话		
	传 真			电子邮箱		
	主 要 完 成 人					
	姓名			性别	男 出身年月	
	学历	博士		专业技术职务	全球法规部经理	
	何时何地曾从事何种基因工程工作	于1991年11月在加拿大萨斯克彻温省若季那市赫司特公司				
	参 与 完 成 人					
	姓名	年龄	学历	职称	单 位	在本项目中的分工
						分子生物
					分子生物	
					植物细胞生理	

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

二、项目内容摘要

拜耳作物科学公司已经开发出了抗除草剂有效成分溴苯腈（商品名为 Compass[®]）的油菜品种。抗溴苯腈的油菜品种是在特征清楚的转基因品系 Oxy-235 的基础上开发的。本材料总结了相关信息，以评估用 Oxy-235 油菜加工的食品和饲料的安全性和对人类健康的影响。

转基因油菜 Oxy-235 是由肺炎克雷伯氏臭鼻亚种 *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* 分离出来的天然 *oxy* 基因经合成转化而成的。*oxy* 基因编码腈水解酶，该酶能够将溴苯腈（bromoxynil）除草剂水解成对植物无毒的化合物，腈水解酶没有安全性方面的担忧。溴苯腈是低残留、苗后除草剂 Compass[®] 的活性成分，*oxy* 基因的表达赋予植物对除草剂溴苯腈的抗性。

利用农杆菌 *Agrobacterium* 介导的转化方法，将一个拷贝的 *oxy* 基因表达盒导入到了油菜栽培品种 Westar 中。*oxy* 编码序列受组成型表达启动子 35S 的调控。通过 Southern 印迹杂交鉴定插入特征，从而证实了 *oxy* 基因的插入，并且对插入的 DNA 和侧翼 DNA 进行了测序，插入的 DNA 由一个拷贝的 *oxy* 编码基因及相关的启动子序列和终止子序列组成。

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

对 Oxy-235 油菜的叶片和种子进行了 Western 印迹杂交分析，可知从 Oxy-235 叶片组织中提取的蛋白质中含有约 100 ppm 的腈水解酶蛋白质，在种子中含有约为 10 ppm 腈水解酶蛋白质。

与对应的常规油菜品种 Westar 进行的比较证明，两者的植物表型实质等同。通过评价与油菜品质和形态相关的参数，证实两者近似。此外，当转化事件 Oxy-235 与常规油菜杂交，转入到其他的油菜品种中，未测定到或观察到任何表型参数超出农业生产中常用的油菜植物的参数范围。

通过比较转基因油菜 Oxy-235 和非转基因油菜的主要营养成分的化学组成，证实两者等同。转基因油菜中已知的抗营养因子硫苷和芥酸与对应的常规油菜没有显著差异。未观察到可能的抗营养方面的问题或毒理学方面的问题。

对腈水解酶蛋白质性质的检测没有引起安全性方面的顾虑。食品和饲料供给中存在的腈水解酶无潜在的风险。腈水解酶蛋白与已知过敏原和毒素不具有序列同源性，且在消化环境中不稳定，没有产生安全性方面的担心。未鉴定到与这一新的蛋白即腈水解酶蛋白相关的新的属性方面的担忧或在人类膳食中油菜的已知作用之外的新的特性方面的担忧。

此外，根据农业部的要求，在国内开展了对 Oxy-235 油菜的食用安全性和环境安全性检测，检测单位为天津市卫生防病中心、华中农业大学和中国农业科学院油料作物研究所。

90 天大鼠喂养和抗营养成分检测结果表明：未发现 Oxy-235 油菜对试验大鼠体重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察有生物学意义的改变；在硫苷和芥酸两个指标方面 Oxy-235 油菜与其亲本含量相似。

环境安全性检测结果表明：与常规油菜品种相比，除了能够耐受溴苯腈除草剂

之外，转基因油菜 Oxy-235 在生存竞争能力、表现型、对病害和捕食者的敏感性、产量等方面均无显著差异；对生物多样性研究表明，Oxy-235 对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种无显著差异。因此，转基因油菜 Oxy-235 与非转基因油菜在环境安全方面不存在差异。

综上，所有对转基因油菜 Oxy-235 的安全性评价数据均支持 Oxy-235 对人类健康及环境没有不良影响的结论。

迄今，加拿大、美国、日本和澳大利亚的行政当局已经承认源于 Oxy-235 品种的油料以及饲料产品可以安全地用于食品和饲料，并在加拿大和美国获得了商业化种植的批准。

三、工作目的和意义

基因改良的抗溴苯腈油菜将为油菜种植者们提供一种新的杂草管理工具。溴苯腈最早在二十世纪六十年代引进，在环境和毒物学方面都显示出有利的一面：溴苯腈可进行高度生物降解，无残留并对人体和野生动物区系具有极低的毒性。

油菜品种抗溴苯腈的有效性使得种植者们转向种植更有抵抗力的农产品，包括减少广谱除草要求使用的除草剂总剂量和工人暴露在农药的程度。

油菜加工产品在食品和饲料中的应用非常普遍：油料既可以单独食用也可以用作其它食品的添加成分，菜籽油粕则可以不同比例加入饲料中。正如本文所述，没有迹象显示，Oxy-235 的遗传改良对由转基因甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 加工而成的食品和饲料的安全性没有任何负面作用。在开发这种抗除草剂的油菜系统的过程中，拜耳作物科学公司及世界上一些独立的研究专家和协调机构已经证明 Oxy-235 品系对环境是安全的。

加拿大、美国、日本和澳大利亚的行政当局已经承认源于 Oxy-235 品种的油料以及饲料产品可以安全地用于食品和饲料。在加拿大主要种植区目前正在种植已经商品化的源于 Oxy-235 系的甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 品种。在经济种植区收获的农产品将作为原材料在国内或出口到国外进行加工。菜油料和菜籽粕是其主要的产品，加工后可以分别用于人类食品和动物饲料。这一油菜品种是“双低”品种，由此生产的油料其芥酸含量和加工油菜籽粕中硫甙含量均低，从而提高了品质。由于国际农产品贸易的进行，在不久的将来中国也会有这种经 Oxy-235 原料加工得到的食品和饲料。

四、国内外研究的相关背景材料

油菜是我国最重要的食用油和饲料蛋白来源，也是全世界仅次于大豆排名第二位的油料作物。特别是上世纪六七十年代双低油菜种植面积不断增大，成为首要的食用油料作物之一。油菜属于十字花科芸苔属，起源于非常有限的地理区域内芜菁和白菜基因组的自然杂交，是目前转基因植物中研究最多的植物之一。

杂草是影响油菜产量的一个重要因素，因此使得杂草控制对于油菜生产相当重要。抗除草剂油菜的出现为农户的耕种提供了巨大的便利。种植抗除草剂转基因油菜后，可以直接在油菜生长期喷施合适的除草剂来控制杂草，因此无需耕地就可以直接播种，有利于水土保持。抗除草剂油菜的种植主要分布在加拿大和美国，在澳大利亚也有种植，农民欢迎此项新技术，因为它促使种植业能够成功地防治杂草，降低除草剂用量及其在土壤中的残留，减少除草剂混用及多次处理。

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

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

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

从 1990 年开始，已经在欧洲和加拿大对抗溴苯腈油菜品系 Oxy-235 进行了田间实验，对农艺性状、产量、疾病敏感性、性状稳定性和对溴苯腈的抗性等方面进行了评估。田间实验的结果证明 Oxy-235 可以获得对溴苯腈的抗性，其农艺性状与传统油菜相似。

1997 年加拿大 CFIA 首次批准 Oxy-235 油菜品系上市，随后美国、日本也进行了批准。目前要获得 Oxy-235 需从加拿大购买。

参考文献:

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

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

五、安全性评价

1 受体植物的安全性评价

1.1 受体植物的背景资料：

1.1.1 学名、俗名和其他名称；

学名：*Brassica napus* L. *oleifera*

常用名：油菜

1.1.2 分类学地位；

科：十字花科

属：芸苔属

种：*napus*

亚种：*oleifera*

常用名：油菜

1.1.3 试验用受体植物品种（或品系）名称；

受体名称为 Westar。

1.1.4 是野生种还是栽培种；

甘蓝型油菜 *Brassica napus* 的野生型尚存在，常见的是栽培种。

1.1.5 原产地及引进时间；

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

1.1.6 用途；

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

尽管菜籽油在亚洲已经被广泛的用作食用油，但只有通过育种改良油的品质，并随着加工技术的改进，菜籽油才成为西方国家重要的食用油。

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

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

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

此外，油菜花器多，花期长，具有蜜腺，是良好的蜜源植物。

1.1.7 在国内的应用情况；

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

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

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

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

1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响；

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

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

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

1.1.9 从历史上看，受体植物演变成有害植物（如杂草等）的可能性；

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

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

1.1.10 是否有长期安全应用的记录。

油菜在全世界范围内的栽培已经具有 3000 多年的历史。油菜作物在加拿大的栽培已经进行了 20 多年，还没有关于对人类健康或环境产生不利影响的报导。菜籽油和饲料从来没有影响过食品/饲料的安全性。与其它食用油相比，菜籽油的临床和流行病学研究更加深入。这些研究集中于菜籽油对人类健康的影响，结果显示无芥酸菜籽油对人类健康具有安全性。此外，根据上述研究，美国食品和医药管理局在 1985 年将油菜列为普遍安全(Generally Recognised As Safe, GRAS)的农作物。油菜籽的副产物，菜籽油粕，被认为是一种高蛋白的动物营养。硫甙含量的减少和加工技术的优化提高了菜籽油粕的价值。根据营养含量，为每类动物都有提供最大用量水平的建议。

1.2 受体植物的生物学特性：

1.2.1 是一年生还是多年生；

油菜是一年生作物。

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

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

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

1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏原存在的部位及其致敏的特性；

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

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

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

1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率；

油菜的种内异交可以发生，距离花粉源1米的种内异交发生率报道为2%。然后随距离加大呈指数下降。油菜和亲缘杂草种在农田条件下发生种间杂交的可能性也已经被报道，在最适条件下与下述5种植物可能发生种间杂交：白菜型油菜 (*Brassica rapa*)，菜型油菜 (*Brassica juncea*)，萝卜型油菜 (*Raphanus raphanistrum*)，和白芥型油菜 (*Sinapis arvensis*)，杂交可能性按顺序依次降低。自然条件下，基因流动到野生亲缘种的频率非常低。异交频率决定于几个因素：比如异交的方向，风的方向，与花粉源的距离，农田地形，授粉者的有无，开花的同步性和性别亲和性。

由于进口的转基因原料只被用作加工用原料，不会释放到环境中。因此，在自然界发生异交的可能性很小。

1.2.6 育性（可育还是不育，育性高低，如果不育，应说明属何种不育类型）；

受体植物完全可育。油菜的繁殖方式是有性繁殖。

1.2.7 全生育期；

春油菜的生育期从发芽到成熟为90天到110天不等。

1.2.8 在自然界中生存繁殖的能力，包括越冬性、越夏性及抗逆性等。

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

1.3 受体植物的生态环境：

1.3.1 在国内的地理分布和自然生境；

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

我国冬油菜种植面积约占全国油菜面积的90%，分布在上海、江苏、浙江、安徽、湖北、湖南、江西、福建、广东、广西、河南、山东、云南、贵州等省（市、区），以及四川雅安地区以东，陕西、甘肃、山西、河北等省南部地区，辽宁省

东南角，新疆伊犁河套。此外，西藏自治区局部河谷也有种植。以长江流域及其支流、太湖、鄱阳湖、洞庭湖冲积平原以及四周的低山丘陵地区最为集中，其中安徽省种植面积最大，四川省总产量最高。

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

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

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

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

1.3.2 生长发育所要求的生态环境条件，包括自然条件和栽培条件的改变对其地理分布区域和范围影响的可能性；

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

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

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

1.3.3 是否为生态环境中的组成部分；

在栽培油菜的农业区域，如中国，油菜是生态环境的一个组成部分。

1.3.4 与生态系统中其他植物的生态关系，包括生态环境的改变对这种（些）关系的影响以及是否会因此而产生或增加对人类健康和生态环境的不利影响；

鉴于油菜长期的安全种植历史，认为油菜是对环境和生态没有危害的作物。

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

油菜不具有任何植物的植化相克性或杀虫性，也不是具有环境蔓延性的物种。因此，油菜能够互作的生物仅限于其将油菜作为寄主的一些微生物和一些将油菜作为食物的食草动物。迄今未发现环境的某些特定改变可以使得油菜和某些生物的互作发生改变，也没有发现油菜对生态环境和人类健康有任何负面影响。

1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度；

正如上文所述，油菜已经安全种植了很长时间，且是生态环境的一部分，迄今未发现油菜对生态环境存在负面影响或潜在危害。进口油菜只用作加工原料，不会对生态环境产生影响。

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

不适用。因为油菜属于主要农作物，在中国已种植多年。

1.4 受体植物的遗传变异：

1.4.1 遗传稳定性；

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

1.4.2 是否有发生遗传变异而对人类健康或生态环境产生不利影响的资料；

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

1.4.3 在自然条件下与其他植物种属进行遗传物质交换的可能性；

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

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

1.4.4 在自然条件下与其他生物（例如微生物）进行遗传物质交换的可能性。

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

1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性。

就所有作物而言，收获时散落在土壤里的一些种子会在下一茬作物播种前后萌发，在很多情况下自然落粒生长的植物可能与播种作物产生竞争，引起产量下降，此种情况需要进行化学（除草剂使用）或机械控制，以除去自生苗。

通常于次年在种植油菜的田间对再生植物进行监控，然后按常规的杂草管理措施将其杀死。

1.6 受体植物的其他资料。

无

1.7 根据上述评价，参照本办法第十一条有关标准划分受体植物的安全等级。

综上所述，油菜对人体或者动物不具有毒性，对环境产生负面效应或者演变成一种有害的生物的可能性极小。因此，根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十一条的规定，本项目的受体植物的安全等级为I。

2 基因操作的安全性评价

2.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的叙述。

拜耳作物科学公司通过农杆菌介导的转化方法开发出了抗溴苯腈除草剂油菜转化事件Oxy-235。该转基因油菜表达由oxy基因编码的腈水解酶。腈水解酶能够将bromoxynil除草剂水解成对植物无毒的化合物，从而赋予植物对苗后除草剂溴苯腈（Compas®的活性成分）的抗性。腈水解酶仅仅在很窄的pH值范围内有活力。在35℃，pH 9.2时，腈水解酶活性最大，并且不随底物的不同而改变。通过富集土壤中的可以快速代谢除草剂溴苯腈（3,5-二溴-4-羟基苯甲腈）的微生物，得到几种代谢除草剂溴苯腈的微生物，这些微生物可以利用溴苯腈作为炭源。其中肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种可以使0.05%的溴苯腈完全转化为3,4-二溴-4-苯甲酸并利用被释放的氨作为唯一炭源。对该菌进行的细胞提取液进行分析，证明具有代谢溴苯腈能力的为腈水解酶，将该酶对溴苯腈与3-溴-4-羟甲基苯甲腈和4-羟基苯甲腈的代谢能力进行对比，结果表明以这两种物质为底物生成的氨分别比溴苯腈为底物生成的氨少6倍和75倍。3,5-二溴-4-羟甲基苯甲酰胺和苯甲腈都不是该酶的高效底物。而对于诺卡氏菌属的腈水解酶来说，溴苯腈和3,5-二溴-4-羟甲基苯甲酰胺都不是该酶的高效底物。以上结果说明克雷伯氏菌的腈水解酶对溴苯腈具有较高的底物专一性，专一性的顺序为溴苯腈>3-溴-4-羟甲基苯甲腈>4-羟基苯甲腈>3,5-二溴-4-羟甲基苯甲酰胺或苯甲腈。此外，其生化研究结果表明腈水解酶催化的反应不可逆。

2.2 实际插入或删除序列的以下资料：

2.2.1 插入序列的大小和结构，确定其特性的分析方法；

油菜转化事件 Oxy-235 是通过农杆菌 *Agrobacterium* 介导转化的方法，将质粒载体 pRPA-BL-235 中含有的 oxy 基因转入油菜 Westar 品种而获得的，赋予植物溴苯腈的抗性。

Southern杂交和PCR分析证实，Oxy-235含有一个T-DNA拷贝，其组织情况与最初的转化载体pRPA-BL-235相同。

Oxy-235 中插入片段中包含的遗传元件见表 1。

表1：Oxy-235插入序列中的遗传元件总结

序列特征	在Oxy-235事件序列中的位置
5' 侧翼序列	bp 1 → bp 270
LB	bp 271 → bp 291
P35S	bp 535 → bp 1419
5'ssuZm	bp 1424 → bp 1467
oxy	bp 1468 → bp 2463
3'nos	bp 2654 → bp 2850
RB	bp 3146 → bp 3149
3'侧翼序列	bp 3150 → bp 3385

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

图 1: Oxy-235 插入序列及侧翼序列

2.2.2 删除区域的大小和功能；

抗溴苯腈油菜 Oxy-235 通过导入 *oxy* 基因而获得抗除草剂能力,开发 Oxy-235 油菜的过程中并未去除受体植物中的遗传物质。

2.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列；

A. *oxy* 基因大小为 996 bp, 核苷酸序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

B. 腈水解酶蛋白质序列有331个氨基酸，推导的氨基酸序列

```
1 MDTTFKAAAV QAEPVWMDAA ATADKTVTLV AKAAAAGAQL VAFPELWIPG YPGFMLTHNQ
61 TETLPFIKY RKQAIADGP EIEKIRRAAQ EHNIALSFGY SERAGGTLYM SQMLIDADGI
121 TKIRRRKLPK TRFERELFGE GDGSDLQVAQ TSVGRV GALN CAENLQSLNK FALAAQGEQI
181 HISAWPFTLG SPVLVGD SIG AINQVYAAET GTFVLMSTQV VGPTGIAAFE IEDRYNPNQY
241 LGGGYARIYG PDMQLKSKSL SPTEEGIVYA EIDL SMLEAA KYSLDPTGHY SRPDVFSVSI
301 NRQRQPAVSE VIDSN GDEDP RAACEPDEGG S
```

2.2.4 插入序列在植物细胞中的定位（是否整合到染色体、叶绿体、线粒体，或以非整合形式存在）及其确定方法；

通过孟德尔遗传规律对其后代的观察，可以确定转基因被插入到细胞染色体中。

在插入 pRPA-BL-235 的过程中，限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别只有一个作用位点。*EcoR* I 的作用位点位于离左端大约 1.2 kbp 的位置，*Hind* III 的作用位点在离 *EcoR* I 的位点大约 1.5 kbp 的位置。根据基因的构件原理，每条链上经过内切酶切割后的片段数目就是植物染色体 DNA 中存在的 *oxy* 基因数目。然而，两种酶一起作用时，就会丢掉一个与编码区具有相应大小的 1.15 kbp 的片段。与 *oxy* 基因探针进行杂交的三个片段被以下三种情况下分别切割下三个不同的片段（图 2）：

用 *EcoR* I 酶切，切割下的 *oxy* 基因对应的植物染色体 DNA 右端往下的 7.2 kbp 的片段；

用 *Hind* III 酶切，切割下的 *oxy* 基因对应的植物染色体 DNA 左端往下的 5.1 kbp 的片段；

用两种酶同时作用时，切割下与编码区对应的 1.15 kbp 的片段。

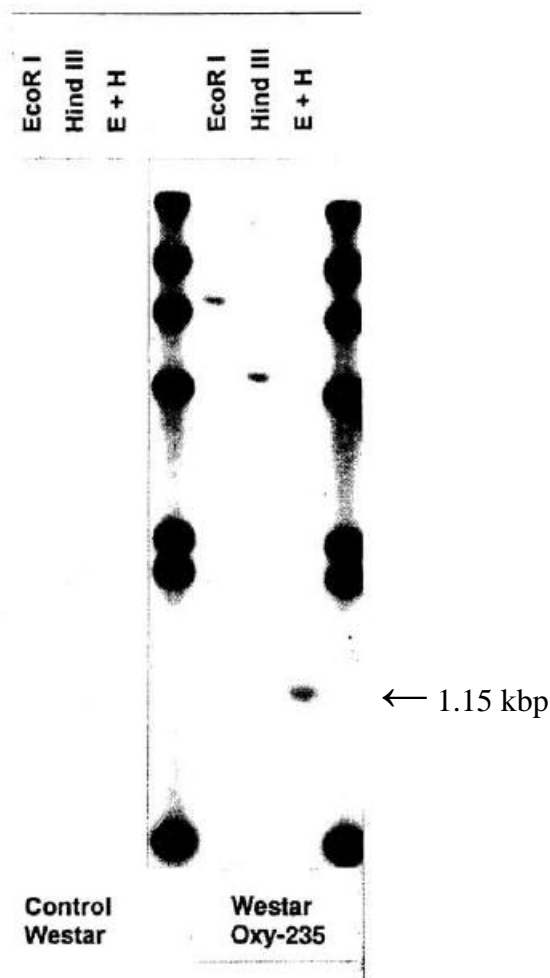


图 2: 用 southern 杂交对 *oxy* 基因进行的鉴定

2.2.5 插入序列的拷贝数。

提取转基因油菜 Oxy-235 和对应的非转基因油菜（品种 Drakkar）叶片的基因组 DNA，利用 P35S-5'ssuZm、*oxy* 探针、3'nos 探针和完整 T-DNA 探针对一系列酶切片段进行 Southern 杂交分析（图 3-图 8）。将基因组 DNA 进行限制性酶切得到的 DNA 片段用琼脂糖凝胶电泳分离后转化到膜上，将印迹与不同的探针进行杂交，来确定转基因油菜 *Brassica napus* Oxy-235 插入 DNA 的拷贝数和结构。

图 3 表示的是质粒 pRPA-BL-235 中所含限制性内切酶酶切位点的图谱。图 4 表示的是不同限制性酶切消化产物和所用的探针模板的线性图。杂交结果见图 5，图 6，图 7 和图 8，总结于表 2。

阴性对照（用 *EcoR* I 酶切消化从非转基因油菜 Drakkar 中制备的基因组 DNA）结果表明没有背景杂交，原因是在野生型油菜中不存在与所用探针模板杂交的靶序列（图 5，图 6，图 7，图 8，第 12 泳道）。阳性对照（用 *EcoR* I 酶切消化从非转基因油菜 Drakkar 中制备的基因组 DNA，同时加上约 1 拷贝的 *EcoR* I 酶切消化的转化质粒 pRPA-BL-235）结果表明：它与各探针模板杂交会产生预期大小的 9013 bp 的杂交片段（图 5，图 6，图 7 和图 8，第 13 泳道）。这些结果表明 Southern 印迹杂交分析是在保证探针模板可以与靶序列杂交的条件下进行的。

*Bsa*H I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交, 结果发现一个 2275 bp 左右大小的 5'端整合片段 (图 5, 第 2 泳道)。 *Bsa*H I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 3'nos 探针杂交, 结果产生一个 1650 bp 左右大小的 3'端整合片段 (图 7, 第 2 泳道)。 *Bsa*H I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 *oxy* 探针和完整的 T-DNA 探针杂交, 结果表明出现两个杂交片段: 一个 2275 bp 左右大小的 5'端整合片段, 一个 1650 bp 左右大小的 3'端整合片段 (图 6 和图 8, 第 2 泳道)。

Xmn I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交, 结果表明出现两个杂交片段: 一个预期大小的 462 bp 的内部片段和一个约 1125 bp 的 5'端整合片段 (图 5, 第 3 泳道)。 *Xmn* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 *oxy* 探针杂交, 结果产生预期大小的 462 bp 的内部片段和一个约 1600 bp 的 3'端整合片段 (图 6, 第 3 泳道)。 *Xmn* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 3'nos 探针杂交, 只可见到 1600 bp 左右大小的 3'端整合片段 (图 7, 第 3 泳道)。如预期的一样, *Xmn* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 可获得所有这 3 个片段 (图 8, 第 3 泳道)。

Hpa I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 P35S-5'ssuZm 探针、*oxy* 探针和 3'nos 探针杂交, 预期将产生一个长度大于 2619 bp 的 5'端整合片段。杂交结果表明出现一个 4800 bp 左右大小的 5'端整合片段 (图 5, 图 6 和图 7, 第 4 泳道,)。 *Hpa* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 则在约 4800 bp 左右大小的 5'端整合片段的位置出现一个约 3350 bp 大小的 3'端整合片段 (图 8, 第 4 泳道)。

用 *Sph* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与各探针杂交, 结果获得的片段呈弥散状, 这可能是由于基因组 DNA 只得到了部分的酶切消化 (图 5, 图 6, 图 7 和图 8, 第 5 泳道)。从这一限制性酶切消化中无法得出结论。

*Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针和 3'nos 杂交, 表明出现一个 7000 bp 左右大小的 3'端整合片段 (图 6, 图 7, 第 7 泳道)。由于 *Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针之间的重复区太小 (197 bp), 因此两者杂交之后没有得到这一整合片段。只看到一个 1175 bp 左右大小的 5'端整合片段 (图 5, 第 6 泳道)。 *Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交时, 可获得 1175 bp 左右大小的 5'端整合片段和 7000 bp 左右大小的 3'端整合片段 (图 8, 第 6 泳道)。

Afl III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 预期将产生两个整合片段以及大小为 1278 bp, 735 bp 和 178 bp 的 3 个内部片段。不过, 只可见到 1278 bp 和 735 bp 的内部片段以及一个 1675 bp 左右大小的 3'端整合片段。此 178 bp 的内部片段太小, 电泳时跑离了凝胶, 同时 5'端整合片段和 T-DNA 探针间的重复区太小 (只有 230 bp), 因而无法产生可检测到的杂交片段。5'端整合片段与 P35S-5'ssuZm 探针间的重复区甚至更短 (60 bp), 这就能够解释为什么 *Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交之后不存在 5'端整合片段。可检测到预期大小的 1278 bp 的内部片段 (图 5, 第 7 泳道)。 *Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针杂交, 表明出现预期大小的 1278 bp 和 735 bp 的内部片段 (图 6, 第 7 泳道)。 *Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 3'nos 探针杂交, 可产生 735 bp 大小的内部片段和一个 1675 bp 左

右大小的 3'端整合片段（图 7，第 7 泳道）。这两种情况下，均不见 178 bp 的内部小片段。

Nco I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交，表明出现两个杂交片段：一个预期大小的 494 bp 的内部片段和一个长度大于 14 kb 的 5'端整合片段（图 5，第 8 泳道）。5'端整合片段仅微弱可见。这可能是由于 5'端整合片段太长，加之与探针模板间只有有限的重复区。*Nco* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针和 3'nos 杂交，表明出现一个长度大于 14 kb 的 3'端整合片段（图 6 和图 7）。如预期的一样，*Nco* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交，可获得所有这 3 个片段（图 8，第 8 泳道）。也可极微弱地见到 3'端整合片段。

*Eco*R V 在插入的转基因序列中有一个切割位点。因此，预期将产生两个整合片段。不过，与各探针杂交之后，在印迹中只在约 7.1 kb 位置处见到一条条带。在另一实验中测定了插入序列的全序列，证实的确存在 *Eco*R V 酶切位点。这一观察结果可从两方面加以解释：或者是产生的这两个片段分子量十分相近，无法在凝胶上分开；或者是由于局部 DNA 结构的原因，插入序列中的 *Eco*R V 位点无法被消化。由于所有其他限制性内切酶的酶切图谱以及测序结果与非重排的 T-DNA 一致，因此假设 T-DNA 插入序列发生重排的可能性极低。

Hind III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针和 *oxy* 探针杂交，结果出现一个 4700 bp 左右大小的 5'端整合片段（图 5 和图 6，第 10 泳道）。*Hind* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 3'nos 探针和完整的 T-DNA 探针杂交，也在 4700 bp 左右大小的 5'端整合片段位置得到一个约 1375 bp 的 3'端整合片段（图 7 和图 8，第 10 泳道）。

由于 *Dra* I 在插入的转基因序列中没有识别位点，因此 *Dra* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与各探针杂交之后，只得到一个 3150 bp 左右大小的整合片段（图 5，图 6，图 7，图 8，第 11 泳道）。

综上所述，对转基因油菜 *Brassica napus* Oxy-235 进行的 Southern 印迹杂交结果表明：植物中转化的 DNA 与质粒 pRPA-BL-235 中设计的 DNA 结构一致。所获得结果表明在转基因油菜 Oxy-235 中整合进了一个拷贝的基因盒。

表 2: 转基因油菜 Oxy-235 插入 DNA 的验证—预期的和得到的杂交片段

Digest	P35S – 5'ssuZm probe		oxy probe		3'nos probe		complete T-DNA probe		Fragment description
	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	
<i>Bsa</i> HI	>1799 bp -	ca. 2275 bp -	>1799 bp >1103 bp	ca. 2275 bp ca. 1650 bp	- >1103 bp	- ca. 1650 bp	>1799 bp >1103 bp	ca. 2275 bp ca. 1650 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Xmn</i> I	>989 bp 462 bp -	ca. 1125 bp 462 bp -	- 462 bp >1451 bp	- 462 bp ca. 1600 bp	- - >1451 bp	- - ca. 1600 bp	>989 bp 462 bp >1451 bp	ca. 1125 bp 462 bp ca. 1600 bp	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Hpa</i> I	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp >283 bp	ca. 4800 bp ca. 3350 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Sph</i> I	>2171 bp -	(1)	>2171 bp 188 bp -	(1)	- 188 bp >543 bp	(1)	>2171 bp 188 bp >543 bp	(1)	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Eco</i> RI	>1151 bp >1751 bp	ca. 1175 bp (2)	- >1751 bp	- ca. 7000 bp	- >1751 bp	- ca. 7000 bp	>1151 bp >1751 bp	ca. 1175 bp ca. 7000 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Afl</i> III	>248 bp 1278 bp - - -	(2) 1278 bp - - -	- 1278 bp 735 bp 178 bp -	- 1278 bp 735 bp (3) -	- - 735 bp 178 bp >463 bp	- - 735 bp (3) ca. 1675 bp (5)	>248 bp 1278 bp 735 bp 178 bp >463 bp	(2) 1278 bp 735 bp (3) ca. 1675 bp	5' integration fragment internal fragment internal fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Nco</i> I	>705 bp 494 bp -	>14 Kb (5) 494 bp -	- - >1703 bp	- - >14 Kb	- - >1703 bp	- - >14 Kb	>705 bp 494 bp >1703 bp	>14 Kb (5) 494 bp >14 Kb	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Eco</i> RV	>1029 bp >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	- >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	- >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	>1029 bp >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Hind</i> III	>2361 bp -	ca. 4700 bp -	>2361 bp -	ca. 4700 bp -	>2361 bp >541 bp	ca. 4700 bp ca. 1375 bp	>2361 bp >541 bp	ca. 4700 bp ca. 1375 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Dra</i> I	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	integration fragment
pRPA-BL-235 <i>Eco</i> RI	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	positive control

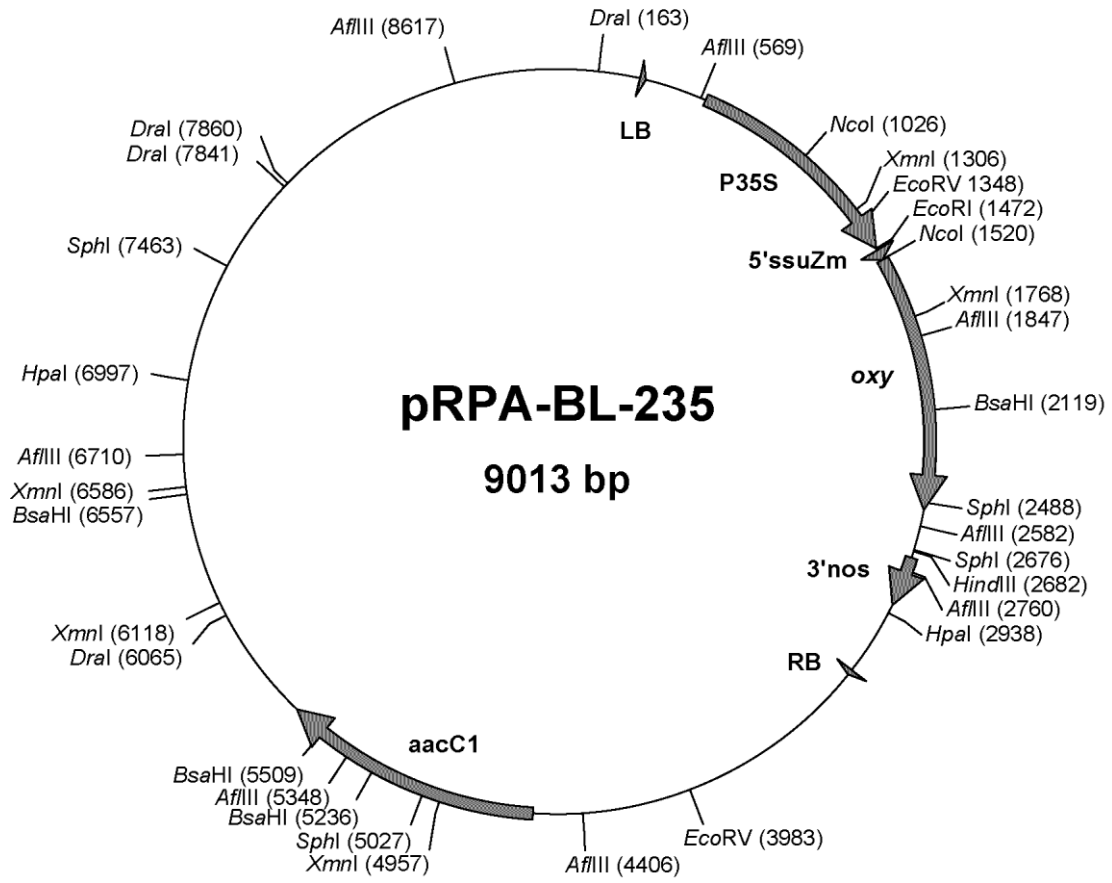


图 3: 质粒 pRPA-BL-235 图谱

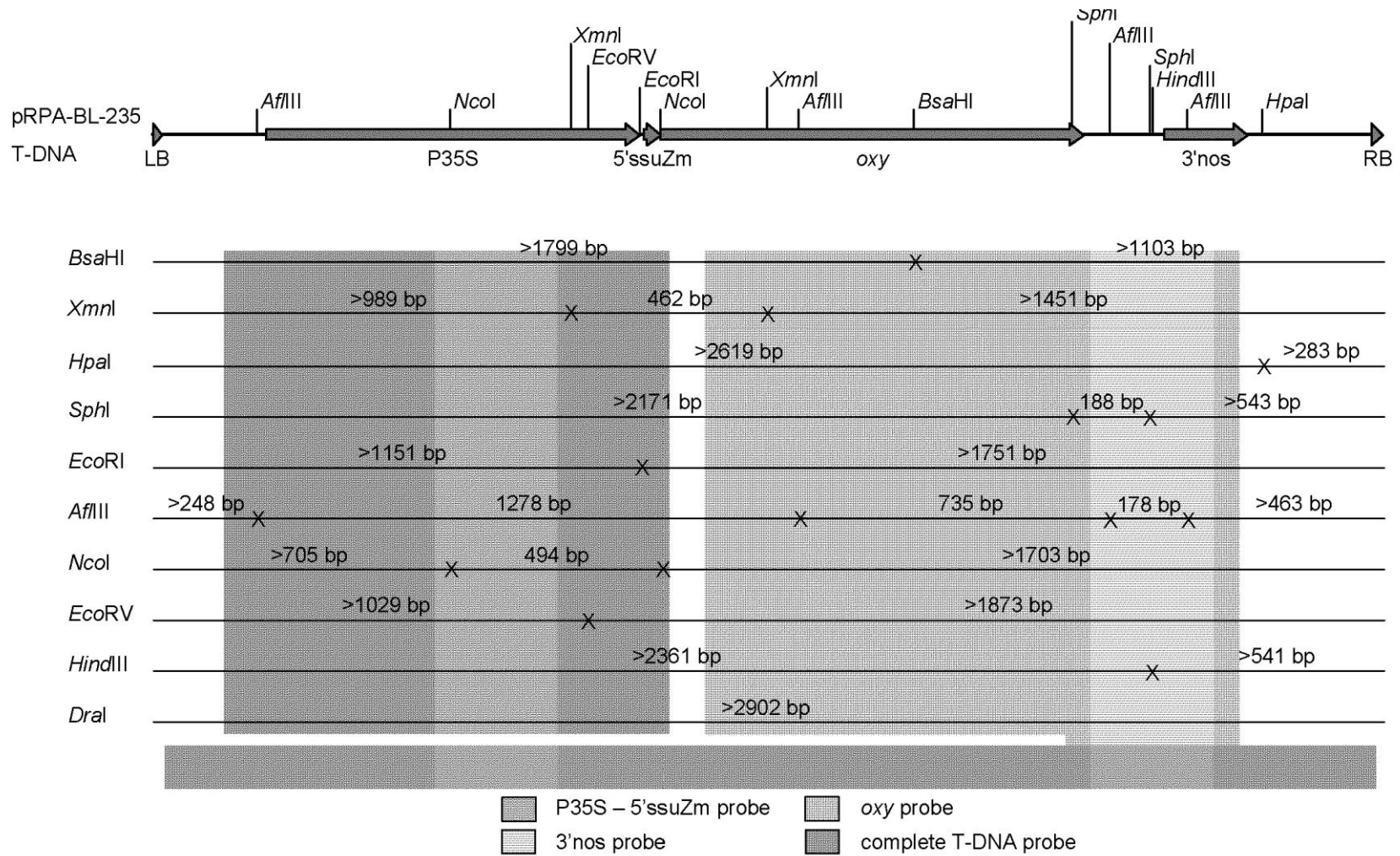


图 4: 质粒 pRPA-BL-235 的 T-DNA 结构图

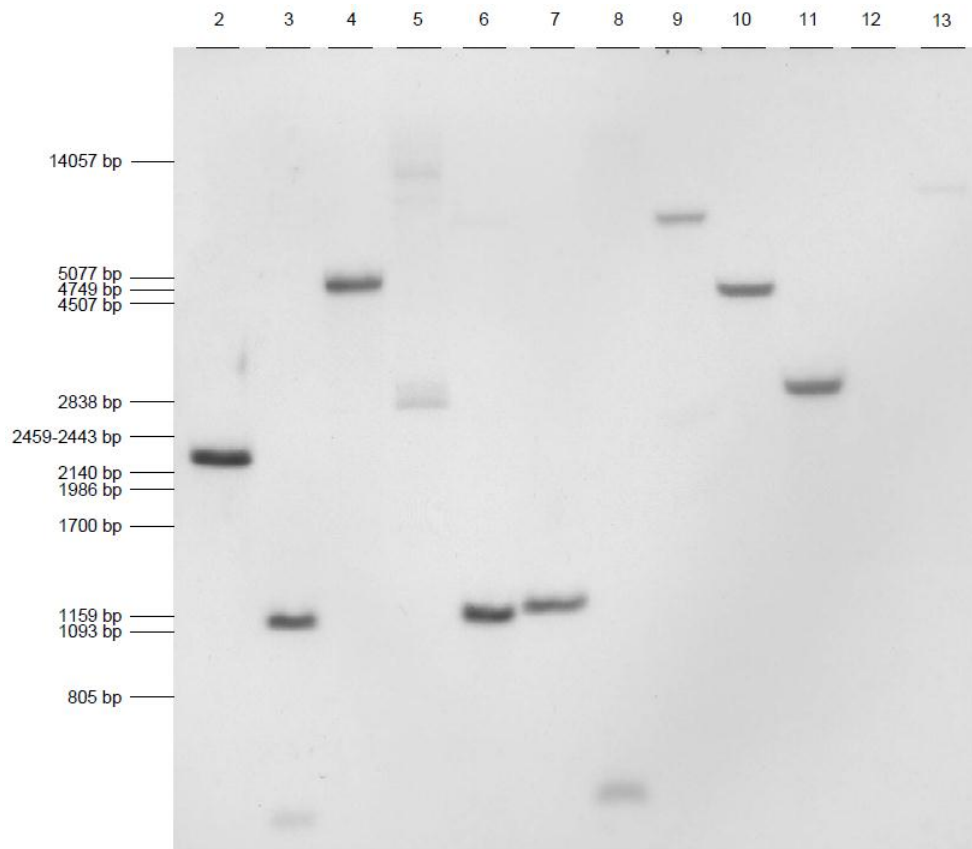


图 5: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—P35S-5'ssuZm 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*I 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn*I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa*I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph*I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco*I 单酶切

泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra*I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒

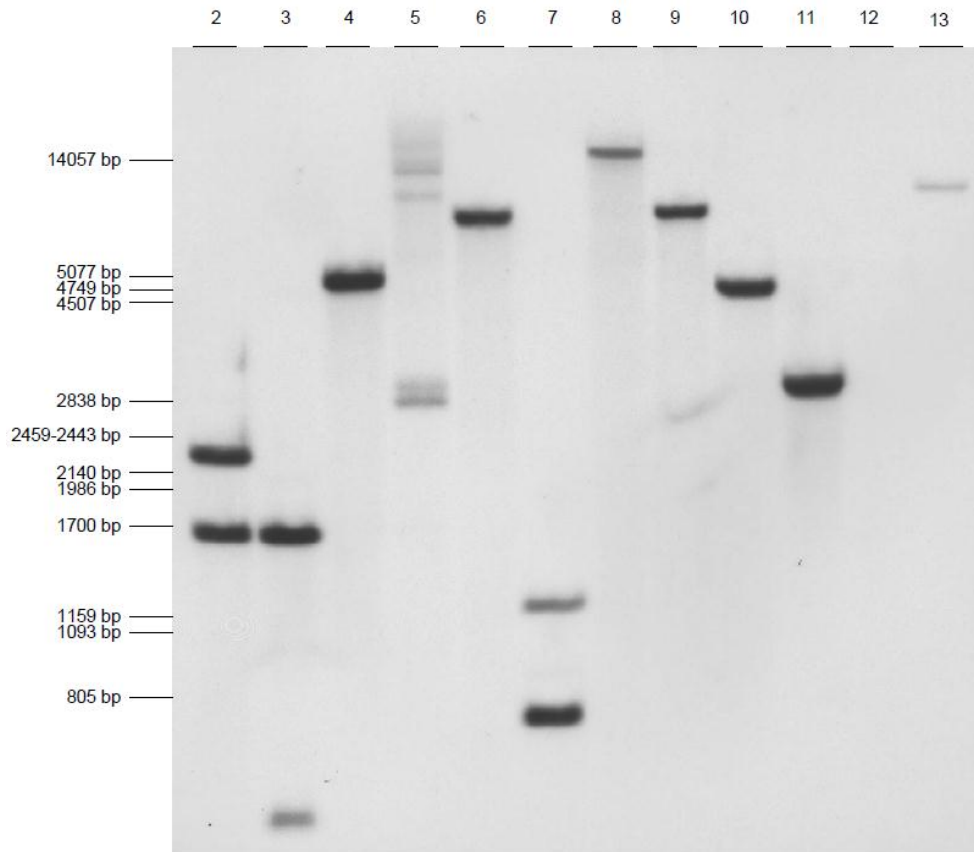


图 6: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—oxy 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*HI 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn*I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa*I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph*I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco*I 单酶切

泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra*I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar + *Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒

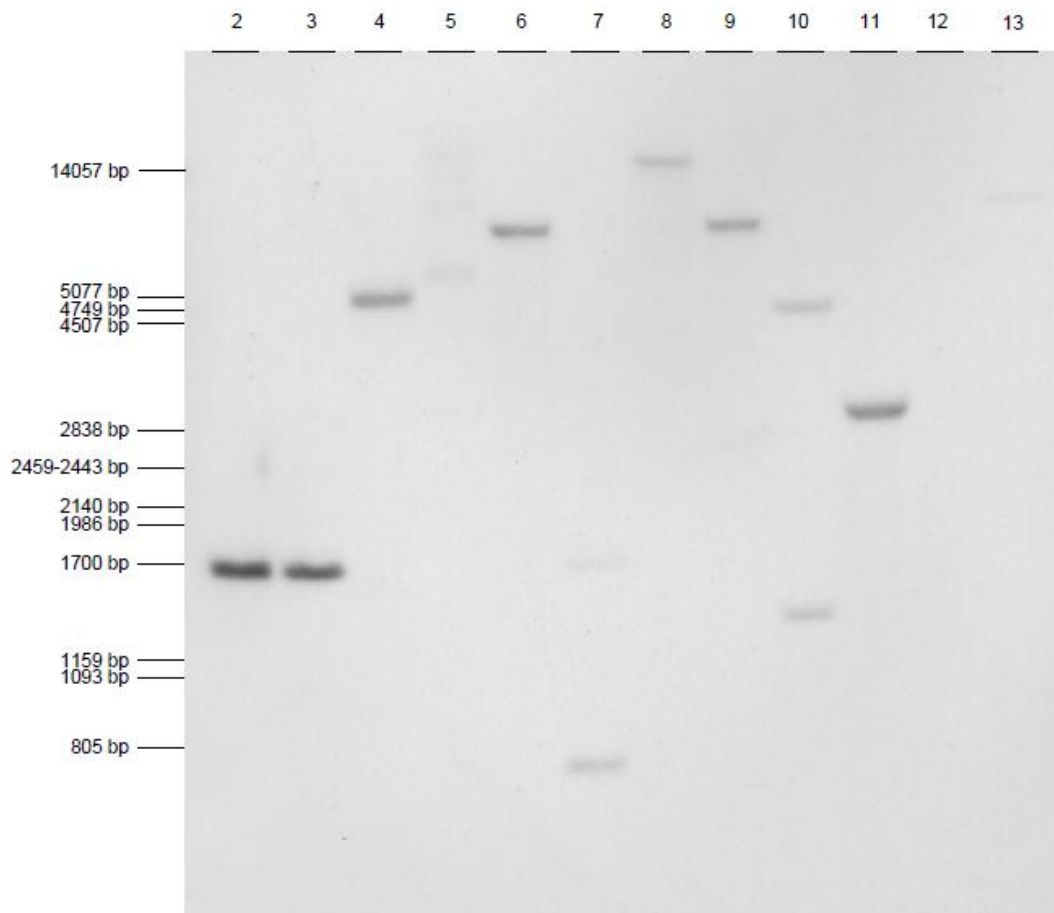


图 7：转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—3'nos 探针

上样顺序：

泳道 2：OXY-235 油菜：*Bsa*I 单酶切

泳道 3：OXY-235 油菜：*Xmn*I 单酶切

泳道 4：OXY-235 油菜：*Hpa*I 单酶切

泳道 5：OXY-235 油菜：*Sph*I 单酶切

泳道 6：OXY-235 油菜：*Eco*R I 单酶切

泳道 7：OXY-235 油菜：*Afl* III 单酶切

泳道 8：OXY-235 油菜：*Nco*I 单酶切

泳道 9：OXY-235 油菜：*Eco*R V 单酶切

泳道 10：OXY-235 油菜：*Hind* III 单酶切

泳道 11：OXY-235 油菜：*Dra*I 单酶切

泳道 12：野生型油菜 Drakkar：*Eco*R I 单酶切

泳道 13：*Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒

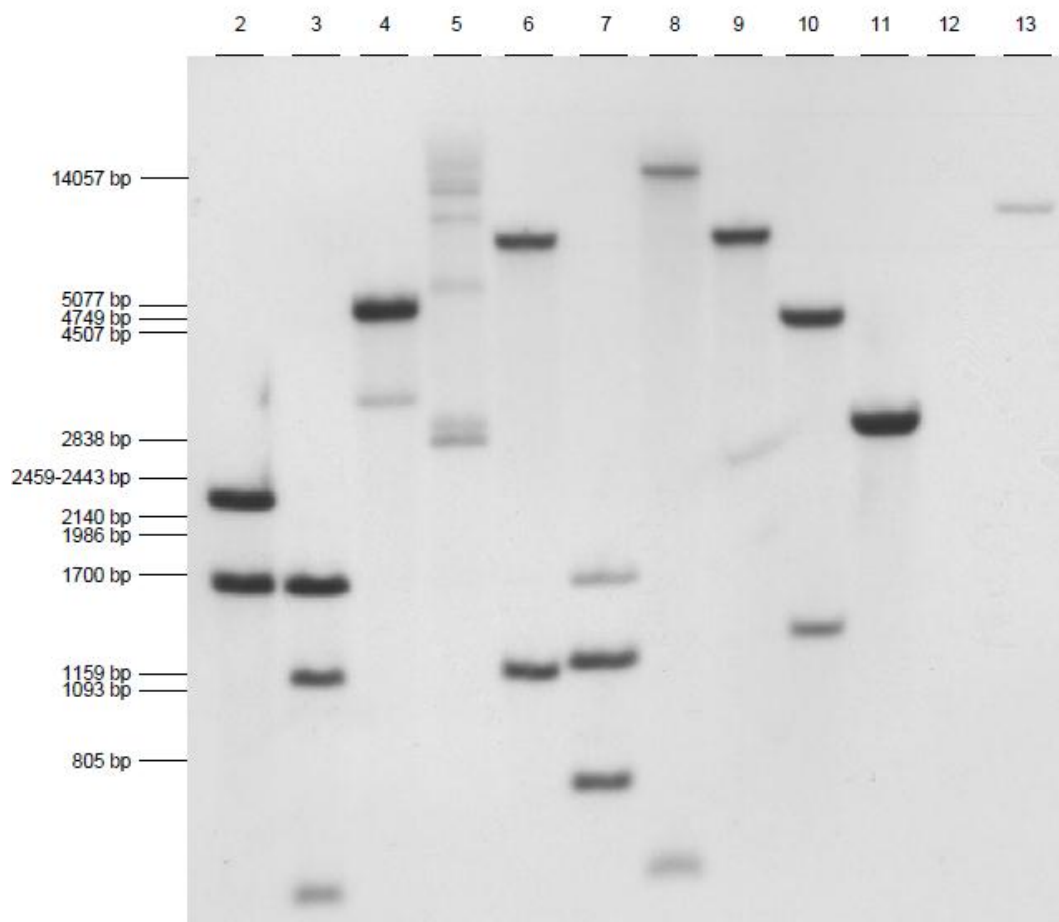


图 8: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—完整 T-DNA 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*I 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn*I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa*I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph*I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco*I 单酶切

泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra*I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒

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

用于Oxy-235油菜转化的载体是pRPA-BL-235质粒，利用根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）介导的转化方法对Westar品种进行转化。载体中含有oxy基因盒。pRPA-BL-235载体的图谱见图9。其中引起植物根瘤病的癌基因被删除。这些剔除了致瘤基因的载体没有致病的危险。此外，目前尚无资料表明该载体具有致病性或可能演变为致病性的结构。各遗传元件在载体图谱中展示（图9）并于表3中作具体描述。

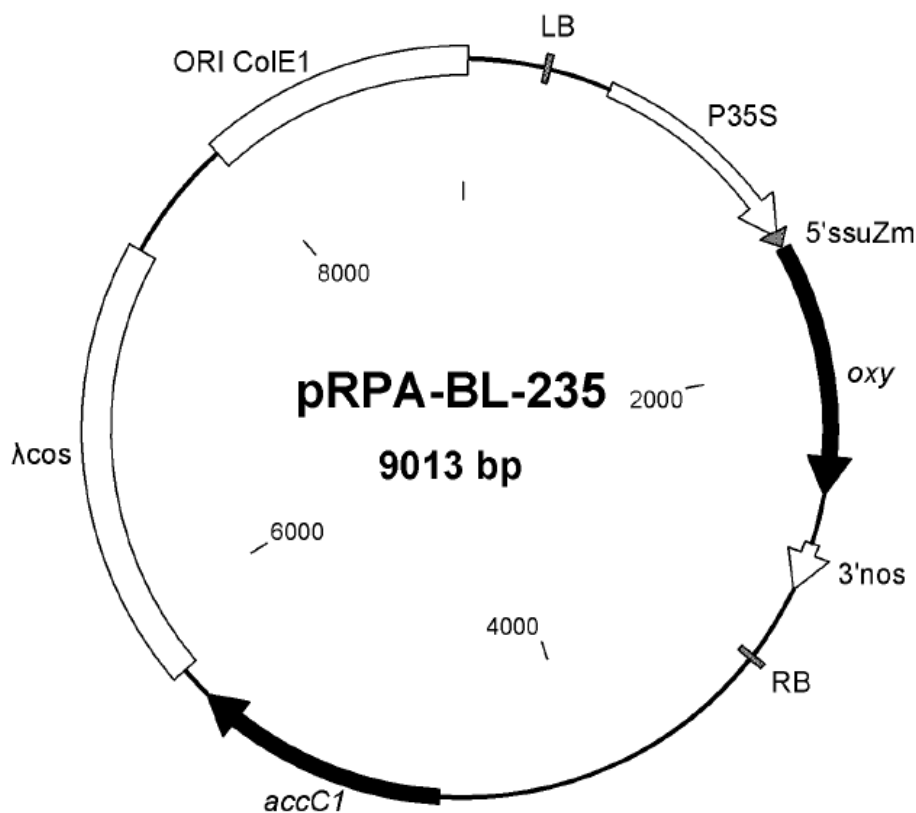


图 9：载体 pRPA-BL-235 图谱

表 3: pRPA-BL-235 的组成描述

在 pBRA-BL-235 中的位置	特征
bp 322 → bp 345	LB: 土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 的左边界重复序列 (Zambryski, 1988)
bp 346 → bp 1477	P35S: 包括启动子区域在内的花椰菜花叶病毒 35S 转录序列 (Odell <i>et al.</i> , 1985) (589 - 1473)
bp 1478 → bp 1521	5'ssuZm: 包括玉米 <i>Zea mays</i> 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基基因 (<i>ssuZm</i>) 先导序列在内的序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1988)。
bp 1522 → bp 2517	<i>oxy</i> : 肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种 <i>Klebsiella ozaenae subsp. Ozaenae</i> 脲水解酶基因的编码序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1988)
bp 2518 → bp 3199	3'nos: pTiT37 T-DNA 上包括 3'端非翻译区在内的胭脂碱合酶基因序列 (2708 - 2904) (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
bp 3200 → bp 3223	RB: 土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 的右边界重复序列 (Zambryski, 1988)
bp 3224 → bp 5741	<i>accCI</i> : 包括庆大霉素乙酰转移酶-3-1 基因 (<i>aacCI</i>) (赋予对庆大霉素的抗性) 在内的序列 (4597 - 5610) (Wohlleben <i>et al.</i> , 1989)
bp 7484 → bp 5742 (逆时针)	λ cos: 包括 λ -噬菌体 cos 位点在内的序列 (Hohn and Collins, 1980)
bp 7484 → bp 5742 (逆时针)	ORI ColE1: 质粒 pBR322 上包括复制原点在内的序列 (15 - 7965) (Bolivar <i>et al.</i> , 1977)

2.4 载体中插入区域各片段的资料:

2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称;

载体中插入了 *oxy* 基因盒。

启动子: 启动子区域来自于花椰菜花叶病毒。35S 启动子是一个组成型启动子, 广泛用于植物基因高效表达, 大小为 900 bp。

终止子: 3'nos 来自于土壤根癌农杆菌的 pTiT37 质粒上 T-DNA 的胭脂碱合成酶基因的终止子, 大小为 250 bp。

编码区: 合成的 *oxy* 基因 (来自于肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种), 大小为 996 bp。

2.4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称;

无。

2.4.3 其他表达调控序列的名称及其来源 (如人工合成或供体生物名称)。

来自于油菜的 Rubisco SSU 基因的非翻译部分的核苷酸序列插入到 35S 启动子和 *oxy* 基因编码区之间, 主要是为了稳定嵌合基因的表达, 大小为 50 bp。

2.5 转基因方法。

产生除草剂抗性油菜的植物Oxy-235的转化方法为土壤根瘤农杆菌介导转化法。使用包含质粒pRPA-BL-235无植物毒性的根瘤农杆菌EHA株，将oxy基因稳定的整合入Westar的基因组DNA中。当T-DNA整合入植物基因组后，通过溴苯腈对转化后的植物细胞进行筛选。数天后，用胍丁酰胺（抗菌药，Augmentin）将根瘤农杆菌细胞杀死。然后，通过处理双低油菜组织，刺激转基因细胞，形成幼芽，最终使幼苗在土壤中生长，检测其对除草剂溴苯腈的耐受性。

2.6 插入序列表达的资料：

2.6.1 插入序列表达的器官和组织，如根、茎、叶、花、果、种子等；

oxy基因由来自花椰菜花叶病毒的35S启动子调控。该启动子为组成型启动子。因此，脲水解酶蛋白在整个油菜植株中组成型表达。

利用Western印记杂交方法检测了来自于转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜植物叶片和种子中的脲水解酶含量。结果见2.6.2所述。

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法；

油菜 Oxy-235 的叶片和种子中的蛋白质检测

I. 检测脲水解酶的方法

为了鉴定油菜叶片组织中oxy编码的脲水解酶，以温室里生长的油菜叶盘（用微量离心管盖切割）为材料，利用热尿素（50 mM Tris-HCl pH 6.8、8M 尿素、2% SDS、5% β-巯基乙醇、10% 蔗糖、2 mM EDTA、10 mM DTT、0.005% 溴苯酚蓝，65℃）提取材料中的蛋白质。每个样品提取的蛋白成分利用Bradford蛋白分析蛋白成分。蛋白提取物煮沸5 min后，加入12%聚丙烯酰胺凝胶中160 V电泳1 h。蛋白在Tris-glycine缓冲液（0.025 M Tris、0.25 M 氨基乙酸、10% v/v 甲醇）中被电转至硝化纤维膜上，电转时间为1 h，恒流0.8 mA/cm²。硝酸纤维膜在TBS（50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl）中冲洗2 min，在摇床上于室温下在TTBS（50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl 和 2% Tween 20）中封闭30 min。Oxy脲水解酶来源于大肠杆菌。用常规方法制备提纯脲水解酶的兔抗体。

附着在硝化纤维滤膜上的Oxy脲水解酶的鉴别：首先在TTBS中与稀释1000倍的脲水解酶抗体共同孵育30 min或过夜，然后在TTBS中15 min冲洗3次。加入碱性磷酸酶和羊抗体在TTBS中5000倍稀释，30 min后用TTBS在15 min内冲洗3次并用TBS简单冲洗。有色反应产物在NBT/BCIP溶液[在10 ml底物缓冲液（0.1 M Tris-HCl pH 9.5、0.1 M NaCl 和 5 mM MgCl₂）中含3 mg 4-四唑硝基蓝和1.5 mg 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐]中显色30 min。

为了使样品中电泳脲水解酶含量增加，用Pansorbin使TBS中的油菜种子提取物发生免疫沉淀反应，检测方法同叶片。

II. 结果

利用上述方法检测来自两个油菜品种的蛋白质提取物：非转基因油菜Westar及Westar-Oxy-235/R3。结果表明，在油菜叶片提取物中很容易检测到脲水解酶（图10-A）。

因为很难从油菜种子提取物中检测到靶标蛋白质，在用电泳法分析油菜种子提取物中的脲水解酶之前，必须先使脲水解酶发生免疫沉淀反应（图 10-B）。

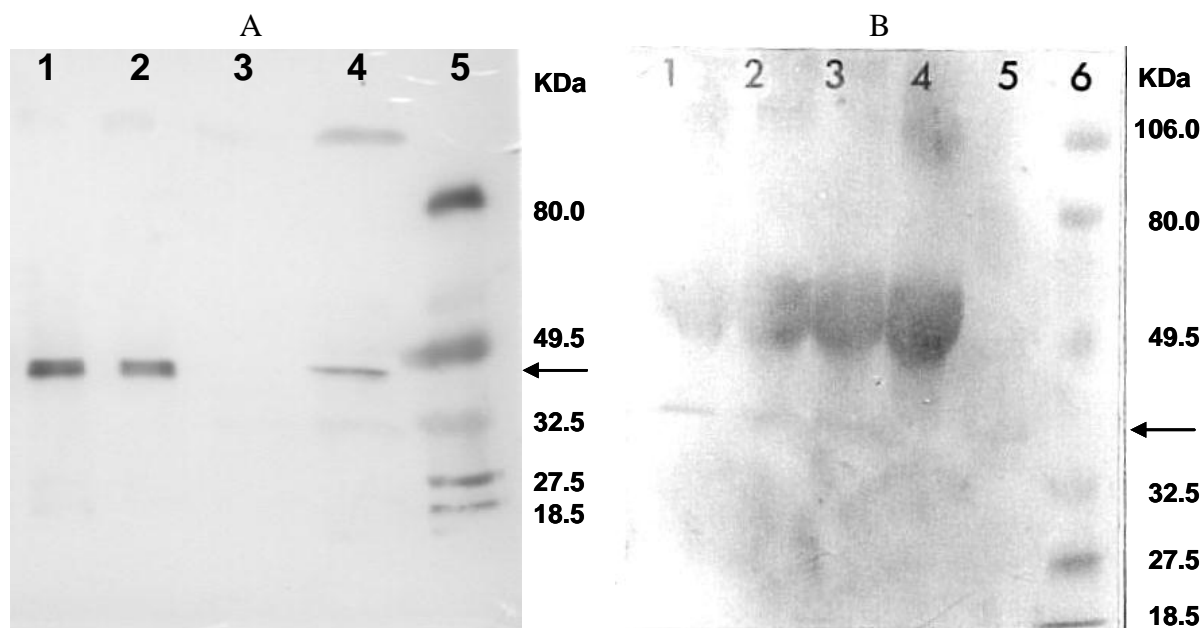


图 10：通过 Western 印迹分析检测 Oxy-235 油菜中的 Oxy 脲水解酶

A. 叶片（热尿素提取方法）

第 1 泳道：纯 Oxy 脲水解酶（*E. coli*）20 ng

第 2 泳道：纯 Oxy 脲水解酶（*E. coli*）10 ng

第 3 泳道：Westar（野生型油菜）¹

第 4 泳道：转基因品种 Oxy-235 Westar（R₃）¹

第 5 泳道：分子质量标记

B. 种子（为了浓缩将进行电泳的样品中的脲水解酶蛋白质，先用针对脲水解酶的抗体使蛋白质提取物沉淀）

第 1 泳道：转基因品种 Oxy-235 / Westar（R₃）²

第 2 泳道：提取所用缓冲液 + 10 ng 纯 Oxy 脲水解酶（*E. coli*）

第 3 泳道：Westar² + 10 ng 从纯 Oxy 脲水解酶（*E. coli*）

第 4 泳道：Westar（野生型油菜）²

第 5 泳道：纯 Oxy 脲水解酶（*E. coli*）10 ng

第 6 泳道：分子质量标记

¹ 在每条泳道上加样 50 μg 蛋白质

² 在每条泳道中，Oxy-235 油菜加 3.45 mg 蛋白，Westar 油菜加入 3.1 mg 蛋白

→：箭头所示表示 38 KDa 的 Oxy 脲水解酶

Oxy 脲水解酶含量的测定结果表明：对于油菜 Westar-Oxy-235 而言，oxy 编码的脲水解酶在种子中含有约为 10 ng/mg 的总可提取蛋白质（10 ppm），在叶片中含有约为 100 ng/mg 的总可提取蛋白质（100 ppm）。因此，油菜种子中含有细菌的脲水解酶，但浓度比叶片中的脲水解酶低 10 倍。

2.6.3 插入序列表达的稳定性。

外源基因在 Westar 遗传背景的品种中的插入和表达稳定性通过对除草剂抗性性状标准的孟德尔分离定律获得了验证。通过对 Oxy-235 转化体子代分离模式的彻底检测，表明已经发生了稳定的物理整合。

此外，通过常规杂交，将 Oxy-235 转化体转入到其他遗传背景品种中（Samourai）。对 Oxy-235（Samourai 遗传背景）和 Oxy-235（Westar 遗传背景）的第三代 DNA 进行了 southern 杂交分析。结果表明 *oxy* 基因在不同的遗传背景品种中稳定插入（图 11）。

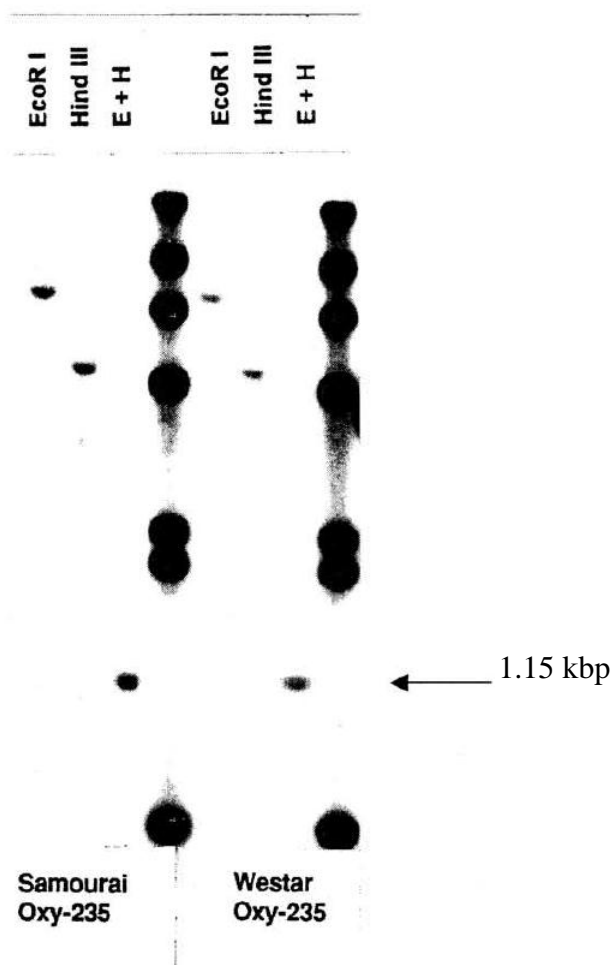


图 11: *oxy* 基因插入稳定性鉴定 (Southern blot)

2.7 根据上述评价，参照本办法第十二条有关标准划分基因操作的安全类型。

综上所述，油菜 Oxy-235 采用的基因操作为农杆菌介导的转化法。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十二条的相关标准，用于油菜 Oxy-235 的基因操作方法属于类型 2，不影响转基因生物的安全性，因此，安全等级为 I。

3 转基因植物的安全性评价

3.1 转基因植物的遗传稳定性。

外源基因在 Westar 遗传背景的品种中的插入和表达稳定性通过对除草剂抗性性状标准的孟德尔分离定律获得验证。通过对 Oxy-235 转化体子代分离模式的彻底检测，表明已经发生了稳定的物理整合。

此外，通过常规杂交，将 Oxy-235 转化体转入到其他遗传背景品种中（Samourai）。对 Oxy-235（Samourai 遗传背景）和 Oxy-235（Westar 遗传背景）的第三代 DNA 进行了 southern 杂交分析。结果表明 *oxy* 基因在不同的遗传背景品种中稳定插入。

3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异：

3.2.1 生殖方式和生殖率；

与常规的油菜植株相比较，*oxy* 基因的整合和表达没有给受体植株带来任何选择优势。

3.2.2 传播方式和传播能力；

与常规的油菜植株相比较，除了对溴苯腈除草剂具有抗性外，*oxy* 基因的整合和表达没有使受体植株具有任何传播优势。同样对它的传播能力也没有影响。

3.2.3 休眠期；

发芽能力（检测休眠的关键参数）和转基因油菜种子发芽能力的进化与非转基因油菜没有不同。

3.2.4 适应性；

转基因植株和非转基因植株在适应性和成长结实方面没有显示任何不同。

3.2.5 生存竞争能力；

2003 年中国农业科学院油料作物研究所对抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 的生存竞争能力检测结果表明：转基因品种与受体品种相比生存适合度没有改变，一般没有选择优势，但如果使用溴苯腈除草剂，抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 的抗溴苯腈基因有可能在自然界繁衍。在武汉对 Oxy-235 的种子进行的分期播种试验结果表明 Oxy-235 的种子除 6、7 月播种苗期遇到夏季高温天气死苗严重难以收获种子外，其他时间都能收获种子。目前为止，未发现抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 在生存竞争能力方面比普通油菜品种更强的证据。在不用溴苯腈除草剂处理时，转基因油菜 Oxy-235 的生存竞争能力没有显示出和任何常规油菜品种的不同。

3.2.6 转基因植物的遗传物质向其他植物、动物和微生物发生转移的可能性；

1. 垂直基因漂移

尽管 *B. napus* 种内杂交容易发生，但和相关品种的种间杂交的成功率有很大差异，其很大程度上受杂交方向的影响。即使 *B. napus* 和邻近相关品种之间也存

在杂交的可能性，但产生的杂交后代种子活力低或不育，这意味着杂交种和他们的子代将不能在人工的或自然条件下存活。

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

2. 水平基因漂移

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

Oxy-235 中发生基因流动的可能性不比受体非转基因油菜高。而且，进口的转基因原料只用作加工用原料。因此，在自然条件下，遗传信息转移到其它植物的可能性几乎不存在。

2002 年 7 月-2003 年 9 月华中农业大学开展了转基因油菜 Oxy-235 与油菜栽培种、近缘种和野生种的异交率检测，检测结果表明：在田间自然授粉条件下，转基因抗除草剂油菜 Oxy-235 与中国的甘蓝型油菜品中间存在一定的异交率，与白菜型油菜及其变种和芥菜型油菜间也存在一定比例的天然异交率。而在芸苔属的黑芥和甘蓝及其变种、其它属的白芥、新疆野油菜、诸葛菜、芥菜、菘蓝和萝卜为转基因油菜的花粉受体时，未检测到杂种植株。

3.2.7 转变成杂草的可能性；

在种植油菜的国家，还没有关于油菜是一种危害严重的杂草的报道。油菜是一种栽培作物，其特点是不具有竞争性和侵袭性。研究表明，Oxy-235 中的基因插入不会改变植株的性状（体型，种子的大小，发芽能力，再生能力等），而使其易于演变为杂草。在过去的几年中，欧洲和加拿大启动了不同的研究项目，比较抗除草剂油菜和常规油菜在集群和定居方面的能力。这些研究的结果肯定了以下几点：

在农业环境下（农田和农田隔离带，通过施加除草剂具有潜在的选择压力），抗除草剂油菜不会生存得更持久：

抗除草剂（杂交）油菜不会比常规非转基因油菜产生更多的再生植物问题。

标准农业耕作规程提供了足够的转基因油菜/油菜再生植物的控制手段。

自然环境中（缺少选择压力），抗除草剂（杂交）油菜不会变得更加具有侵袭性，因为在缺少通过施加除草剂产生的选择压力的情况下，抗除草剂（杂交）油菜没有选择优势。

进口的转基因油菜只用作加工用原料，转基因油菜 Oxy-235 在自然界演变为杂草的可能性极小。

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

对于抗溴苯腈除草剂的转基因油菜来说，没有靶标生物。

由拜耳作物科学公司或其它独立的科学家进行的所有研究都表明，没有观察到抗除草剂油菜生物多样性有任何影响。其理由有：

研究专家证实，从遗传修饰植物到细菌的水平基因转移，尽管在理论上难以完全排除，但实际上很难发生。即使发生从抗除草剂油菜的基因转移，也不会产生影响，因为转入的基因不会提供任何选择优势。

在以前的文件中详细描述了新基因以及由它编码的酶的特征，据此我们得出以下结论：它不会导致受体毒性或过敏性的改变。这种酶在哺乳动物的胃液中通过酶解和 pH 介导的蛋白水解过程迅速失活。未加工的种子的特性与常规油菜品种完全相同。

而且，进口的 Oxy-235 油菜材料将仅用于产品加工。转基因油菜 Oxy-235 在自然条件下变成杂草的可能性非常小。

田间的扩大观察已确认，抗溴苯腈 Oxy-235 与受体在表现型、对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著区别，这表明抗溴苯腈 Oxy-235 与捕食者或有益的非靶标生物的相互作用上没有改变。

华中农业大学于 2002 年-2003 年在武汉和青海对非靶标生物和生物多样性的研究结果表明：在春油菜区油菜生长的苗期、抽薹期、花期、结荚期和成熟期，抗溴苯腈油菜 Oxy-235 的每株油菜上小菜蛾、蚜虫、潜叶蝇、茎象甲、其它害虫及害虫天敌的发生数量与当地 3 个对照品种青杂 2 号、青油 14、中双 7 号及供试 8 个受体品种之间无明显差异。在同样的试验条件下，Oxy-235 田间节肢动物生物多样性指数与当地 3 个对照品种杂 2 号、青油 14、中双 7 号及供试 7 个受体品种之间基本无明显差异。综上所述，抗溴苯腈 Oxy-235 品种对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

以上结果均说明 Oxy-235 不会对环境带来任何不利影响。

3.2.9 对生态环境的其他有益或有害作用。

在开发 Oxy-235 的过程中，已经考虑了下述几个方面的问题：

油菜在生化循环中并没有起到关键作用。

抗除草剂（杂交）油菜产生的腈水解酶非常专一，唯一的酶解物是苯腈类除草剂。

根据以上的描述，拜耳作物科学公司得出结论，没有理由认为抗除草剂油菜在生态环境中具有负面的影响。

3.3 转基因植物与受体或亲本植物在对人类健康影响方面的差异：

油菜不直接用于消费。菜籽油和油菜籽粕是其主要加工产品，分别可以用于人类食用和动物饲料。没有迹象表明插入的转基因会改变由转基因油菜所加工的食品和饲料对人类健康的影响，也不会改变间接使用由转基因油菜加工的食物

安全性。

3.3.1 毒性；

I. 安全应用历史

脲水解酶到处都存在，是植物王国中共有的一种酶，它也存在于许多重要的食用作物中。它们广泛分布在微生物中。人类和本地动物种群长期以来一直消化脲水解酶，而没有任何引起疾病的记载。

没有记载表明导入的脲水解酶对人类具有毒性。

Oxy 脲水解酶蛋白是一种高度专一性的酶，除了仅仅结合苯脲类除草剂外，不结合其它的底物。

II. 蛋白等同性分析

利用 Western 印记分析方法，对 Oxy-235 油菜与 *E. coli* 表达的 Oxy 脲水解酶蛋白质进行了等同性分析，结果表明 Oxy-235 油菜中提取的脲水解酶与 *E. coli* 中提取的脲水解酶在 Western 凝胶系统中具有相同的迁移率，二者具有相同的分子量。如果脲水解酶发生糖基化反应，那么分子量至少会存在 1.5 kDa 的变化，但在 Western 凝胶系统得到的数据中，两个不同来源的蛋白迁移率一致，表明脲水解酶没有发生糖基化。

III. 与已知毒素的同源性检索

与以下大型公共参比数据库中的所有蛋白质序列进行了总的一致性检索：Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PIR, DAD和GenPept。脲水解酶蛋白与 NRL_3D 数据库中的所有蛋白质不具有相似性。

将脲水解酶和SwissProt数据库中的787种有潜在毒性的蛋白进行了比较，其中得到两个与脲水解酶最相近的两个序列，一个是TCPT VIBCH，在氨基酸水平上具有13%的同源性；另一个是TOX1 BOPPE，具有13%的同源性。而大米的RuBisCO SSU在氨基酸水平上与TOX1 BOPPE有15%的同源性；另一个是UDB8 HUMAN，具有11%的同源性。因此脲水解酶的同源性和TCPT VIBCH、TOX1 BOPPE并不显著。

与预期的结果一样，只观察到与各种来源的其他脲水解酶蛋白具有主要的相似性。因此，我们可以得出结论：*oxy*基因不可能编码毒蛋白。

IV. 急性毒性研究

拜耳作物科学公司为了评估 Oxy 脲水解酶对哺乳动物潜在的毒性影响，原计划用按照 2000 mg/kg 的剂量进行检测。但是，由于悬浮液太稠，不能一次达到试验的预定剂量。因此使用 500 mg/kg 的剂量，连续四天进行灌胃。

实验动物为 5 只雄性和 5 只雌性 OF1 鼠，灌胃剂量为 500 mg/kg 体重脲水解酶，灌胃体积为 20 ml/kg，连续四天。测试物质在 0.25% 的羧甲基纤维素的双蒸水溶液中配成悬浮液。每天检查两次试验动物是否有异常的表现，持续 14 天；每周称重一次。在研究结束时处死所有试验动物，并进行大体检查，包括腹腔、胸腔以及主要器官和组织。

结果表明，在本研究过程中无动物死亡，没有观察到任何异常临床表现，实验动物的体重变化没有受到实验处理因素的影响，检查过程中也没有发现大体病

变。LD50 至少大于 500 mg/kg。应该注意到，对脲水解酶含量为 2 ppm 的双低油菜饲料来说，500 mg 纯的脲水解酶相当于 250 kg 转基因双低油菜饲料。动物需要在一天内进食相当于自身体重 250 倍重量的饲料才能摄取相当于 500 mg/kg 剂量的脲水解酶。

V. 90 天大鼠喂养试验

根据农业部要求，天津市卫生防病中心将拜耳作物科学公司的转基因油菜 Oxy-235 掺入饲料（掺入比例为 5%），饲喂大鼠 90 天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因油菜 Oxy-235 对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察均未发现生物学意义的改变。

3.3.2 过敏性；

根据Rogers在1993年的描述，脲水解酶不具有过敏原的一般特性。脲水解酶在蛋白酶中不稳定，然而过敏原却具有蛋白酶稳定性。在氨基酸的初级序列中，它仅有一个潜在的糖基化部位（氨基酸59-61），但植物蛋白的糖基化反应需在网质上进行。当脲水解酶在植物细胞中表达的时候，只能局限在细胞质内，因为它缺少能够将脲水解酶转运到网质的特定的信使氨基酸序列。在转移过程中，这些信使序列通常粘着在蛋白质上。脲水解酶的N末端氨基酸序列与网质的信使氨基酸序列并不相近。

从植物细胞中提取的脲水解酶与从细菌中提纯的脲水解酶在 Western 凝胶系统中表现出相同的迁移率，表明脲水解酶没有发生糖基化。

转基因双低油菜品种Oxy-235的脲水解酶在食物中的浓度并不高，而食物过敏原则与之相反，并且事实上在用作动物饲料的转基因双低油菜品种Oxy-235的产品中的脲水解酶可以忽略，在人类食用的精炼油中几乎不存在。

I. 与已知过敏原氨基酸序列同源性检索

从肺炎克雷伯氏臭鼻亚种分离出的脲水解酶序列与已知的具有潜在过敏性的序列进行比较（Genebank）。细菌的脲水解酶的序列（KPNBXN）与已知的过敏性序列的比较结果表明：最相近的序列式PPHLP5A，在氨基酸水平上具有15%的同源性；PPHLPVB，具有14%的同源性。而如果将通常食品中的一段氨基酸序列与同样的已知的过敏性序列比较，如大米的RuBisCO SSU，在氨基酸水平上与DEPMAG19也有14%的同源性；另一个是CHCLAH5，具有16%的同源性。因此，可以得出细菌的脲水解酶的序列与PPHLP5A或PPHLPVB的同源性没有显著性的结论。结合由抗原表位同源性检索得出的其他的结果，我们可以推断，oxy基因不可能编码过敏蛋白。

II. 热稳定性分析

脲水解酶的活化范围很大，最佳活化温度为 35℃，15%的活化反应分别发生在 10-50℃之间。

III. 体外模拟胃液消化

利用模拟消化液来检测脲水解酶在人类消化道中的稳定性，模拟胃液是基于美国药典提供的方法制备，但是为了降低蛋白质的分解速度，酶被稀释了 1000 倍：3.2 mg 胃蛋白酶-猪胃黏膜，Sigma#P-7012，2500 U/mg 蛋白在 1000 ml 胃缓

冲液（在 1000 ml 水中含 2.0 g NaCl 和 7.0 ml 1.0 M HCl, pH 2.0）中稀释。

蛋白质样品在 37°C 用胃蛋白酶作用 90 min。胰水解酶被加入同温度的 500 μ l 消毒 SGF 中，使其最终浓度为 10 μ g/ml。消化时间为 0、1、5、10、15、30、60 和 90 min 后从消化液中取出数倍于 10 μ l 的液体，按照 Fuch *et al.* 的方法立即终止反应，与 4 倍的样品缓冲提取液（250 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% β -巯基乙醇, 40% 甘油, 8% SDS, 0.09% 溴苯酚蓝）混合，煮沸 5 min，保存于 -20°C。将各时间点样品中的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳分离，并转移至硝酸纤维素膜。用兔抗胰水解酶抗体进行免疫杂交。

检测结果表明：在未加任何酶的情况下，Oxy 胰水解酶在 pH 2.0 条件下孵育 90 min 就有少量分解。在酶被稀释 1000 倍的情况下，胃蛋白酶 5 min 可完全消化胰水解酶，这说明在消化过程中，胰水解酶与其它正常蛋白一样可以被很多消化酶很快完全消化（图 12）。

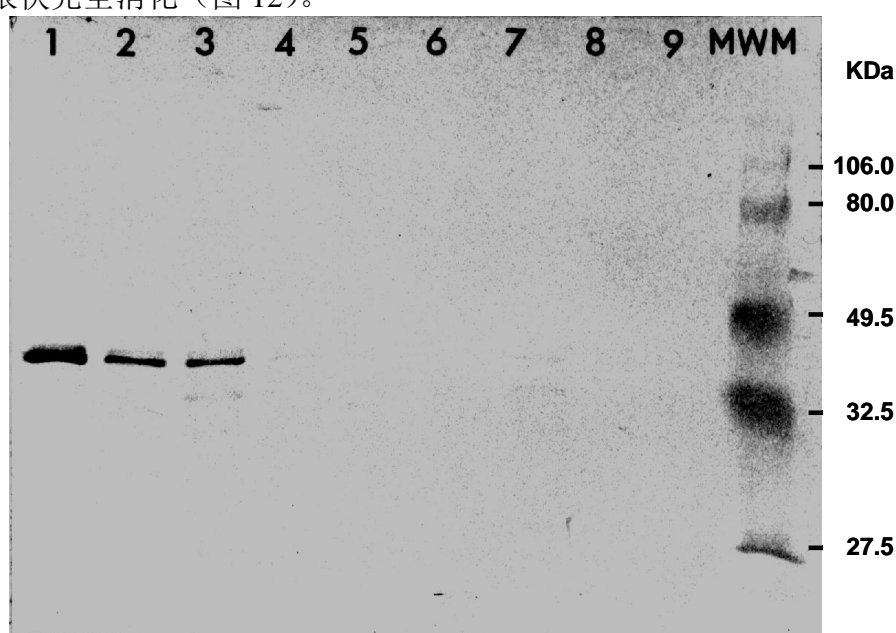


图 12: 在模拟胃液中消化后的 Oxy 胰水解酶蛋白质分析

泳道 1 和 3-9 代表消化时间是 0、1、5、10、15、30、60 和 90 min 的结果。“0”时间点模拟胃液中未加入胃蛋白酶。泳道 2 为 100 ng 胰水解酶在模拟胃液中的消化结果。MWM=分子量标准。

上述结果表明，胰水解酶广泛分布在单子叶植物和大量微生物中。人类和动物已经摄取胰水解酶很长时间，至今没有不良影响的报道。

3.3.3 抗营养因子；

硫苷和芥酸在油菜中自然存在并在食物和饲料安全方面被认为是不受欢迎的抗营养成分。引用实例表明在油菜籽中芥酸占总脂肪酸含量的 1.63%。受体油菜 Westar 是一种双低油菜品种，它的硫苷和芥酸含量没有超过国际标准机构规定的最大量。

对 Westar-Oxy-235 和 Tanto-Oxy 及其相应的非转基因对照的芥酸含量进行比较，发现 Oxy-235 芥酸含量等于或低于非转基因对照中芥酸含量（表 4）；与优良品种 MBR194 芥酸含量（表 5）比较，Oxy-235 芥酸含量低于 MBR194 芥酸含量。与 Rakow (1987), Ackman (1990), Renard *et al.* (1993), Codex [1992, 1993,

引自Padley *et al.* (1994)], Declercq和Daun (1993, 1994, 1995) 和Eskin *et al.* (1996) 等人的文献资料进行比较, 结果表明Oxy-235油菜结果在文献之范围内。硫苷在油菜中的含量为每克脱油的油菜籽粗粉中含9.22-25.80 μmol , 每克风干的脱油油菜饲料中最多可含有30 μmol 混合的3-丁烯基硫苷、4-戊烯基硫苷、2-羟基-3-丁烯基硫苷和2-羟基-4-戊烯基硫苷; 或在含水量为8.5%条件下, 每克种子中含有少于18 μmol 的硫苷, 表7至表11分析结果表明Oxy-235油菜中硫苷符合规定标准, 等于或低于非转基因对照对照及优良品种MBR1994水平, 与Keith和Bell (1982), Bell (1984), Declercq和Daun (1993, 1994, 1995) 等人文献数据比较结果表明Oxy-235油菜中硫苷含量在正常油菜种子质量范围内。

表4: 从1992年至1995年生长在加拿大或法国的对照Westar和Westar-Oxy-235, 对照Tanto和Tanto-Oxy个体样本菜籽油中芥酸含量 (占总脂肪酸的百分含量)。

年份	N (a)	对照品种	Oxy-235 油菜	概率	显著性 (b)
1) 1992 & 1994 (c)	6	0.1	0	100%	不显著
2) 1995 (d)	3	0.267	0.033	25%	不显著
3) 1995 (e)	2	0	0	100%	不显著

(a) 重复数; (b) 显著性阈值为5%; (c) Westar-Oxy-235; (d) Westar-Oxy-PN; (e) Tanto-Oxy, 一种欧洲带商品化的品系。以上均值都经过了F-检验进行比较。

表5: MBR194油菜中芥酸含量 (占总脂肪酸的百分含量) (加拿大转基因私人合作试验), 1995年

	SS (a)	MS (a)	LS (a)
MBR194	0.11	1.17	0.004
平均值 (b)	0.06	1.16	0.03
范围 (b)	0.01 - 0.38	0.00 - 6.65	0.00 - 0.63

(a) SS=短季节区, MS=中季节区, LS=长季节灌溉区;

(b) “均值”和“范围”在加拿大的转基因私人合作实验所实验基础上得到。

表6: 与文献中油菜芥酸含量数值的比较

	规格	文献	对照 (28个样本)	Oxy-235 油菜 (25个样本)
	% 油重			
芥酸 (22:1)	≤ 2	0.0 - 2.0	0.38 +/- 0.65	0.09 +/- 0.25

表7: Westar, Westar-Oxy-235和Westar-Oxy-PN油菜籽中硫甙的含量 ($\mu\text{mol/g}$), 平均值经过F检验进行比较。

	N (a)	Westar	Westar Oxy-235	Westar Oxy-PN	概率 (b)	显著性
1993	3	17.22	15.43	/	65%	不显著
1994	3	16.02	13.81	/	24%	不显著
1995	3	16.94	/	15.42	28%	不显著

(a) 分析样本的数量; (b) 显著性阈值为5%

表8: MBR194油菜籽中硫甙的含量 (μmol/g)

	SS (a)	MS (a)	LS (a)
MBR194	7.74	13.04	10.89
平均值 (b)	7.47	10.73	9.49
范围 (b)	3.0 - 15.9	3.76 - 20.55	3.24 - 16.86

(a) SS=短季节区, MS=中季节区, LS=长季节灌溉区;

(b) “均值”和“范围”在加拿大的转基因私人合作实验所实验基础上得到。

表9: 1992年和1994年种植在马尼托巴湖的Westar和Westar-Oxy-235油菜籽中硫甙成分 (μmol/g)

	N (a)	Westar	Westar-Oxy	概率 (b)	显著性
BUT (c)	6	3.32	2.93	39%	不显著
PEN	6	0.24	0.21	32%	不显著
HOBUT	6	5.50	3.49	4.5%	显著
HOPEN	6	0.04	0.02	23%	不显著
INDOL	6	0.62	0.92	1.1%	显著
MO-IND	6	5.06	5.85	<1%	显著
硫甙		4.78	13.42	13%	不显著

(a) 分析样本数; (b) 显著性阈值为5%; (c) BUT=3-丁烯基硫甙; PEN=4-戊烯基硫甙; HOBUT=2-羟基-3-丁烯基硫甙; HOPEN=2-羟基-4-戊烯基硫甙; INDOL=3-吲哚甲基硫甙; MO-IND=1-甲氧基-3-吲哚甲基硫甙。

表10: 1995年种植在加拿大的Westar和Westar-Oxy-PN油菜籽中硫甙成分 (μmol/g)

	N (a)	Westar	Westar-Oxy-PN	概率 (b)	显著性
BUT	3	4.45	4.13	42%	不显著
PEN	3	0.23	0.21	42%	不显著
HOBUT	3	8.11	6.24	<1%	显著
HOPEN	3	0.040	0.037	42%	不显著
INDOL	3	0.41	0.73	26%	不显著
MO-IND	3	3.70	4.07	46%	不显著
硫甙		16.94	15.42	28%	不显著

(a) 分析样本数; (b) 显著性阈值为5%

表11: 一种纯油菜品种Tanto-Oxy油菜籽中硫甙成分 (μmol/g), (法国, 1994)

	N (a)	Tanto	Tanto-Oxy	概率 (b)	显著性
BUT	2	2.45	1.25	10%	不显著
PEN	2	0.40	0.20	29%	不显著
HOBUT	2	4.55	3.10	6.6%	不显著
HOPEN	2	0.20	0.15	79%	不显著
GAL (c)	2	0.10	0.10	100%	不显著
MO-IND	2	2.55	3.15	59%	不显著
硫甙		10.25	7.85	23%	不显著

(a) 重复数; (b) 显著性阈值为5% (c) GAL=5-甲基亚硫酰基戊基葡萄糖苷

表12: 文献数据比较 ($\mu\text{mol/g}$)

	文献数据	对照油菜 (26 个样本)	Oxy-235 油菜 (24 个样本)
BUT	2.08 - 4.30	3.28 +/- 0.86	3.00 +/- 0.90
PEN	0.53 - 2.40	0.24 +/- 0.12	0.23 +/- 0.08
HOBUT	2.88 - 8.90	6.57 +/- 2.71	4.68 +/- 1.71
HOPEN	0.47 - 0.90	0.08 +/- 0.10	0.08 +/- 0.13
INDOL	0.15 - 0.60	0.51 +/- 0.22	0.75 +/- 0.25
MO-IND	1.52 - 10.80	4.32 +/- 1.90	4.71 +/- 1.74
硫甙	9.22 - 25.80	15.00 +/- 4.07	13.46 +/- 3.64

综上, 硫甙的含量与非转基因油菜及其它生长在不同环境条件下的商品化油菜品种是相似的, 因此, 抗除草剂基因的插入没有改变油菜种子中芥酸 (表5~7) 和硫甙的含量 (表7~12)。

国内检验机构进行的抗营养因子测定

2004年, 由天津市卫生防病中心对拜耳作物科学公司的转基因油菜Oxy-235和其本对照进行了硫甙和芥酸含量的检测, 检测依据的方法是保健食品化学及其检测技术和GB20219-1988。

检测结果表明转基因油菜Oxy-235硫甙含量为 $19.6 \mu\text{mol/g}$, 芥酸含量为0.37%, 符合NY415-2000中双低油菜标准 (油菜籽油芥酸含量低于0.0-2.0%, 油菜籽油硫甙含量 $9.22-25.80 \mu\text{mol/g}$) (表13)。

表13: 转基因油菜Oxy-235和亲本对照中芥酸和硫甙含量比较

检测项目	检测结果	
	转基因油菜Oxy-235	亲本对照
硫甙 $\mu\text{mol/g}$	19.6	11.3
芥酸, %	0.37	0.40

上述结果符合NY415-2000中双低油菜标准同时在文献报道含量范围。

3.3.4 营养成份;

转基因油菜Oxy-235与非转基因对照油菜种子中包括基本成分、纤维素、矿物质、生育酚、氨基酸和脂肪酸在内的所有营养组分的营养值都在市售油菜标准值的范围之内 (表14-表18), 研究表明, 转基因油菜Oxy-235与非转基因对照油菜种子的组成成分和营养价值上是等价的, 转基因途径培育的Oxy-235不会对油菜的营养价值产生影响。

表14: 转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜种子中基本成分和纤维素含量

参数	Westar	溴苯腈处理 Oxy-235 Westar	未用溴苯腈 处理 Oxy-235 Westar	标准值范围 (市售油菜)
水分%fw (鲜重中百分比)	4.80±0.33	4.86±0.50	4.88±0.41	3.53-5.71
粗蛋白质%dm (干重中百分比)	23.6±1.5	24.0±1.6	23.9±1.5	20.6-27.8
粗脂肪%dm (干重中百分比)	40.4±2.6	39.6±2.1	39.9±1.8	33.6-45.8
灰分%dm (干重中百分比)	3.78±0.53	3.90±0.51	3.94±0.55	3.19-5.96
总膳食纤维%dm (干重中百分比)	32.2±1.9	32.5±1.6	32.3±1.7	26.5-37.9
酸性洗涤纤维%dm (干重中百分比)	36.4±1.8	35.9±2.0	35.5±1.6	32.3-40.9
中性洗涤纤维%dm (干重中百分比)	40.0±1.9	38.9±2.1	38.8±2.0	34.5-43.3

a 总碳水化合物按100%计算 (蛋白质%dm+脂肪%dm+灰分%dm)

b 除草剂溴苯腈处理剂量为280 g a.i./ha

表15: 转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜种子中矿物质含量

矿物质 (ppm 干重)	Westar	溴苯腈处理 Oxy-235 Westar	未用溴苯腈 处理Oxy-235 Westar	标准值范围 (市售油菜)
铁	72.2±20.4	74.6±25.5	76.0±29.0	48.1-501.0
锌	41.6±4.4	45.6±6.7	45.7±5.8	30.8-60.5
铜	2.89±0.37	3.08±0.53	2.99±0.62	1.82-6.74
锰	39.0±3.5	40.5±4.7	40.7±5.0	36.0-53.8
钙	3844±396	4206±377	4127±453	2804-5169
镁	3230±229	3343±261	3325±279	2750-3836
磷	6083±790	6299±793	6310±894	4529-7916
钾	8048±717	8121±876	8071±932	5939-10096
钠	19.62±12.52	15.01±5.98	13.96±6.56	1.34-62.90

表16: 转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜种子中生育酚的含量

生育酚 (mg/kg 干重)	Westar	溴苯腈处理 Oxy-235 Westar	未用溴苯腈处 理Oxy-235 Westar	标准值范围 (市售油菜)
α-生育酚 mg/100g	85.2±7.1	95.3±8.3	94.5±9.6	69.4-122.0
β-生育酚 mg/100g	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25-1.73
γ-生育酚 mg/100g	196±22	186±19	184±20	134-326
δ-生育酚 mg/100g	5.13±0.87	5.81±0.80	5.54±0.88	2.88-9.02
总生育酚	286±27	287±25	284±27	221-425

表17: 转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜种子中氨基酸的含量

氨基酸 (%干 重中百分比)	Westar	溴苯腈处理 Oxy-235 Westar	未用溴苯腈处 理Oxy-235 Westar	标准值范围(市 售油菜)
丙氨酸	1.06±0.06	1.07±0.07	1.07±0.06	0.92-1.22
精氨酸	1.46±0.10	1.50±0.10	1.48±0.09	1.26-1.81
天冬氨酸	1.82±0.15	1.79±0.14	1.79±0.14	1.46-2.22
胱氨酸	0.513±0.063	0.533±0.068	0.537±0.054	0.368-0.693
谷氨酸	4.67±0.32	4.81±0.34	4.78±0.34	3.91-5.54
甘氨酸	1.24±0.07	1.25±0.07	1.24±0.06	1.08-1.49
组氨酸	0.710±0.043	0.732±0.040	0.722±0.038	0.612-0.826
异亮氨酸	0.984±0.064	1.000±0.074	0.988±0.060	0.855-1.150
亮氨酸	1.74±0.11	1.77±0.12	1.75±0.11	1.52-2.03
赖氨酸	1.52±0.15	1.53±0.16	1.54±0.16	0.93-1.88
蛋氨酸	0.429±0.049	0.440±0.055	0.442±0.042	0.338-0.607
苯丙氨酸	1.078±0.089	1.104±0.105	1.084±0.093	0.910-1.370
脯氨酸	1.47±0.09	1.53±0.10	1.51±0.09	1.25-1.70
丝氨酸	1.10±0.06	1.12±0.06	1.11±0.05	0.98-1.29
苏氨酸	1.09±0.05	1.09±0.05	1.09±0.04	0.98-1.24
色氨酸	0.279±0.022	0.288±0.023	0.282±0.019	0.237-0.377
酪氨酸	0.668±0.047	0.679±0.045	0.667±0.036	0.573-0.784
缬氨酸	1.22±0.07	1.23±0.08	1.23±0.07	1.09-1.40

表18：转基因油菜Oxy-235和非转基因油菜种子中脂肪酸的含量

脂肪酸（%）	Westar	溴苯腈处理 Oxy-235 Westar	未用溴苯腈处 理Oxy-235 Westar	标准值范围 （市售油菜）
豆蔻酸C14:0	0.0713± 0.0057	0.0730± 0.0051	0.0728± 0.0050	0.0429-0.0951
棕榈酸C16:0	4.27±0.18	4.31±0.19	4.35±0.21	3.83-4.94
棕榈油酸C16:1	0.246±0.021	0.249±0.023	0.257±0.026	0.196-0.332
十七烷酸C17:0	0.0557± 0.0060	0.0574± 0.0062	0.0568± 0.0055	0.0427-0.0691
十七烯酸C17:1	0.113±0.019	0.111±0.019	0.115±0.018	0.082-0.164
十八烷酸C18:0	2.18±0.17	2.37±0.19	2.37±0.20	1.89-2.61
油酸C18:1	62.3±0.9	63.1±1.3	62.7±1.1	54.7-64.0
亚油酸C18:2	19.3±0.6	18.1±0.6	18.5±0.6	17.3-24.3
亚麻酸C18:3	8.43±0.47	8.57±0.51	8.53±0.66	7.58-12.0
二十烷酸C20:0	0.735±0.056	0.772±0.065	0.783±0.068	0.572-0.896
二十烯酸C20:1	1.43±0.07	1.42±0.07	1.42±0.08	0.99-2.33
二十碳二烯酸 C20:2	0.0797± 0.0162	0.0742± 0.0134	0.0739± 0.0110	0.0528-0.1240
山嵛酸C22:0	0.368±0.038	0.373±0.041	0.382±0.040	0.230-0.480
二十四烷酸C24:0	0.207±0.030	0.224±0.032	0.228±0.035	0.146-0.286
二十四烯酸C24:1	0.205±0.041	0.208±0.046	0.209±0.043	0.139-0.306

3.3.5 抗生素抗性；

无。

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响。

自从1992年这种技术的早期开发以来，Oxy-235原料的种植、生产和消费还没有发生对人类健康和食品安全的不利影响。至今，许多加拿大的种植者一直在种植含有转基因Oxy-235的油菜品种，包括经济生产田，没有关于影响人类和食品安全的报道。

3.4 根据上述评价，参照本办法第十三条有关标准划分转基因植物的安全等级。

Oxy-235 是利用安全等级为 I 的受体，并利用安全等级为 I 的类型 2 的转化方法转化后获得的。大量的研究表明 Oxy-235 对人类和动物健康以及对生态环境

的安全性影响与常规非转基因油菜是一致的。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十三条的规定，Oxy-235 油菜应该属于安全等级 I。

4 转基因植物产品的安全性评价

4.1 生产、加工活动对转基因植物安全性的影响。

对含有溴苯腈除草剂抗性基因的转基因杂交油菜种子进行并完成仿效工业规程加工实验。发现转基因油菜和非转基因油菜在加工特点和成分（如，油，蛋白质，维生素，矿物质）方面没有显著的不同。所有的分析结果都在油菜的典型特征范围内。Western 杂交结果也一样：油菜作为动物饲料的成分导入的蛋白-腈水解酶的水平不显著。在油中没有测定到这种蛋白。此外，拜耳作物科学公司提供证据证明腈水解酶蛋白是安全的。

因此，得出以下结论：转基因油菜种子可以在加工前同其它非转基因油菜种子一起储存。转基因油菜产品使用的数量和范围没有不同，在使用上也不需要特别的说明。

4.2 转基因植物产品的稳定性。

分子特性分析表明，Oxy-235 中的插入片段在转化体及其后代中稳定存在，Oxy-235 中表达的 Oxy 腈水解酶蛋白在模拟消化液中能够迅速降解，热处理条件下其活性也会显著降低。

由于经济性食用油的质量要求不允许任何蛋白质存在于油提取纯化过程中，需要在油的加工过程中通过一些步骤保证去除酶类物质。油中的几种成分如脂肪酸或叶绿素对油的稳定性有影响。既然油菜中的这些成分没有因为遗传改良而改变，所以与常规品种油菜里获得的油的稳定性相比，来自于油菜品系 Oxy-235 的油的稳定性不存在差异。

4.3 转基因植物产品与转基因植物在环境安全性方面的差异。

如前所述，转基因植物产品和转基因植物在环境安全性方面没有差异，它们对于环境都是安全的。转入的新蛋白的性质明确，功能特异，没有毒性或过敏反应。插入基因组中的序列不会改变植物的一般性状如农艺性状或种子的全部成分，包括营养成分和天然毒性成分。因此，由转基因 Oxy-235 种子加工获得产品与常规产品相比没有变化。

4.4 转基因植物产品与转基因植物在对人类健康影响方面的差异。

转基因油菜和油菜的植株部分，如粗原料，通常不直接用于人类食用，因此不会对人类产生直接影响。只有由油菜加工得到的产品如菜籽油和菜籽油粕用于食品和饲料。这些产品最容易影响人类的健康。但是，转基因 Oxy-235 菜籽油和菜籽油粕同常规产品相比没有变化。如前所述，在进行严格的毒理学和成分分析评价的基础上，可以得出结论认为 Oxy-235 对人类健康不会造成不良影响。在消费菜籽油和菜籽油粕的国家（如加拿大），也没有关于其影响人类健康的报告。因此，转基因 Oxy-235 植物和产品对人类健康没有影响。

4.5 参照本办法第十四条有关标准划分转基因植物产品的安全等级。

综上所述，油菜所采用的生产加工方法不会影响油菜产品的安全性，因此，

根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十四条的规定油菜 Oxy-235 安全等级为 I 级。

六、相关附件资料

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

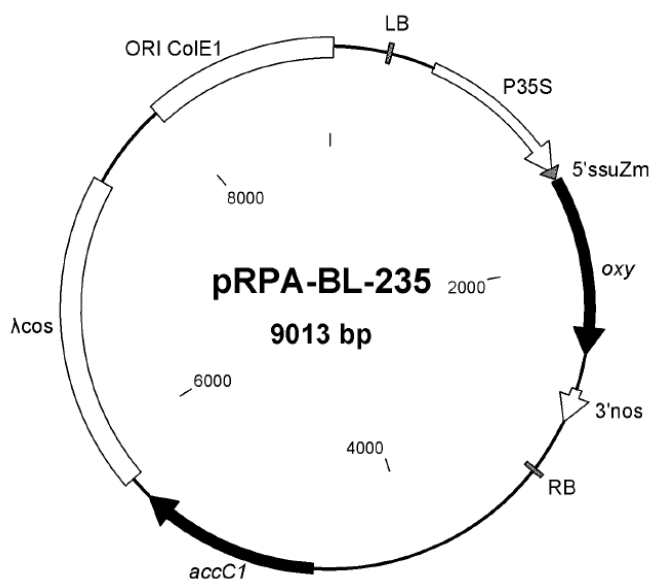
oxy 基因大小为 996 bp，核苷酸序列

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

脲水解酶蛋白质序列有 331 个氨基酸，推导的氨基酸序列

```
1 MDTTFKAAAV QAEPVWMDAA ATADKTVTLV AKAAAAGAQL VAFPELWIPG YPGFMLTHNQ
61 TETLPFIKEY RKQAIADGP EIEKIRRAAQ EHNIALSFGY SERAGGTLYM SQMLIDADGI
121 TKIRRRKLKP TRFERELFGE GDGSDLQVAQ TSVGRVGALN CAENLQSLNK FALAAQGEQI
181 HISAWPFTLG SPVLVGDSIG AINQVYAAET GTFVLMSTQV VGPTGIAAFE IEDRYNPNQY
241 LGGGYARIYG PDMQLKSKSL SPTEEGIVYA EIDLSMLEAA KYSLDPTGHI SRPDVFSVSI
301 NRQRQPAVSE VIDSNQDEDP RAACEPDEGG S
```

2. 目的基因与载体构建的图谱



附图 1: Oxy-235 转化用质粒 pRPA-BL-235 图谱

附表 1: pRPA-BL-235 的组成描述

在 pBRA-BL-235 中的位置	特征
bp 322 → bp 345	LB: 土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 的左边界重复序列 (Zambryski, 1988)
bp 346 → bp 1477	P35S: 包括启动子区域在内的花椰菜花叶病毒 35S 转录序列 (Odell <i>et al.</i> , 1985) (589 - 1473)
bp 1478 → bp 1521	5'ssuZm: 包括玉米 <i>Zea mays</i> 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基基因 (ssuZm) 先导序列在内的序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1988)。
bp 1522 → bp 2517	oxy: 肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种 <i>Klebsiella ozaenae subsp. Ozaenae</i> 胍水解酶基因的编码序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1988)
bp 2518 → bp 3199	3'nos: pTiT37 T-DNA 上包括 3'端非翻译区在内的胭脂碱合酶基因序列 (2708 - 2904) (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
bp 3200 → bp 3223	RB: 土壤根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 的右边界重复序列 (Zambryski, 1988)
bp 3224 → bp 5741	accC1: 包括庆大霉素乙酰转移酶-3-1 基因 (<i>aacC1</i>) (赋予对庆大霉素的抗性) 在内的序列 (4597 - 5610) (Wohlleben <i>et al.</i> , 1989)
bp 7484 → bp 5742 (逆时针)	λcos: 包括λ-噬菌体 cos 位点在内的序列 (Hohn and Collins, 1980)
bp 7484 → bp 5742 (逆时针)	ORI ColE1: 质粒 pBR322 上包括复制原点在外的序列 (15 -7965) Bolivar <i>et al.</i> , 1977)

3. 目的基因与植物基因组整合及其表达的分子检测或鉴定结果 (PCR 检测、Southern 杂交分析、Northern 或 Western 分析结果、目的基因产物表达结果)

3.1 Oxy-235 外源插入序列及其相邻基因组侧翼序列的 PCR 分析;

3.2 Oxy-235 插入拷贝数分析;

3.3 Oxy-235 外源蛋白表达量检测;

3.4 Oxy-235 插入序列稳定性的检测。

3.1 Oxy-235 外源插入序列及其相邻基因组侧翼序列的 PCR 分析

油菜转化事件 Oxy-235 的 oxy 基因以单拷贝插入, 在 pRPA-BL-235 中组成 oxy 基因表达的 DNA 序列组件的 35S 启动子来源于花椰菜花叶病毒, 终止子 3'nos 来自于土壤根瘤农杆菌的 pTiT37 质粒上 T-DNA 的胭脂碱合成酶基因。插入序列扩增片段示意图见附图 2。插入序列的侧翼基因组 DNA 序列见附图 3。

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图 2: Oxy-235 插入序列扩增片段示意图

Oxy-235 中插入序列及基因组侧翼序列见附图 3。

涉及商业保密资料，在本公开版本中已删除

附图 3: Oxy-235 插入序列及侧翼序列

3.2 Oxy-235 插入拷贝数分析

提取转基因油菜 Oxy-235 和对应的非转基因油菜（品种 Drakkar）叶片的基因组 DNA，利用 P35S-5'ssuZm、oxy 探针、3'nos 探针和完整 T-DNA 探针对一系列酶切片段进行 Southern 杂交分析（附图 6-附图 9）。将基因组 DNA 进行限制性酶切得到的 DNA 片段用琼脂糖凝胶电泳分离后转化到膜上，将印迹与不同的探针进行杂交，来确定转基因油菜 *Brassica napus* Oxy-235 插入 DNA 的拷贝数和结构。

附图 4 表示的是质粒 pRPA-BL-235 中所含限制性内切酶酶切位点的图谱。附图 5 表示的是不同限制性酶切消化产物和所用的探针模板的线性图。杂交结果见附图 6，附图 7，附图 8 和附图 9，总结于附表 2。

阴性对照（用 *EcoR* I 酶切消化从非转基因油菜 Drakkar 中制备的基因组 DNA）结果表明没有背景杂交，原因是在野生型油菜中不存在与所用探针模板杂交的靶序列（附图 6，附图 7，附图 8，附图 9，第 12 泳道）。阳性对照（用 *EcoR* I 酶切消化从非转基因油菜 Drakkar 中制备的基因组 DNA，同时加上约 1 拷贝的 *EcoR* I 酶切消化的转化质粒 pRPA-BL-235）结果表明：它与各探针模板杂交会产生预期大小的 9013 bp 的杂交片段（附图 6，附图 7，附图 8 和附图 9，第 13 泳道）。这些结果表明 Southern 印迹杂交分析是在保证探针模板可以与靶序列杂交的条件下进行的。

BsaH I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA，与 P35S-5'ssuZm 探针杂交，结果发现一个 2275 bp 左右大小的 5'端整合片段（附图 6，第 2 泳道）。*BsaH* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA，与 3'nos 探针杂交，结果产生一个 1650 bp 左右大小的 3'端整合片段（附图 8，第 2 泳道）。*BsaH* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA，与 oxy 探针和完整的 T-DNA 探针杂交，结果表明出现两个杂交片段：一个 2275 bp 左右大小的 5'端整合片段，一个 1650 bp 左右大小的 3'端整合片段（附图 7 和附图 9，第 2 泳道）。

Xmn I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA，与 P35S-5'ssuZm 探针杂交，结果表明出现两个杂交片段：一个预期大小的 462 bp 的内部片段和一个约 1125 bp 的 5'端整合片段（附图 6，第 3 泳道）。*Xmn* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA，与

oxy 探针杂交, 结果产生预期大小的 462 bp 的内部片段和一个约 1 600 bp 的 3' 端整合片段(附图 7, 第 3 泳道)。*Xmn* I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 3'nos 探针杂交, 只可见到 1600 bp 左右大小的 3' 端整合片段(附图 8, 第 3 泳道)。如预期的一样,*Xmn* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 可获得所有这 3 个片段(附图 9, 第 3 泳道)。

Hpa I 酶切消化 Oxy-235 基因组 DNA, 与 P35S-5'ssuZm 探针、*oxy* 探针和 3'nos 探针杂交, 预期将产生一个长度大于 2619 bp 的 5' 端整合片段。杂交结果表明出现一个 4800 bp 左右大小的 5' 端整合片段(附图 6, 附图 7 和附图 8, 第 4 泳道,)。*Hpa* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 则在约 4800 bp 左右大小的 5' 端整合片段的位置出现一个约 3350 bp 大小的 3' 端整合片段(附图 9, 第 4 泳道)。

用 *Sph* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与各探针杂交, 结果获得的片段呈弥散状, 这可能是由于基因组 DNA 只得到了部分的酶切消化(附图 6, 附图 7, 附图 8 和附图 9, 第 5 泳道)。从这一限制性酶切消化中无法得出结论。

*Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针和 3'nos 杂交, 表明出现一个 7000 bp 左右大小的 3' 端整合片段(附图 7, 附图 8, 第 7 泳道)。由于 *Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针之间的重复区太小(197 bp), 因此两者杂交之后没有得到这一整合片段。只看到一个 1175 bp 左右大小的 5' 端整合片段(附图 6, 第 6 泳道)。*Eco*R I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交时, 可获得 1175 bp 左右大小的 5' 端整合片段和 7000 bp 左右大小的 3' 端整合片段(附图 9, 第 6 泳道)。

Afl III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 预期将产生两个整合片段以及大小为 1278 bp, 735 bp 和 178 bp 的 3 个内部片段。不过, 只可见到 1278 bp 和 735 bp 的内部片段以及一个 1675 bp 左右大小的 3' 端整合片段。此 178 bp 的内部片段太小, 电泳时跑离了凝胶, 同时 5' 端整合片段和 T-DNA 探针间的重复区太小(只有 230 bp), 因而无法产生可检测到的杂交片段。5' 端整合片段与 P35S-5'ssuZm 探针间的重复区甚至更短(60 bp), 这就能够解释为什么 *Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交之后不存在 5' 端整合片段。可检测到预期大小的 1278 bp 的内部片段(附图 6, 第 7 泳道)。*Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针杂交, 表明出现预期大小的 1278 bp 和 735 bp 的内部片段(附图 7, 第 7 泳道)。*Afl* III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 3'nos 探针杂交, 可产生 735 bp 大小的内部片段和一个 1675 bp 左右大小的 3' 端整合片段(附图 8, 第 7 泳道)。这两种情况下, 均不见 178 bp 的内部小片段。

Nco I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针杂交, 表明出现两个杂交片段: 一个预期大小的 494 bp 的内部片段和一个长度大于 14 kb 的 5' 端整合片段(附图 6, 第 8 泳道)。5' 端整合片段仅微弱可见。这可能是由于 5' 端整合片段太长, 加之与探针模板间只有有限的重复区。*Nco* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 *oxy* 探针和 3'nos 杂交, 表明出现一个长度大于 14 kb 的 3' 端整合片段(附图 7 和附图 8)。如预期的一样, *Nco* I 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与完整的 T-DNA 探针杂交, 可获得所有这 3 个片段(附图 9, 第 8 泳道)。也可极微弱地见到 3' 端整合片段。

EcoR V 在插入的转基因序列中有一个切割位点。因此，预期将产生两个整合片段。不过，与各探针杂交之后，在印迹中只在约 7.1 kb 位置处见到一条条带。在另一实验中测定了插入序列的全序列，证实的确存在 *EcoR V* 酶切位点。这一观察结果可从两方面加以解释：或者是产生的这两个片段分子量十分相近，无法在凝胶上分开；或者是由于局部 DNA 结构的原因，插入序列中的 *EcoR V* 位点无法被消化。由于所有其他限制性内切酶的酶切图谱以及测序结果与非重排的 T-DNA 一致，因此假设 T-DNA 插入序列发生重排的可能性极低。

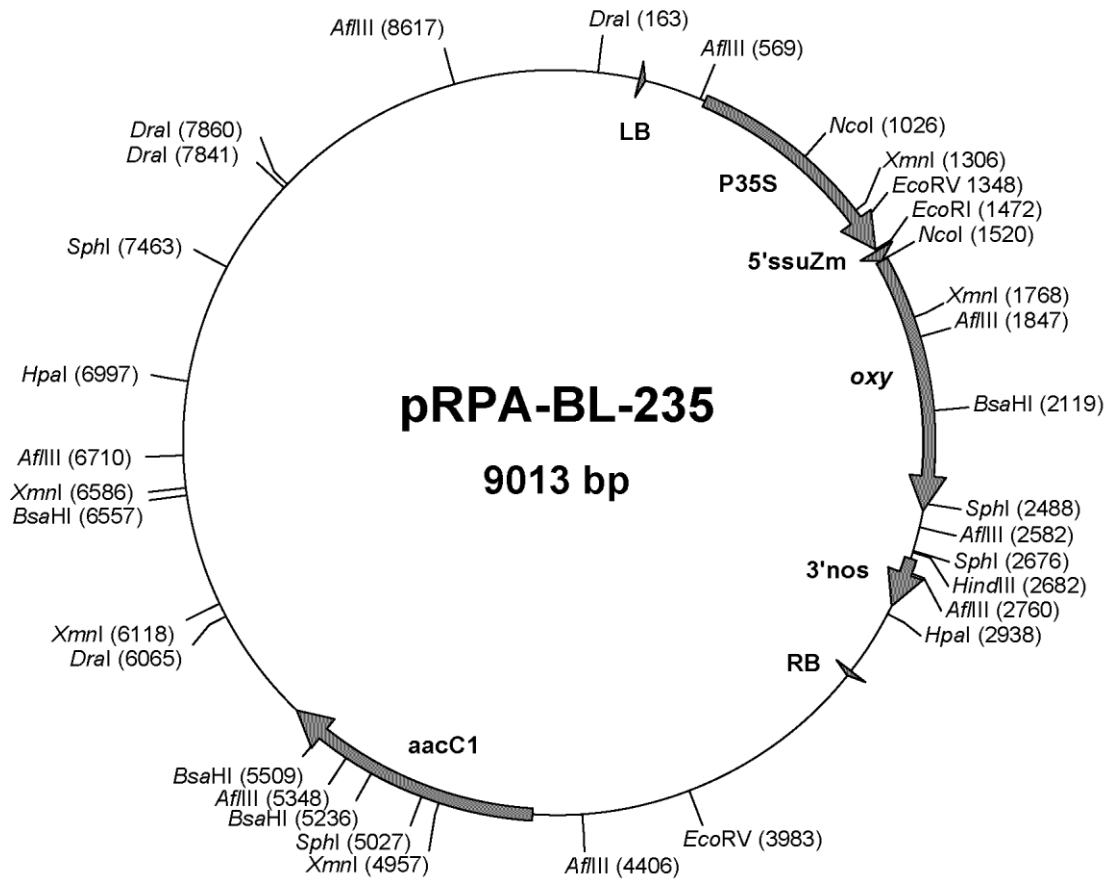
Hind III 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 P35S-5'ssuZm 探针和 *oxy* 探针杂交，结果出现一个 4700 bp 左右大小的 5'端整合片段（附图 6 和附图 7，第 10 泳道）。*Hind III* 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与 3'nos 探针和完整的 T-DNA 探针杂交，也在 4700 bp 左右大小的 5'端整合片段位置得到一个约 1375 bp 的 3'端整合片段（附图 8 和附图 9，第 10 泳道）。

由于 *Dra I* 在插入的转基因序列中没有识别位点，因此 *Dra I* 酶切消化的 Oxy-235 基因组 DNA 与各探针杂交之后，只得到一个 3150 bp 左右大小的整合片段（附图 6，附图 7，附图 8，附图 9，第 11 泳道）。

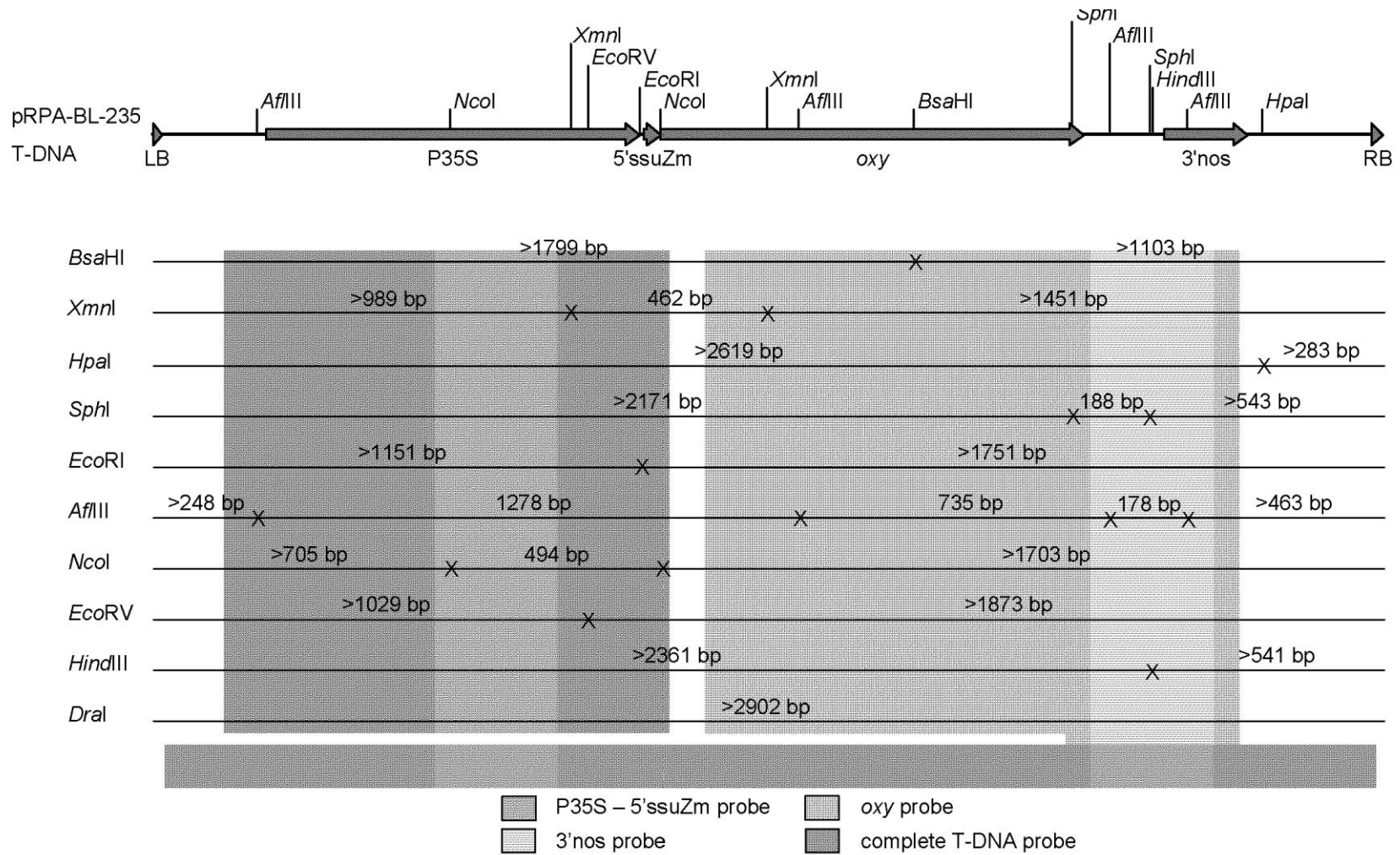
综上所述，对转基因油菜 *Brassica napus* Oxy-235 进行的 Southern 印迹杂交结果表明：植物中转化的 DNA 与质粒 pRPA-BL-235 中设计的 DNA 结构一致。所获得结果表明在转基因油菜 Oxy-235 中整合进了一个拷贝的基因盒。

附表 2: 转基因油菜 Oxy-235 插入 DNA 的验证—预期的和得到的杂交片段

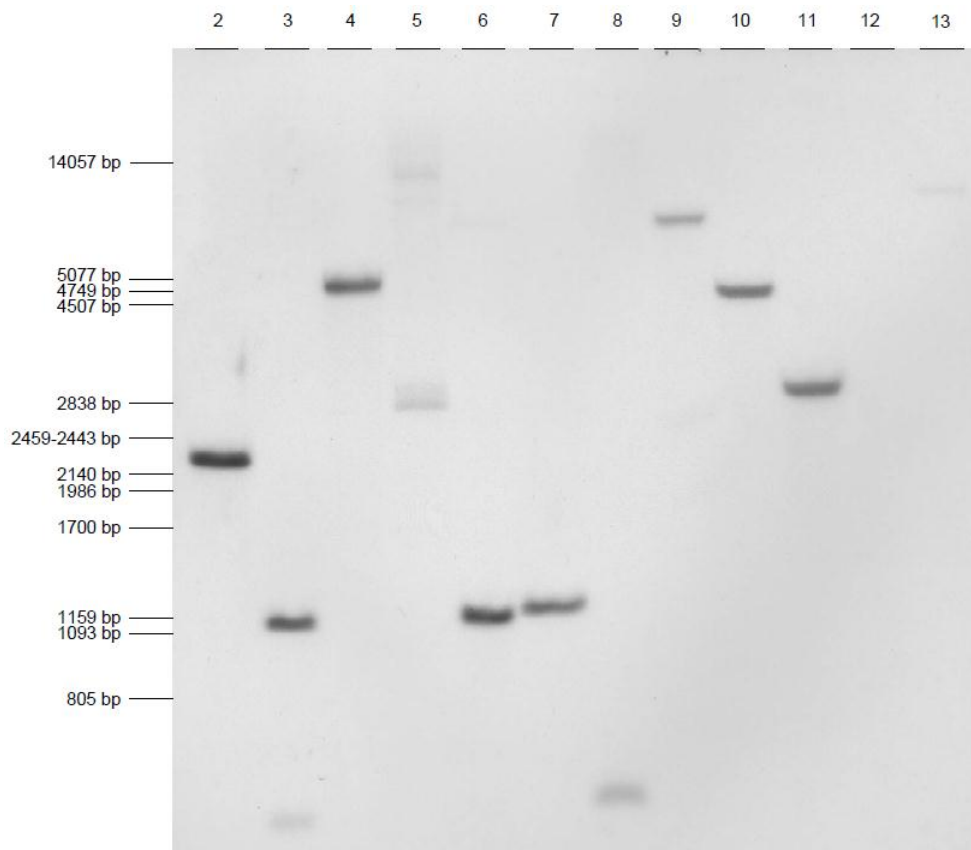
Digest	P35S – 5'ssuZm probe		oxy probe		3'nos probe		complete T-DNA probe		Fragment description
	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	Expected fragment	Obtained fragment	
<i>Bsa</i> HI	>1799 bp -	ca. 2275 bp -	>1799 bp >1103 bp	ca. 2275 bp ca. 1650 bp	- >1103 bp	- ca. 1650 bp	>1799 bp >1103 bp	ca. 2275 bp ca. 1650 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Xmn</i> I	>989 bp 462 bp -	ca. 1125 bp 462 bp -	- 462 bp >1451 bp	- 462 bp ca. 1600 bp	- - >1451 bp	- - ca. 1600 bp	>989 bp 462 bp >1451 bp	ca. 1125 bp 462 bp ca. 1600 bp	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Hpa</i> I	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp -	ca. 4800 bp -	>2619 bp >283 bp	ca. 4800 bp ca. 3350 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Sph</i> I	>2171 bp -	(1)	>2171 bp 188 bp -	(1)	- 188 bp >543 bp	(1)	>2171 bp 188 bp >543 bp	(1)	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Eco</i> RI	>1151 bp >1751 bp	ca. 1175 bp (2)	- >1751 bp	- ca. 7000 bp	- >1751 bp	- ca. 7000 bp	>1151 bp >1751 bp	ca. 1175 bp ca. 7000 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Afl</i> III	>248 bp 1278 bp - - -	(2) 1278 bp - - -	- 1278 bp 735 bp 178 bp -	- 1278 bp 735 bp (3) -	- - 735 bp 178 bp >463 bp	- - 735 bp (3) ca. 1675 bp (5)	>248 bp 1278 bp 735 bp 178 bp >463 bp	(2) 1278 bp 735 bp (3) ca. 1675 bp	5' integration fragment internal fragment internal fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Nco</i> I	>705 bp 494 bp -	>14 Kb (5) 494 bp -	- - >1703 bp	- - >14 Kb	- - >1703 bp	- - >14 Kb	>705 bp 494 bp >1703 bp	>14 Kb (5) 494 bp >14 Kb	5' integration fragment internal fragment 3' integration fragment
<i>Eco</i> RV	>1029 bp >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	- >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	- >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	>1029 bp >1873 bp	ca. 7100 bp (4)	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Hind</i> III	>2361 bp -	ca. 4700 bp -	>2361 bp -	ca. 4700 bp -	>2361 bp >541 bp	ca. 4700 bp ca. 1375 bp	>2361 bp >541 bp	ca. 4700 bp ca. 1375 bp	5' integration fragment 3' integration fragment
<i>Dra</i> I	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	>2902 bp	ca. 3150 bp	integration fragment
pRPA-BL-235 <i>Eco</i> RI	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	9013 bp	ca. 9000 bp	positive control



附图 4: 质粒 pRPA-BL-235 图谱



附图 5: 质粒 pRPA-BL-235 的 T-DNA 结构图



附图 6: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析- P35S—5'ssuZm 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*H I 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn* I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa* I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph* I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco* I 单酶切

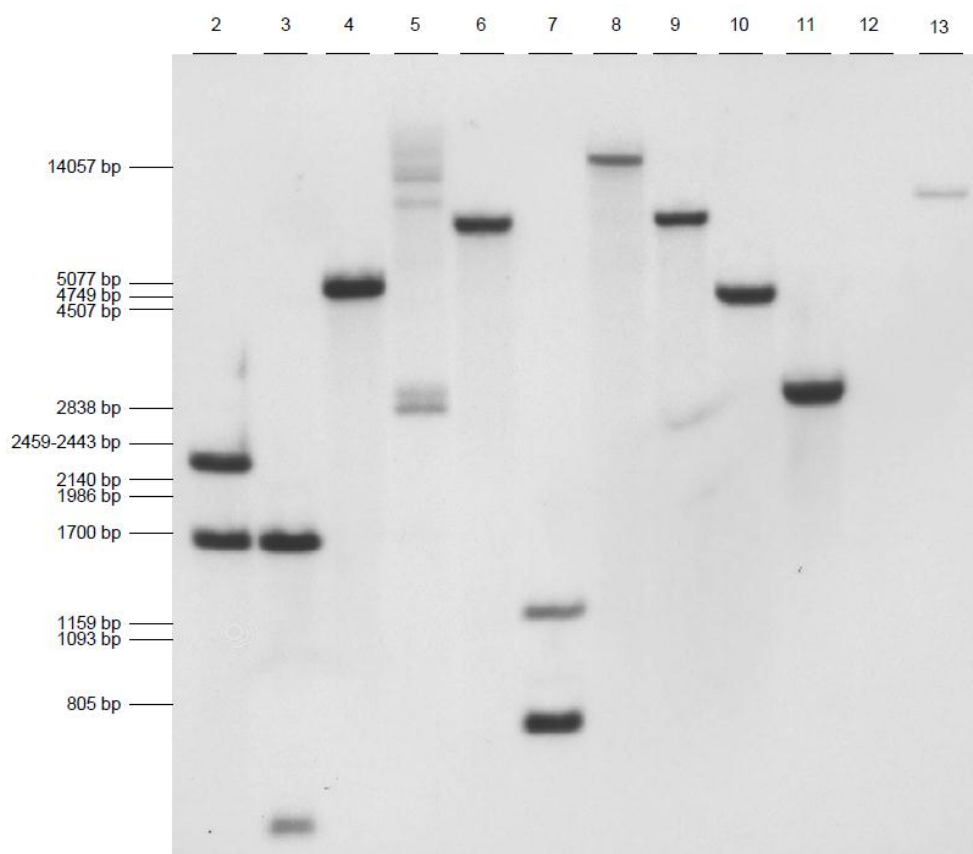
泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra* I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒



附图 7: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—oxy 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*HI 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn*I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa*I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph*I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco*I 单酶切

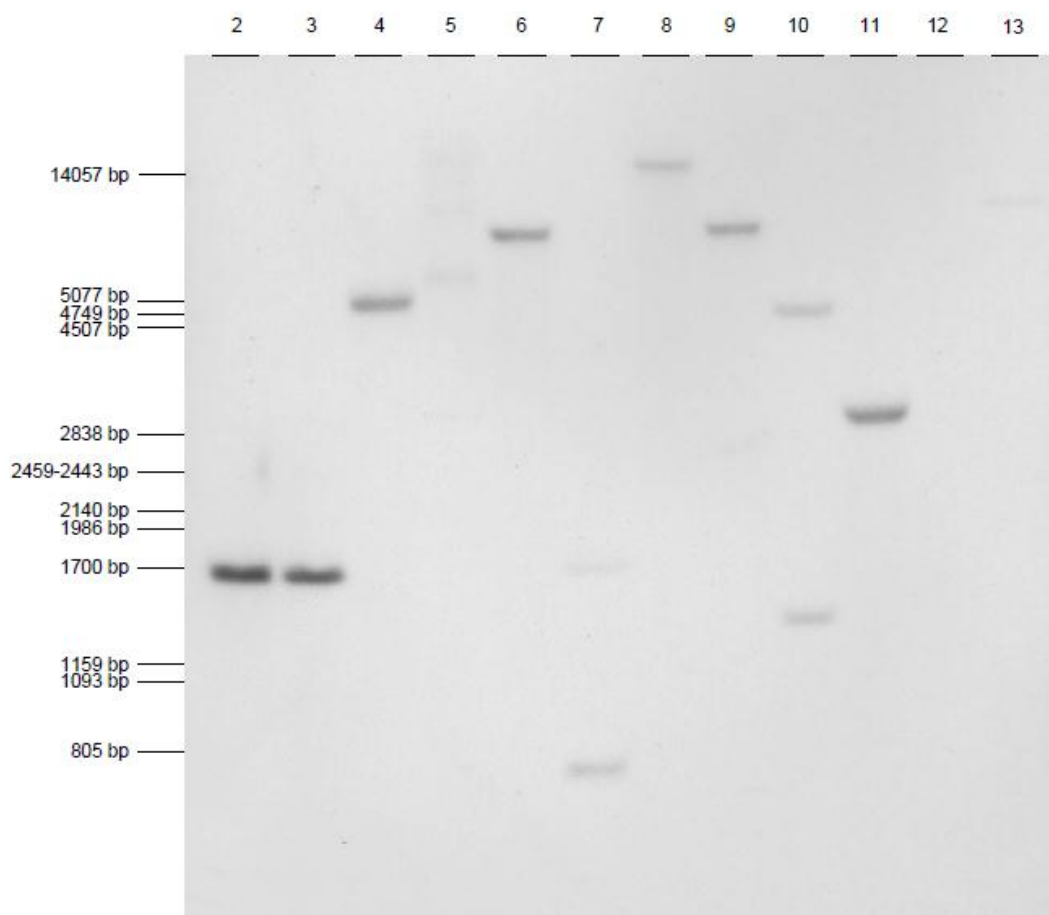
泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra*I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar + *Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒



附图 8: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—3'nos 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*H I 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn* I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa* I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph* I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco* I 单酶切

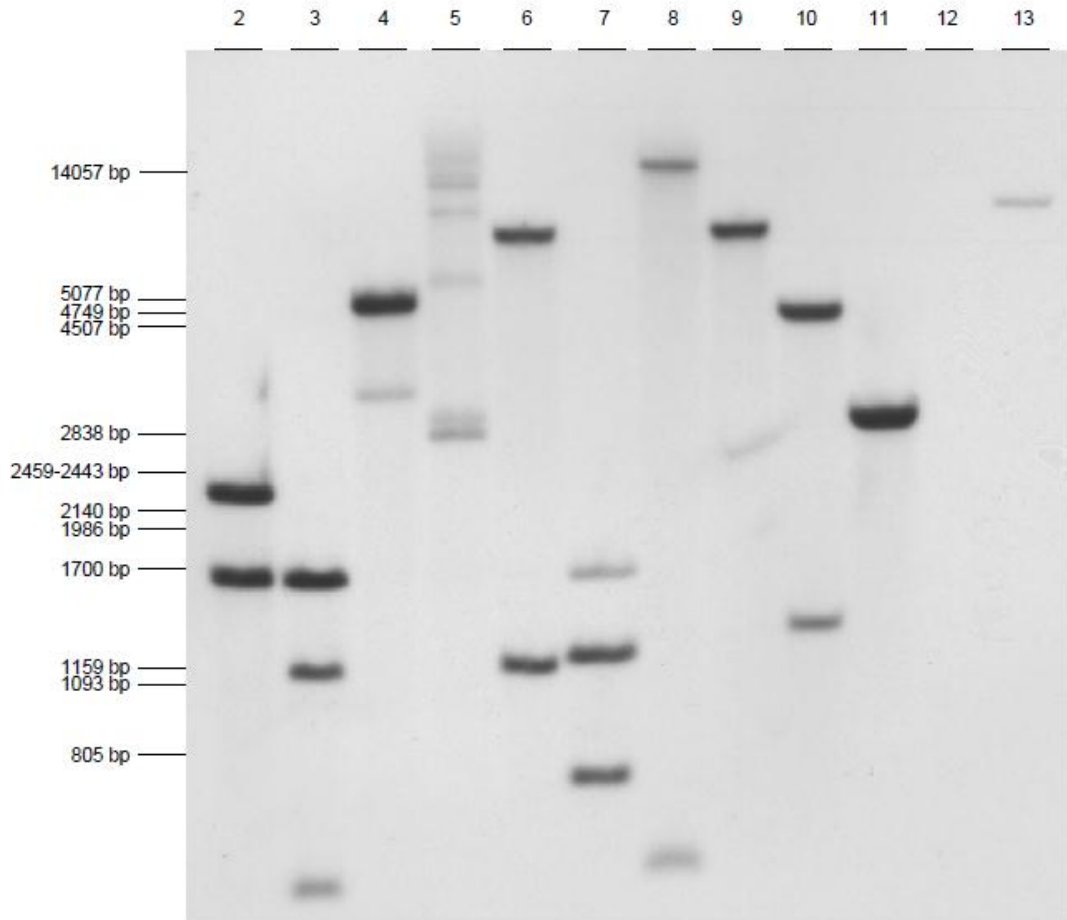
泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra* I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒



附图 9: 转基因油菜 Oxy-235 的 Southern 杂交分析—完整 T-DNA 探针

上样顺序:

泳道 2: OXY-235 油菜: *Bsa*I 单酶切

泳道 3: OXY-235 油菜: *Xmn*I 单酶切

泳道 4: OXY-235 油菜: *Hpa*I 单酶切

泳道 5: OXY-235 油菜: *Sph*I 单酶切

泳道 6: OXY-235 油菜: *Eco*R I 单酶切

泳道 7: OXY-235 油菜: *Afl* III 单酶切

泳道 8: OXY-235 油菜: *Nco*I 单酶切

泳道 9: OXY-235 油菜: *Eco*R V 单酶切

泳道 10: OXY-235 油菜: *Hind* III 单酶切

泳道 11: OXY-235 油菜: *Dra*I 单酶切

泳道 12: 野生型油菜 Drakkar: *Eco*R I 单酶切

泳道 13: *Eco*R I 单酶切的野生型油菜 Drakkar+*Eco*R I 单酶切的单拷贝的 pRPA-BL-235 质粒

3.3 Oxy-235 外源蛋白表达量检测

油菜 Oxy-235 的叶片和种子中的蛋白检测

I. 检测脲水解酶的方法

为了鉴定油菜叶片组织中 *oxy* 编码的脲水解酶,以温室里生长的油菜叶盘(用微量离心管盖切割)为材料,利用热尿素(50 mM Tris-HCl pH 6.8、8M 尿素、2% SDS、5% β -巯基乙醇、10%蔗糖、2 mM EDTA、10 mM DTT、0.005%溴苯酚蓝,65 $^{\circ}$ C)提取材料中的蛋白质。每个样品提取的蛋白成分利用 Bradford 蛋白分析蛋白成分。蛋白提取物煮沸 5 min 后,加入 12%聚丙烯酰胺凝胶中 160 v 电泳 1 h。蛋白在 Tris-glycine 缓冲液(0.025 M Tris、0.25 M 氨基乙酸、10% v/v 甲醇)中被电转至硝化纤维膜上,电转时间为 1 h,恒流 0.8 mA/cm 胶。硝酸纤维膜点在 TBS(50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl)中冲洗 2 min,在摇床上于室温下在 TTBS(50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl 和 2% Tween 20)中封闭 30 min。Oxy 脲水解酶来源于大肠杆菌。用常规方法制备提纯脲水解酶的兔抗体。

附着在硝化纤维滤膜上的 Oxy 脲水解酶的鉴别:首先在 TTBS 中与稀释 1000 倍的脲水解酶抗体共同孵育 30 min 或过夜,然后在 TTBS 中 15 min 冲洗 3 次。加入碱性磷酸酶和羊抗体在 TTBS 中 5000 倍稀释,30 min 后用 TTBS 在 15 min 内冲洗 3 次并用 TBS 简单冲洗。有色反应产物在 NBT/BCIP 溶液[在 10 ml 底物缓冲液(0.1 M Tris-HCl pH 9.5、0.1 M NaCl 和 5 mM $MgCl_2$)中含 3 mg 4-四唑硝基蓝和 1.5 mg 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐]中显色 30 min。

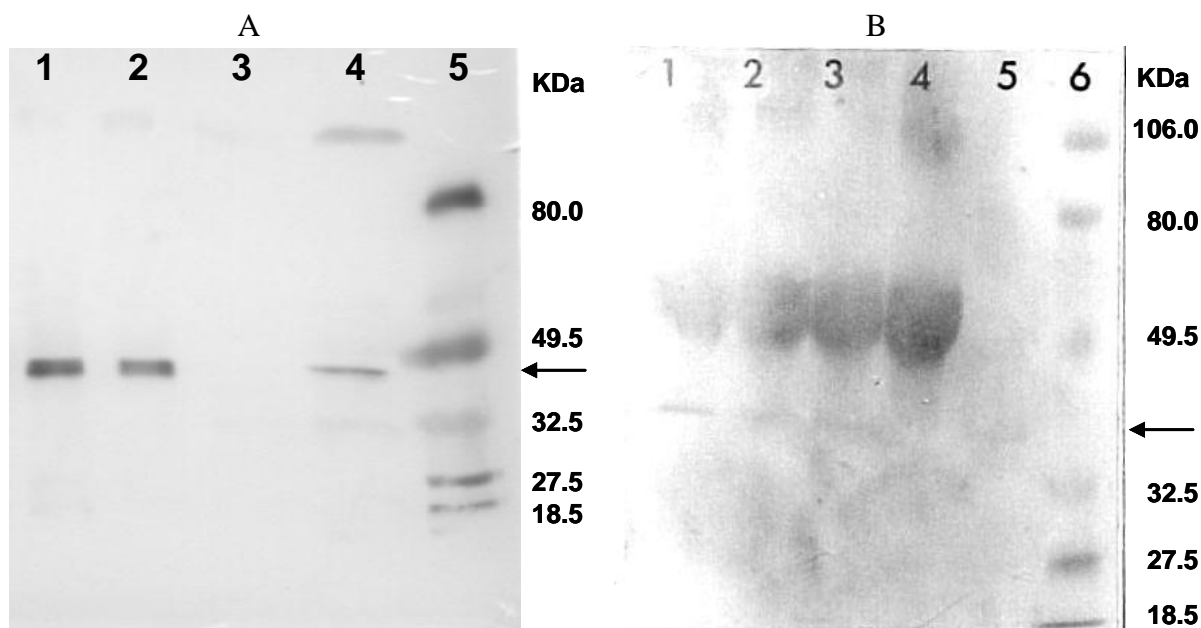
为了使样品中电泳脲水解酶含量增加,用 Pansorbin 使 TBS 中的油菜种子提取物发生免疫沉淀反应,检测方法同叶片。

II. 结果

利用上述方法检测来自两个油菜品种的蛋白质提取物:非转基因油菜 Westar 及 Westar-Oxy-235/R3。结果(附图 10)表明,在油菜叶片提取物中很容易检测到脲水解酶,用免疫学方法无法区分在大肠杆菌中产生的脲水解酶蛋白质和 Oxy-235 油菜表达的脲水解酶蛋白质。

因为很难从油菜种子提取物中检测到靶标蛋白质,在用电泳法分析油菜种子提取物中的脲水解酶之前,必须先使脲水解酶发生免疫沉淀反应。

Oxy 脲水解酶含量的测定:对于油菜 Westar-Oxy-235 而言,*oxy* 编码的脲水解酶在种子中含有约为 10 ng/mg 的总可提取蛋白质(10 ppm),在叶片中含有约为 100 ng/mg 的总可提取蛋白质(100 ppm)。因此,油菜种子中含有细菌的脲水解酶,但浓度比叶片中的脲水解酶低 10 倍。



附图 10: 通过 Western 印迹分析检测 Oxy-235 油菜中的 Oxy 脲水解酶

A. 叶片（热尿素提取方法）

第 1 泳道：纯 Oxy 脲水解酶 (*E. coli*) 20 ng

第 2 泳道：纯 Oxy 脲水解酶 (*E. coli*) 10 ng

第 3 泳道：Westar（野生型油菜）¹

第 4 泳道：转基因品种 Oxy-235 Westar (R₃)¹

第 5 泳道：分子质量标记

B. 种子（为了浓缩将进行电泳的样品中的脲水解酶蛋白质，先用针对脲水解酶的抗体使蛋白质提取物沉淀）

第 1 泳道：转基因品种 Oxy-235 / Westar (R₃)²

第 2 泳道：提取所用缓冲液 + 10 ng 纯 Oxy 脲水解酶 (*E. coli*)

第 3 泳道：Westar² + 10 ng 从纯 Oxy 脲水解酶 (*E. coli*)

第 4 泳道：Westar（野生型油菜）²

第 5 泳道：纯 Oxy 脲水解酶 (*E. coli*) 10 ng

第 6 泳道：分子质量标记

¹ 在每条泳道上加样 50 μg 蛋白质

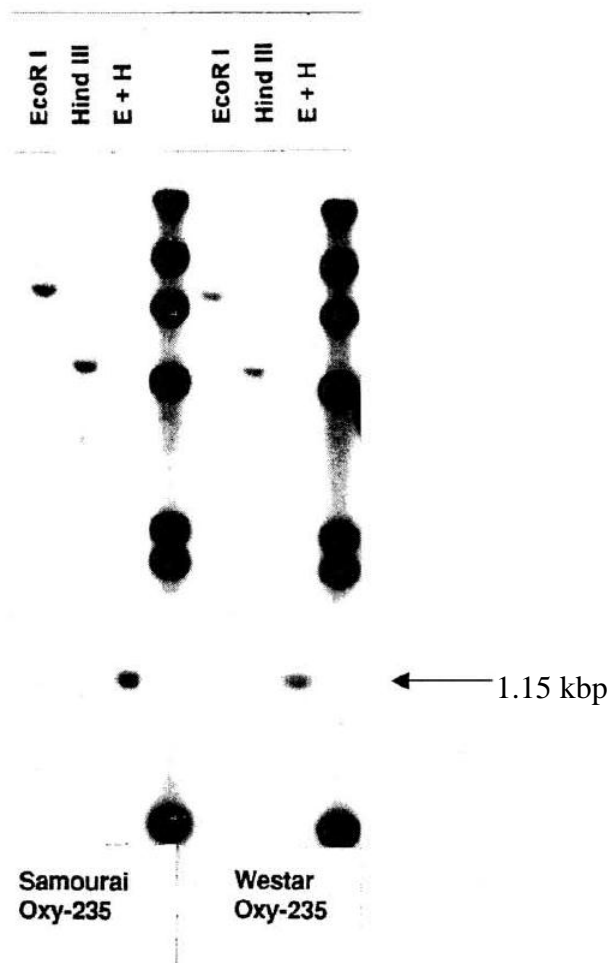
² 在每条泳道中，Oxy-235 油菜加 3.45 mg 蛋白，Westar 油菜加入 3.1 mg 蛋白

→：箭头所示表示 38 kDa 的 Oxy 脲水解酶

3.4 Oxy-235 插入序列稳定性的检测

在油菜的发育阶段进行了复杂交实验，收集了抗溴苯腈除草剂的分离数据。没有发现任何新性状包括表型和基因型的丢失。一旦整合入不同的遗传背景，整合基因都按照预测的方式表达。如当该基因杂交进入 Samourai，一种冬季的优良

品种，对 Samourai-Oxy-235 和 Westar-Oxy-235 进行 DNA 分析（第三代）。结果表明 *oxy* 基因位于 Samourai-Oxy 的同一个位点（附图 11）。



附图 11: *oxy* 基因插入稳定性鉴定 (Southern blot)

4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术

商业保密信息，在公开版本已删除

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

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

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告

转基因油菜 Oxy-235 对生态环境安全性综合评价报告是根据拜耳作物科学公司在海外进行的环境安全评价数据和国内进行的安全评价检测，进行撰写的。

转基因油菜 Oxy-235 对生态环境安全性综合评价报告是根据拜耳作物科学公司在海外进行的环境安全评价数据和国内进行的安全评价检测撰写的，报告请见

下页《转 *oxy* 基因抗溴苯腈除草剂油菜 Oxy-235 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

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

转基因油菜 Oxy-235 食用安全性综合评价报告是根据拜耳作物科学公司在国外进行的环境安全评价数据和国内进行的安全评价检测撰写的，报告请见下页《转 *oxy* 基因抗溴苯腈除草剂油菜 Oxy-235 的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告》。

转oxy基因抗溴苯腈除草剂油菜Oxy-235的生态环境安全性和食用安全性的综合评价报告

一、摘要

拜耳作物科学公司通过农杆菌介导转化技术将oxy基因转化到油菜品种Westar中，并进一步根据农艺性状筛选获得了转化株系Oxy-235，该转基因油菜可以稳定地表达腈水解酶蛋白。转基因油菜Oxy-235中的oxy基因是从肺炎克雷伯氏臭鼻亚种*Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae*分离出来的天然oxy基因经合成转化而成的。表达腈水解酶蛋白的转基因油菜Oxy-235对除草剂溴苯腈具有耐受性。

根据农业部要求，申请进口用作加工原料的安全证书，需要在国内进行食用安全及环境安全检测。华中农业大学和中国农业科学院油料作物研究所承担了环境安全评价工作，试验时间为2002年7月至2004年2月。食用安全检测则由天津市卫生防病中心承担，试验时间是2003年10月至2004年2月。

华中农业大学承担了转基因抗溴苯腈油菜Oxy-235和油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率检测工作，根据农业部相关标准于2002年7月至2003年9月实施了试验，评估结果表明：田间自然授粉条件下，转基因抗除草剂油菜Oxy-235与中国的甘蓝型油菜品中间存在一定的异交率，与白菜型油菜及其变种和芥菜型油菜间也存在一定比例的天然异交率。而在芸苔属的黑芥和甘蓝及其变种、其它属的白芥、新疆野油菜、诸葛菜、芥菜、菘蓝和萝卜为转基因油菜的花粉受体时，未检测到杂种植株。

中国农业科学院油料作物研究所检测Oxy-235对靶标和非靶标生物影响的研究，结果表明抗溴苯腈Oxy-235与捕食者或有益的非靶标生物的相互作用上没有改变，抗溴苯腈Oxy-235品种对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

天津市卫生防病中心开展的安全检测，包括90天大鼠喂养试验和抗营养成分的检测，试验时间是2003年10月至2004年2月。结果表明未发现转基因油菜Oxy-235对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察有生物学意义的改变；抗营养因子检测结果表明硫苷和芥酸在文献报道含量范围。

二、背景介绍

拜耳作物科学公司培育的抗除草剂溴苯腈油菜Oxy-235是通过农杆菌介导转化法将oxy基因转化到油菜品种Westar中而获得的。该转基因油菜可以稳定地表达使油菜具有抗溴苯腈能力的腈水解酶蛋白，并减少农药施用造成的农业成本增加和环境污染。自1997年加拿大首次批准Oxy-235油菜和由Oxy-235油菜加工的食品在市场上应用之后，随后美国（1999）、日本（2001）、澳大利亚（2002）等国也相继批准了该产品的种植和/或食用、饲用。

三、受体生物学特性

受体植物为甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.)。甘蓝型油菜属于十字花科 (Cruciferous)、芸薹族 (Brassicaceae)、芸薹亚族 (Brassicinae)。在欧洲和亚洲都已经发现野生种油菜,但是准确的发源地(或者是地中海地区,或者是北欧地区)尚不清楚。公元前 2000 年到 1500 年的一些梵语著作直接描述了油菜的形态。古代亚洲和地中海地区的一些居民就有用菜籽油进行照明的记录,后来又被用作食用油。早期的记录显示油菜籽早在 3000 多年前的印度就已有种植。然后又在公元前后被引入中国和日本。

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

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

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

四、基因操作

油菜 Oxy-235 是通过农杆菌介导的转化技术将 9013 bp 的质粒 pRPA-BL-235 的 T-DNA 转入油菜而获得的。oxy 基因包含在质粒 pRPA-BL-235 中,由 35S 启动子和 3'nos 终止子组成 oxy 基因盒,编码脲水解酶蛋白,使油菜转化植株 Oxy-235 具有抗除草剂溴苯腈特性。oxy 基因为 996 bp,编码 331 个氨基酸。

启动子区域来自于花椰菜花叶病毒,35S 启动子是一个组成型启动子,广泛用于植物基因高效表达。3'nos 来自于土壤根瘤农杆菌的 pTiT37 质粒上 T-DNA 的胭脂碱合成酶基因的终止子。

五、遗传稳定性

外源基因在 Westar 遗传背景的品种中的插入和表达稳定性通过对除草剂抗性性状标准的孟德尔分离定律获得验证。通过对 Oxy-235 转化体子代分离模式的检测,表明已经发生了稳定的物理整合。

此外,通过常规杂交,将 Oxy-235 转化体转入到其他遗传背景品种中 (Samourai)。对 Oxy-235 (Samourai 遗传背景) 和 Oxy-235 (Westar 遗传背景) 的第三代 DNA 进行了 southern 杂交分析。结果表明 oxy 基因在不同的遗传背景品种中稳定插入。

六、环境安全评价

1、生存竞争能力：油菜为小粒作物，千粒重一般为 3-5 克，籽粒呈圆形，因此油菜在运输和加工过程中极易散落在路边庭院，在温湿度适宜的条件下种子可萌发生长。但甘蓝型油菜植株耐热和抗旱性差，在干旱的荒地上一难以越夏。散落在阴凉潮湿处的种子有可能发芽生长并开花结实。

散落的种子能否在自然界生存和繁衍取决于该种子的生存适合度。油菜栽培种脱离人工栽培条件后一般难以生存和繁衍。目前为止还没有野生甘蓝型油菜种群在我国繁衍并形成严重危害的报道。1996-1998 年 NIAB 对英国国家授权的转基因油菜试验点进行的监测结果显示，无论是冬季还是春季，自生苗数量每年都减少，春季自生苗很多的地方其自生苗大多被春季施用的除草剂控制或被谷类作物排除，对自生苗的第二年观察其数量没有增长。

抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 的自生苗可采用轮作等措施减少危害，也可用溴苯腈以外的除草剂加以控制。2003 年中国农业科学院油料作物研究所对抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 的生存竞争能力检测结果表明：转基因品种与受体品种相比生存适合度没有改变，一般没有选择优势，但如果使用溴苯腈除草剂，抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 的抗溴苯腈基因有可能在自然界繁衍。在武汉对 Oxy-235 的种子进行的分期播种试验结果表明 Oxy-235 的种子除 6、7 月播种苗期遇到夏季高温天气死苗严重难以收获种子外，其他时间都能收获种子。目前为止，未发现抗溴苯腈转基因品种 Oxy-235 在生存竞争能力方面比普通油菜品种更强的证据。

2、基因流散风险：

一朵油菜花有大约 6 万粒花粉。油菜开花时花粉散出，由于重力作用，50% 的花粉落在距离单株 3 米之内，93% 的花粉飘落在离三分花朵 10 米范围内，只有 7% 左右的花粉像粉尘一样随风飘散。油菜花粉的分布呈尖峰型，即随着距离的增大花粉数量急剧减少，最远可达 1.5 公里，以昆虫为媒介可达 4 公里，三处的油菜花粉活力可持续一天至一周不等。

油菜田块周围的绝对花粉量及密度分布受多种因素影响。决定花粉量大小的主要因素是花粉源品种面积大小和花粉源品种；影响花粉密度分布的其他因素包括风力、风向、气压和空气湿度等。

甘蓝型油菜是常异花授粉植物，相邻种植的油菜植株花粉可以借助风和昆虫，特别是蜜蜂传播。蜜蜂具有在尽可能短时间内采最多蜜的特点，因此它们一般尽可能在离蜂巢近的地方寻找最好的食物。因此，油菜的异交主要发生在近距离范围内。

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

华中农业大学李再云教授在武汉在以属于芸苔属A染色体组的红菜苔、矮族黄和场州小白菜为受体的后代中，抗性株的比例为0.15%，0.33%，0.16%。在以

芥菜型油菜的两个品种新疆芥菜型油菜和雪里蕻为受体的后代中,均检测到抗性株,其出现比例分别为0.31%和0.09%。在以芥蓝、黑芥、萝卜、白芥、新疆野油菜和芥菜为受体的后代中,在较大群体中未检测到抗性株。诸葛菜在青海春播时未开花。菘蓝在青海也未收到种子。研究表明,在田间自然授粉条件下,转基因抗除草剂油菜Oxy-235可与中国的甘蓝型油菜品种、白菜型油菜及其变种以及芥菜型油菜间发生天然异交,而与其它物种(甘蓝、白芥、新疆野油菜、诸葛菜、菘蓝等)很难杂交。

大量证据显示,甘蓝型油菜的基因可以通过杂交转移到白菜和芥菜中。如果转基因位于A染色体组,这种可能性更大。在自然条件下,甘蓝型油菜的基因一般很难通过杂交进入其它物种(如甘蓝和白芥等)群体。

3、对靶标生物和非靶标生物的影响:oxy基因控制产生Oxy蛋白。田间的扩大观察已经确认,抗溴苯腈Oxy-235与受体在表现型、对病害和捕食者的敏感性或产量方面没有显著区别,这表明抗溴苯腈Oxy-235与捕食者或有益的非靶标生物的相互作用上没有改变。

检测抗溴苯腈Oxy-235品种对生物多样性的影响,认为抗溴苯腈Oxy-235品种对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

2002年-2003年华中农业大学对抗溴苯腈Oxy-235品种的生物多样性进行检测,研究表明抗溴苯腈Oxy-235品种对油菜地昆虫和病害种群的影响与普通油菜品种没有显著差异。

4、其它可能的生态风险:在加拿大种植转基因抗除草剂油菜已有多年历史。目前,已发现的问题有:在油菜产区1)出现抗除草剂杂草;2)出现抵抗多种除草剂的油菜自生苗;3)转基因花粉流散使转基因生产农户产品出口受到影响。

七、食用安全评价

1、营养学评价:拜耳作物科学公司在对转基因油菜Oxy-235与非转基因对照油菜种子中的各成分含量进行分析,分析内容包括基本成分、纤维素、矿物质、生育酚、氨基酸和脂肪酸,结果表明所有组分的营养值均在市售油菜标准值的范围之内,转基因油菜Oxy-235的种子与非转基因对照油菜在组成成分和营养价值上是等价的,转基因途径培育的Oxy-235不会对油菜的营养价值产生影响。

2004年天津市卫生防病中心对油菜Oxy-235和亲本对照的硫苷和芥酸进行检测,结果表明转基因油菜Oxy-235硫苷含量为19.6 $\mu\text{mol/g}$,芥酸含量为0.37%,符合NY415-2000中双低油菜标准(油菜籽油芥酸含量低于5%,油菜籽油硫苷含量低于45 $\mu\text{mol/g}$),同时也符合文献报道范围(油菜籽油芥酸含量低于0.0-2.0%,油菜籽油硫苷含量9.22-25.80 $\mu\text{mol/g}$)。

2、毒理学:腈水解酶到处都存在,是植物王国中共有的一种酶,它也存在于许多重要食用作物中。它们广泛分布在微生物中。人类和本地动物种群长期以来一直消化腈水解酶,而没有任何引起疾病的记载。没有记载表明导入的腈水解酶对人类具有毒性。OXY腈水解酶蛋白是一种高度专一性的酶,除了仅仅结合苯腈类除草剂外,不结合其它的底物。

利用Western印记分析方法,对Oxy-235油菜与*E. coli*表达的Oxy腈水解酶

蛋白进行等同性分析，结果表明 Oxy-235 油菜中提取的脲水解酶与 *E. coli* 中提取的脲水解酶在 Western 凝胶系统中具有相同的迁移率，二者具有相同的分子量，脲水解酶没有发生糖基化。

与以下大型公共参比数据库中的所有蛋白质序列进行了总的一致性检索：Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PIR, DAD和GenPept, 只观察到与各种来源的其他脲水解酶蛋白具有主要的相似性，因此oxy基因不可能编码毒蛋白。

除了以上信息以外，拜耳作物科学公司进行了Oxy-脲水解酶对哺乳动物潜在的毒性研究，按照500 mg/kg体重的剂量标准，对包含5只雄鼠和5只雌鼠的一组小鼠饲喂Oxy-脲水解酶蛋白，历时14天。结果表明，在本研究过程中无动物死亡，没有观察到任何异常临床表现，实验动物的体重变化没有受到实验处理因素的影响，检查过程中也没有发现大体病变。

2004年由天津市卫生防病中心将拜耳作物科学公司的转基因油菜 Oxy-235 掺入饲料（掺入比例为5%），饲喂大鼠90天，动物活动自如，被毛有光泽，鼻、眼、口腔无异常分泌物。转基因油菜 Oxy-235 对雌雄两种性别大鼠的体重、增重、进食量、食物利用率、血液学指标、生化指标、脏器系数以及病理组织学观察均未发现生物学意义的改变。

3、致敏性：从肺炎克雷伯氏臭鼻亚种分离出的脲水解酶序列与已知的具有潜在过敏性的序列进行比较，通过结合由抗原表位同源性检索结果推断，oxy基因不可能编码过敏蛋白。

脲水解酶的活化范围很大，最佳活化温度为35℃，15%的活化反应分别发生在10-50℃之间。

利用模拟消化液来检测脲水解酶在人类消化道中的稳定性，在未加任何酶的情况下，Oxy脲水解酶在pH 2.0条件下孵育90 min就有少量分解。在酶被稀释1000倍的条件，胃蛋白酶5 min可完全消化脲水解酶，与商品胰蛋白酶接触24 h后完全消化，这说明在消化过程中，脲水解酶与其它正常蛋白一样可以被很多消化酶很快完全消化。

4、抗生素抗性：Oxy-235转基因油菜无抗生素抗性。

八、非预期效应

所进行的大量环境安全和食用安全评价中，结果如预期的一样，是安全的，未发现非预期效应。

九、生产应用前景及拟采取的安全监控措施

拜耳作物科学利用农杆菌介导转化法将质粒 pRPA-BL-235 中的 oxy 基因转入到油菜基因组 DNA 中。oxy 基因编码脲水解酶蛋白，该酶能将溴苯脲除草剂水解成对植物无毒化合物。Oxy-235 油菜为农民提供灵活、简便和经济的油菜生产方式，因此可以给农民和油菜产业带来更多的经济效益；同时溴苯脲除草剂对环境和生物健康影响较小，有利于农业的可持续发展。

Oxy-235 于 1997 年在加拿大获得了 CFIA 的批准，随后美国（1999）、日本（2001）、澳大利亚（2002）等国家也获得批准。作为 Oxy-235 的研发商，拜耳

作物科学公司会要求贸易商严格采取措施,遵守相关法律法规,包装运输要可靠,标识要清楚,运输各环节严格操作,必要时向贸易商提供技术指导和支持,以保证的贸易符合农业部颁发的安全证书的要求。

十、总结

大量的研究表明,Oxy-235对人类健康和环境安全没有负面影响,与受体和常规玉米品种实质等同。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况

抗溴苯腈除草剂油菜 Oxy-235 是由拜耳作物科学公司通过农杆菌介导的转化获得的，该产品于 1997 年获得在加拿大上市批准。含 Oxy-235 的油菜可以为农民提供灵活、简便和经济的杂草防除方法，并为油菜杂交种产业提供新型的杂交系统，带来更多的经济效益。拜耳作物科学公司在中国申请 Oxy-235 油菜转基因安全证书的目的在于进口用作加工原料。中国是世界上的油菜主要种植国家，也是油菜消费主要国家。

10. 田间监控方案，包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等

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

进口过程中拟采取的安全防范措施

作为转基因油菜 Oxy-235 的研发商，拜耳作物科学公司在进口试验材料时，会严格遵守国家的相关法律法规，并按照一下的包装和标识以及运输环节的要求，如有任何问题会积极地向相关部门进行汇报和反馈。获得安全证书后向提供贸易商该产品的进口安全证书复印件的同时会要求贸易商采取下述措施来保证转基因油菜 Oxy-235 进口过程中的安全，必要时会提供技术支持：

- 1. 遵守相关法律法规：**在转基因油菜 Oxy-235 向中国进口的过程中，严格地遵守出口国和中国的相关法律和法规，遵守国际性生物安全公约，履行中国政府在进口安全证书中提出的要求和条件。
- 2. 包装和标识：**包装要牢固，标识要清楚。要与其它相似的非转基因产品明显区分开。
- 3. 运输环节：**

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

出口终端：对运往中国的转基因产品在进入出口终端之前，将对指定的筒仓进行清洗，以避免其他转基因生物污染。在确认其出口装船之前，将接受出口国相关部门的检验。

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

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

卸货：当船只到达中国口岸时，要求中国进口商严格执行中国农业部所制定的转基因安全管理条例，避免在港口卸货和中转中，有转基因产品流入

农业生产领域，确保中国的农业生物安全。将督促国内收货人，对其用于进口转基因产品的包装物和运输工具进行必要的清洗和标识。将要求国内收货人和中国有关港务部门，将进口转基因产品与在港的其他农产品分开存放，以确保不发生可能的污染。

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

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

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

11. 审查所需的其它相关资料

技术报告：商业保密资料

国内检测报告

附件 1：转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告（生存竞争能力检测）—中国农业科学院油料作物研究所

附件 2：转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告（转基因油菜和油菜栽培种、近缘种、野生种的异交率检测）—华中农业大学

附件 3：转基因油菜 Oxy-235 环境安全检测报告（生物多样性检测）—华中农业大学

附件 4：转基因油菜 Oxy-235 大鼠 90 天喂养试验报告—天津市卫生防病中心

附件 5：转基因油菜 Oxy-235 抗营养因子检测—天津市卫生防病中心

拜耳作物科学公司研究报告

附件 6：转基因油菜转化事件 Oxy-235 插入特征的描述

附件 7：转基因油菜 Oxy-235 中插入序列的测定

附件 8：油菜 Oxy-235 中的基因表达水平

附件 9：脲水解酶蛋白的氨基酸全序列与已知毒素和过敏原的同源性检索

附件 10：苯腈类除草剂和 oxy 编码的脲水解酶

附件 11：Oxy-235Westar (*B. napus*) 及其亲本和 8 个商品化油菜品种的成分分析

附件 12：抗除草剂（杂交）油菜转化事件 Oxy-235 的环境风险评估

12. 转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件

12.1 加拿大食品检验署批准文件

12.2 加拿大农业部批准文件

12.3 加拿大卫生部批准文件

植物卫生和生产分部
植物生物安全办公室

决定文件 98-25:

对罗纳普朗克公司抗 Oxynil 除草剂油菜品系 Westar Oxy-235 环境安全性的决定

制定本决定文件的目的是在 Dir94-08 确定新性状植物环境安全性的评估准则及其随同文件 Dir94-09 油菜(油菜/油菜籽)生物学，以及 Dir95-03 具有新性状的用于家畜饲料的植物评估准则指导下达成的对管理决定的解释说明。

加拿大食品检验署 (CFIA)，特别是植物生物技术办公室和 CFIA 饲料处已经对罗纳普朗克公司提交的关于油菜系 Oxy-235 的信息进行了评估。这种油菜品系含有一种基因，使其对碘苯腈 (Oxynil) 除草剂和溴苯腈 (bromoxynil) 除草剂具有抗性。CFIA 已经确定，同目前在加拿大已经商品化的油菜品种相比，这些具有新性状的植物不会改变对环境的相互作用，或对家畜食用源于 PNT 的饲料的安全性造成影响。

因此，特在 1997 年 2 月 18 日授权将油菜品系 Oxy-235 自由投放入环境和用作家畜饲料。任何其它源于相同转化植株的油菜品系及其后代也可以投放，条件是不执行种间杂交，计划的用途相似，经完全鉴定后得知这些植物不会显示任何附加新的性状，并且能表明在对环境的潜在影响和家畜的安全性上，最终的品系实质上等同于目前种植的油菜。

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

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



Canadian Food
Inspection Agency

Agence canadienne
d'inspection des aliments



**Plant Health and Production Division,
Plant Biosafety Office**

*Decision Document 98-25:
Determination of Environmental Safety of Rhône
Poulenc's Oxy-235 Herbicide-Tolerant Brassica napus
Canola Line Westar Oxy-235*

This Decision Document has been prepared to explain the regulatory decision reached under the guidelines [Dir94-08 Assessment Criteria for Determining Environmental Safety of Plants with Novel Traits](#) and its companion document [Dir94-09 The Biology of Brassica napus L. \(canola/rapeseed\)](#) and the guidelines [Dir95-03 Guidelines for the Assessment of Plants with Novel Traits as Livestock Feed](#).

The Canadian Food Inspection Agency (CFIA), specifically the Plant Biotechnology Office and the Feed Section of the CFIA, has evaluated information submitted by Rhône Poulenc Inc. regarding the canola line Oxy-235. This line has a gene that confers tolerance to ioxynil and bromoxynil. The CFIA has determined that this plant with novel traits does not present altered environmental interactions or pose concerns for the safety of livestock consuming feed derived from the PNT, when compared to currently commercialized canola varieties in Canada.

Unconfined release into the environment and use as livestock feed of the canola line Oxy-235 is therefore authorized as of February 18, 1997. All other canola lines resulting from the same transformation event and all their descendants are also approved, provided no inter-specific crosses are performed, provided the intended use is similar, provided it is known following thorough characterization that these plants do not display any additional novel traits and that the resulting lines are substantially equivalent to currently grown canola, in terms of their potential environmental impact and livestock feed safety.

This bulletin is published by the Plant Health and Production Division. For further information, please contact the Plant Biosafety Office or the Feed Section at:

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

加拿大农业和农业食品部
食物生产和检测分局
植物产品部
植物产品部
Nepean, 安大略

KIA 0Y9

电话：(613) 952-8000

传真：(613) 992-5219

1997年2月18日

Kelly 博士

技术和监管事务经理

Phone-Poulenc 加拿大公司

555 Southgate Drive

Guelph, 安大略

电话：519-767-1000 分机：34

传真：519-767-1004

亲爱的 Kelly 博士：

我们已经审阅了贵公司递交的关于将抗溴苯腈 (bromoxynil) 的欧洲油菜 *Brassica napus* 品系 Oxy-235 的无限田间释放的申请。这些植株携带一种抗除草剂溴苯腈的来自细菌的基因—腈水解酶基因 (nitrilase)。

根据你们提供的资料，Oxy-235 的无限制释放没有环境安全性担心，所以在加拿大被批准无限制释放。不过请注意：在连作谷类作物种植方式中，欧洲 *B. napus* 和抗欧洲油菜的自生植物不被控制；不过它们可通过种植者采用不同的农事模式，交替使用除草剂来管理。随着多种抗不同种类除草剂欧洲油菜品种的应用，欧洲油菜自生植株可能形成新的抗不同种类除草剂的混合抗性，从而可能导致这些除草剂使用失败和一些潜在的利益损失。

如果没有加拿大卫生局和加拿大农业和农用食品局 (AAFC) 下的食品部的安全性评估和批准，Oxy-235 的种子、果实和副产品不得进入人类食品和家畜饲料和取食食物链中。

该批准针对 Oxy-235。任何其它的 *B. napus* 品系和来自相同转化植株的种内杂交后代 *B. napus*、以及所有它们的后代可能田间释放是基于这些品种不进行种间杂交；使用目的相似；后代植株显示的植物全部特征是已知的，没有出现任何额外的新性状；并且后代品系在用作家畜饲料安全性和潜在的环境影响方面同目前种植的欧洲油菜品种相当。


不管何时，贵公司发现由使用抗溴苯腈 bromoxynil 的欧洲油菜品系而产生人畜健康或环境安全方面的任何风险，应必须立即告知本办公室。

该决议判决书进行了理论说明并将会公开。我们将通知各省办事处。如果你对该项批准有任何不明之处，请打电话给 Stacy Charlton (分机号：4386)。

Glenn Hansen

主任

抄送：地方联系人，EC, HC (食品生物技术；生物局) 种子项目官员，品种处，饲料处，PBO, BSCO, 主任或，植物保护，Janet Taylor (PMRA)

 Agriculture and Agri-Food Canada
 Direction générale de la production et de l'inspection des aliments

Post-it™ FAX TRANSMITTAL MEMO 7671 2 NO. OF PAGES

TO: Dr. John Kelly	FROM: Stacy Charbon
CO.: Rhone Poulenc	CO.: Plant Biotech Office
DEPT.: Reg. Affairs	PHONE #: 613-952-8000 x 4386
FAX #: 519-767-1004	FAX #:

Food Inspection Directorate
 Plant Products Division
 Nepean, Ontario
 K1A 0Y9
 Tel: 613-952-8000
 Fax: 613-992-5219

February 18, 1997

3625-6-10R1

Dr. John Kelly
 Manager, Technical and Regulatory Affairs
 Rhone-Poulenc Canada Inc.
 555 Southgate Drive
 Guelph, Ontario
 N1H 6J3
 Phone: 519-767-1000 ext. 34
 Fax: 519-767-1004

Dear Dr. Kelly:

We have reviewed your application for unconfined field release of the bromoxynil resistant *Brassica napus* line Oxy-235. These plants have been transformed with a bacterial gene (nitrilase) that confers resistance to the herbicide bromoxynil.

On the basis of the information provided to us, the unconfined release of Oxy-235 should not pose any concern to environmental safety, and is therefore authorized in Canada. Please note however, that oxynil and bromoxynil are commonly used on cereal crops which may be grown in rotation with *B. napus* canola and resistant canola volunteer plants will not be controlled in succeeding cereal crops. Nevertheless, they can be managed by growers using alternative herbicides with different modes of action. There is concern, with the adoption of several different herbicide tolerant canola varieties, that canola volunteers may develop with a combination of novel resistances to different herbicides. This could result in the loss of the use of these herbicides and any of their potential benefits.

No seed of Oxy-235, its progeny and byproducts, will enter human and livestock food and feed chains without safety assessment and approval by Health Canada and the Feed Section of AAFC.

This authorization relates to Oxy-235. Any other *Brassica napus* lines and intra-specific hybrids resulting from the same transformation event, and all of their descendants, may also be released, provided no inter-specific crosses are performed, provided the intended use is similar, and provided it is known following thorough characterization that these plants do not display any additional novel traits and that the resulting lines are substantially equivalent to currently grown canola varieties, in terms of their safety as livestock feed and potential environmental impact.

If at any time, your company becomes aware of any risk to animal and human health or environmental safety that could result from the use of bromoxynil resistant canola lines, you must immediately provide such information to this office.

Canada

Recycled Paper / Papier recyclé

A Decision Document explaining the rationale behind our decision will be made publicly available and we will inform provincial agencies of this decision. Should you require any clarification about this authorization, please call Stacy Charlton at extension 4386.

Yours sincerely,



Glenn Hansen
Director

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

新的食品信息-食品生物技术
抗溴苯腈除草剂油菜 (WESTAR-OXY-235)

加拿大卫生部已经通知罗纳普朗克加拿大公司，同意由转基因油菜转化品系 WESTAR-OXY-235 加工成的精炼油可用作食物油，该油菜品系抗溴苯腈除草剂。依照《*新型食品的安全性评估准则*》(1994 年 9 月)，该部门对油菜品系 WESTAR-OXY-235 进行了全面评估。这些准则是以国际公认的用于确定由转基因生物加工成的食品的安全性的原则为基础的。

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

要知道更多的信息，请与我们联系：

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

电话：(613) 941-5535
传真：(613) 952-6400



NOVEL FOOD INFORMATION - FOOD BIOTECHNOLOGY

BROMOXYNIL TOLERANT CANOLA (WESTAR-OXY-235)

Health Canada has notified Rhône-Poulenc Canada Inc. that it has no objection to the food use of refined oil from the genetically modified canola line designated Westar-Oxy-235, which is resistant to the herbicide bromoxynil. The Department conducted a comprehensive assessment of Westar-Oxy-235 according to its

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

(Également disponible en français)

For further information, please contact:

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

Telephone: (613) 941-5535
Facsimile: (613) 952-6400

13. 输出国家或地区经过科学试验证明对人类、动植物和生态环境无害的资料

拜耳作物科学公司研究报告（商业保密信息）

附件 6：转基因油菜转化事件 Oxy-235 插入特征的描述

附件 7：转基因油菜 Oxy-235 中插入序列的测定

附件 8：油菜 Oxy-235 中的基因表达水平

附件 9：腈水解酶蛋白的氨基酸全序列与已知毒素和过敏原的同源性检索

附件 10：苯腈类除草剂和 oxy 编码的腈水解酶

附件 11：Oxy-235Westar (*B. napus*) 及其亲本和 8 个商品化油菜品种的成分分析

附件 12：抗除草剂（杂交）油菜转化事件 Oxy-235 的环境风险评估

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

油菜是一种人们熟知的作物，几个世纪以来被用于食品和饲料。转基因油菜是一种“双低”品种，由此生产的油料其芥酸含量和加工油菜粉中硫甙含量均低，从而提高了品质。转入抗溴苯腈系统的遗传元件已了解得非常清楚，且有非常详细的文献报道。它们可以稳定地整合到基因组中。对于引入的蛋白质的特点也了解得非常清楚，它们具有非常专一的活性，并且可以稳定表达。引入的这些基因的产物不具有毒性。由Oxy-235加工的食品/饲料产品也没有毒性。转基因油菜种子及产品的成分完全和常规油菜种子及产品相似。转入的蛋白质在油料中检测不到，只有痕量的腈水解酶蛋白在种子和菜籽油粕中可以检测到。Oxy-235来源的株系同常规油菜具有同样重要的意义。

根据上述评估，可以得出结论，经抗溴苯腈植株Oxy-235加工的食品和饲料与目前商品化的油菜产品实质上是等同的。此外，提供的数据显示，遗传背景（不仅局限于传统的育种技术）不会影响产品质量的标准参数。并且没有资料显示食品/饲料的使用或成分的变化与引入的油菜的溴苯腈抗性相关。因此，同意申请农业转基因生物安全证书（进口）。

拜耳作物科学公司

2004年3月30日

八、本单位审查意见

源自转化植株 Oxy-235 的农业转基因油菜的安全等级为一级。脲水解酶蛋白在油料产品中不会检测到，只有痕量的脲水解酶蛋白在未经加工的油菜和菜籽油粕中可以检测到。在田间比较来自 Oxy-235 植株的油菜与常规油菜的区别，发现除了农业转基因油菜有抗溴苯腈性状外，两者没有明显的差别。Oxy-235 油菜与常规的油菜相比，在重要的营养成分方面，也基本相当，不必担心它对营养和健康有不利影响。因此，同意申请农业转基因生物安全证书（进口）。

拜耳作物科学公司

2004 年 3 月 30 日