(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 4 月 13 日 (13.04.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/059795 A1

(51) 国际专利分类号:
A01H 5/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/101416

(22) 国际申请日: 2016 年 9 月 30 日 (30.09.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510646846.7 2015 年 10 月 9 日 (09.10.2015) CN

(71) 申请人: **上海交通大学 (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人: **曹越平 (CAO, Yueping)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **肖培英 (XIAO, Peiying)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **薄路花 (BO, Luhua)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **刘峰 (LIU, Feng)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **崔云云 (CUI, Yunyun)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **周麟笔 (ZHOU, Linbi)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **张家进 (ZHANG, Jiajin)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **武湘豫 (WU, Xiangyu)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。 **李娜 (LI, Na)**; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: **上海新天专利代理有限公司 (SHANGHAI XIN TIAN PATENT AGENCY CO., LTD.)**; 中国上海市黄浦区南昌路 59 号 1606 室, Shanghai 200020 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) **Title**: SOYBEAN TRANSFORMATION EVENT SHZD32-01 AND APPLICATION METHOD THEREOF

(54) **发明名称** : 大豆转化事件 SHZD32-01 及其应用方法

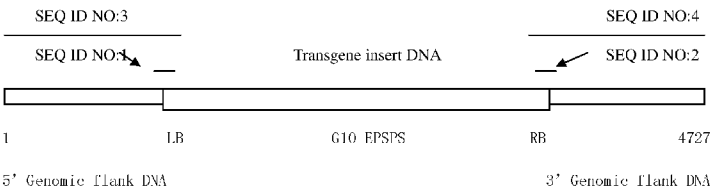


图 1

(57) **Abstract**: Provided are a soybean plant and seed comprising a soybean transformation event SHZD32-01 and an identification method thereof. The soybean transformation event SHZD32-01 comprises a nucleotide sequence such as a nucleic acid as shown by SEQ ID NO.9, and expresses resistance to glyphosate. Also provided is a production method of a glyphosate-resistant soybean and a method of growing soybeans by controlling weeds in a field.

(57) **摘要**: 提供一种含有大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株和种子及其鉴定方法，所述大豆转化事件 SHZD32-01 含有核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示的核酸分子，表现出草甘膦耐受性；还提供具有草甘膦耐受性大豆的生产方法和在田间控制杂草的大豆种植方法。

WO 2017/059795 A1

大豆转化事件 SHZD32-01 及其应用方法

技术领域

本发明是关于一个新的大豆的转化事件，被称为 SHZD32-01。该事件对除草剂草甘膦（Glyphoste）表现出较强的耐受性。本发明还涉及到与转化事件 SHZD32-01 有关的大豆植株部分、种子及其产品的应用方法。

背景技术

大豆（Glycince max）是重要的经济作物。大豆对除草剂的耐性是一个重要的农艺性状，特别是对草甘膦除草剂的耐性。草甘膦（N-phosphonomethylglycine）是一种植物物种的广谱除草剂，是孟山都公司生产的产品农达（Roundup.RTM.）除草剂中的主要成分，是一种在环境中半衰期短的安全型除草剂。当草甘膦喷施于植物表面时，草甘膦会系统地进入整个植物。草甘膦的植物毒性是由于它对莽草酸途径的抑制，而莽草酸是芳香族氨基酸合成的前体，草甘膦能够抑制植物中 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶（EPSPS）的合成。

草甘膦的耐性能够通过对草甘膦亲和力较低的突变体而获得，这种突变体在草甘膦存在时仍然能够表现代谢活性（U.S. Pat. Nos. 5,633,435、 5,094,945、 4,535,060 和 6,040,497）。通过酶在植物组织中对草甘膦的降解（U.S. Pat. No. 5,463,175）也能够赋予细胞对草甘膦的耐受性。这些基因被用于生产耐草甘膦转基因作物，因此使用草甘膦可以有效地控制杂草而不会对作物造成损害。耐草甘膦基因工程已经用于玉米（U.S. Pat. No. 5,554,798）、小麦（U.S. Pat. No. 6,689,880）、棉花（U.S. Pat. No. 6,740,488）、大豆（WO 9200377）和油菜（US Patent Appl. 20040018518）等作物。耐草甘膦转基因和耐其它除草剂转基因，如 bar 基因，（Toki el al., 1992; Thompson et al., 1987，耐除草剂草铵膦）也是有用的选择标记或评价标记，利用与其他农艺性状的连锁为筛选提供有用的表型。

外源基因的表达受其在染色体位置的影响，由于外源基因的插入位点不同，转化体表现差异很大，因此要筛选大量的转化体来鉴定出引入外源基因最优化表达的转化事件。在不同的转化事件中已经观察到在不同组织中导入基因的表达水平具有较大范围的变异。也存在不同的时空表达模式，如在不同的植物组织中转基因的相关表达也会不同，因此需要从成千上万的转化体中筛选出一个转基因表达水平符合商业化应用的转化事件。一个具有理想表达水平和模式的转化体，可以将该转基因通过有性杂交的传统方法导入其他遗传背景中，杂交后代可以保持原转化体外源转基因的性状表达。该策略可以确保目的基因在大量适应当地生长的优良品种中可靠表达。

检测特殊的转化事件可以通过鉴定有性杂交后代植株或种子是否含有转基因，另外，检测特殊转化事件的方法对遵守批准上市前的规定和要求是必要的，同时有利于进行转基因作物的食品标识。使用任何核酸检测方法，如聚合酶链式反应（PCR）或利用多聚核酸探针的 DNA 杂交方法都可以检测是否含有转基因。这些检测方法一般都关注常用的转基因元件，如启动子，终止子，标记基因等，但对于辨别不同的转化事件是无效的，特别是使用同一个 DNA 载体的转化事件更是无法分析，除非插入转基因附近的染色体 DNA 序列（旁侧 DNA）是已知的。例如 Windels 等人 1999 年对耐除草剂转基因大豆 40-3-2 使用了跨越插入基因和旁侧序列的一对引物进行转化事件的检测，一个引物特异地包括了插入基因的序列，另一个引物包括了侧翼序列（美国专利号为：6,893,826; 6,825,400; 6,740,488; 6,733,974 和 6,689,880; 6,900,014 和 6,818,807）。

发明内容

本发明提供一种大豆转化事件 SHZD32-01 及其应用方法，大豆 SHZD32-01 是由一个大豆栽培种衍生而

来，具有对草甘膦除草剂的耐受性，同时提供来自转化事件 SHZD32-01 的大豆植株部分、种子及其产品的应用方法。

本发明提出一个新的被命名为 SHZD32-01 的耐草甘膦的大豆转化事件，以及含有该事件植株部分、种子和由植株、植株部分、种子和产品而来的产品。

本发明提出一种在含有事件 SHZD32-01 的大豆细胞基因组中含有的新的 DNA 分子，能够用多种方法鉴定样品中这种新的 DNA 分子。

本发明中提出一个重组的 DNA 分子，存在于所述大豆转化事件 SHZD32-01 中，包括下列所给出的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 以及该 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9 完全互补序列中的至少一个核酸序列。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:1。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:2。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:3。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:4。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:9。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。

所述的重组 DNA 分子，包括核酸序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。

所述的重组 DNA 分子，这里所述重组 DNA 分子来自于大豆转化事件 SHZD320-01，包含所述转化事件的代表性种子样本保存在中国典型培养物保藏中心（China Center for Type Culture Collection, CCTCC），地址：中国 武汉 武汉大学，保藏日期：2015 年 8 月 18 日，保藏编号为 CCTCC NO:P201513；该保藏生物材料的分类命名为：大豆属栽培大豆种 大豆 SHZD32-01 *Glycine max (L)Merr.* 。

本发明提出的重组 DNA 分子，这里所述重组 DNA 分子存在于大豆植株、大豆植物细胞、大豆种子、大豆植株部分或商品产品中。

本发明中提出的一种 DNA 引物或探针包含足够长的连续的核苷酸序列来自于 SEQ ID NO:9 或其互补序列，这里所述引物或探针是为诊断转化事件 SHZD32-01 的，这里所述 DNA 引物和探针能在严格杂交条件下与包含所给出的 SEQ ID NO:1-4 和 SEQ ID NO:9 中的一个核酸序列的 DNA 分子杂交，而不能在严格杂交条件下与不包含所给出的 SEQ ID NO:1-4 和 SEQ ID NO:9 中的一个核酸序列的 DNA 分子杂交。

本发明提出的一对 DNA 分子所包含的第一个 DNA 分子和与第一个 DNA 分子不同的第二个 DNA 分子，这里所述的第一个 DNA 分子和第二个 DNA 分子每个都包含一段足够长的连续的核苷酸序列来自 SEQ ID NO:9，或与其完全互补的序列，作为 DNA 引物与转化事件 SHZD32-01 的 DNA 一起用于扩增反应产生诊断样本中大豆转化事件 SHZD32-01 的扩增产物。

本发明提出的一种检测样品中转化事件 SHZD32-01 的 DNA 分子存在的方法，所述方法包括：a)使上述样品的 DNA 与权利要求 11 中的 DNA 探针相接触；b)使上述样品和上述 DNA 探针置于严格杂交条件下；c）检测上述 DNA 探针与上述样品中 DNA 分子的杂交情况，上述 DNA 探针与上述 DNA 分子杂交，说明上述样品中存在大豆转化事件 SHZD32-01 的 DNA 分子。

本发明提出的一种检测样品中转化事件 SHZD32-01 的 DNA 分子存在的方法，所述方法包括：a)使上述样品的 DNA 与权利要求 12 中的这对 DNA 分子相接触；b)进行扩增反应产生含有所给出的 SEQ ID 1-4 和 SEQ ID NO:9 和其完全互补序列中一个核酸序列的扩增产物；c）检测上述反应中的 DNA 扩增产物，上述反应中有扩增产物，说明上述样品中存在大豆转化事件 SHZD32-01 的 DNA 分子。

本发明提出的一种 DNA 检测试剂盒包括一对引物或至少一个 DNA 探针，这里 a)这对 DNA 引物包括至少一个 DNA 分子包含足够长的连续的核酸序列来自 SEQ ID:9 或其完全互补序列，这里的这对 DNA 引物能够产生诊断转化事件 SNZD32-01 的扩增片段；b)至少一个 DNA 探针是诊断转化事件 SHZD32-01 的。

本发明提出一种田间种植含有 SHZD32-01 的大豆，在田间用草甘膦除草剂处理杂草和含有 SHZD32-01 的大豆植株控制田间杂草生长。

本发明的技术方案是：

一种含有大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株或其部分，其特征在于，大豆植株或其部分包含大豆转化事件 SHZD32-01，其有代表性的种子保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO:P201513。

一种所述的含有大豆转化事件 SHZD32-01 大豆植株的种子，其特征在于，所述的种子含有所述大豆转化事件 SHZD32-01。

一种由所述的种子生产的大豆商品产品，其特征在于，所述商品产品包含所述大豆转化事件 SHZD32-01。

所述商品产品进一步定义为食品、面粉、豆粕或油。

所述的大豆植株部分进一步定义为细胞、花粉、胚珠、花、芽、根或叶片。

所述的大豆植株进一步定义为包含所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株的任何世代的后代植株，该后代植株包含所述大豆转化事件 SHZD32-01。

所述大豆植株或其部分能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增。

所述诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

一种大豆转化事件 SHZD32-01 包含种子，其特征在于，所述的种子能够产生所述大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增。

所述的大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增包括 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

所述的食品、面粉、豆粕或油进一步定义为含有能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 诊断扩增的核酸，当使用 DNA 扩增方法进行检测时，上述诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

一种产生耐草甘膦除草剂大豆的方法，其特征在于，包含将所述大豆转化事件 SHZD32-01 引入大豆基因组。

所述产生耐草甘膦除草剂大豆的方法包含下列步骤：（a）用第一种包含所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株与第二种不含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株进行杂交产生后代植株；和（b）筛选至少一个第一种含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 并耐草甘膦的后代植株。

所述产生耐草甘膦除草剂大豆的方法进一步包含，通过所述第一种含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 并耐草甘膦的后代植株自交，产生第二代后代植株，并选择至少一个含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 的第一种植株的纯合体植株。

一种具有草甘膦耐受性大豆植株、种子或其含有 DNA 的包括草甘膦抗性蛋白 G10-EPSPS 和能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 诊断扩增的部分。

所述的具有耐草甘膦耐受性大豆植株、种子或其含有 DNA 的部分，其特征在于，所述的大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

一种产生大豆商品产品的方法，其特征在于，包括：（a）获得权利要求 1 所述的大豆植株或部分；和（b）从所述大豆植株或其部分生产所述大豆商品产品。

所述的大豆商品产品被定义为食品、面粉、碎屑、分离蛋白或油。

一种在田间控制杂草的大豆种植方法，其特征在于，使用所述的包含大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆

植株，所述方法包括在田间使用一定剂量的草甘膦以有效地控制杂草的生长，所述大豆表现出耐草甘膦特性。

所述的在田间控制杂草的大豆种植方法，其特征在于，在大豆生长阶段从 V1 到 R4 期进行田间处理。

本发明提出一个被定名在 SHZD32-01 的大豆转化事件，对除草剂草甘膦具有很好的耐受性，其后代有代表性的种子保藏在中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO:P201513。本发明也提出新的与转化事件 SHZD32-01 有关的 DNA 分子以及这些 DNA 分子的使用方法。本发明也提出大豆转化事件 SHZD32-01 的种子，后代，植株部分，细胞和商品产品。本发明也提出大豆转化事件 SHZD32-01 的使用方法和生产抗草甘膦大豆的方法。

本发明提出与大豆转化事件 SHZD32-01 有关的重组 DNA 分子。这些重组 DNA 分子包含代表转化事件 SHZD32-01 转基因插入侧翼序列的基因组 DNA 区域，和/或转基因插入区域，和/或任何一个转基因插入与侧翼序列之间的结合区的相邻序列。本发明还提出了作为引物和探针使用的诊断转化事件 SHZD32-01 的 DNA 分子和诊断大豆转化事件 SHZD32-01 存在的扩增产物。也公开了包含这些分子的大豆植株，植物细胞，植株部分，商品产品，后代和种子。

本发明提出了用于检测转化事件 SHZD32-01 的 DNA 存在和/或不存在的方法和试剂盒，本发明提出检测 SHZD32-01 的方法是通过将样品 DNA 与引物系列混合，让来自转化事件 SHZD32-01 的基因组 DNA 进行核酸扩增反应产生诊断大豆转化事件 SHZD32-01 的扩增 DNA 片段，进行核酸扩增反应并产生扩增的 DNA 产物，以及检测扩增的 DNA 存在和/或不存在。本发明也提出了一种检测 SHZD32-01 的方法是将样品 DNA 与探针接触，在杂交反应中来自大豆转化事件 SHZD32-01 的 DNA 会与对转化事件 SHZD32-01 具有特异 DNA 分子杂交，进行杂交反应，检测探针与 DNA 分子的杂交。本发明中试剂盒包含的方法和组成成分对检测来自转化事件 SHZD32-01 的 DNA 的存在是有用的。

本发明提出大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株，种子，植物细胞，后代植株，植株部分，或来自植株，植物细胞，或的种子的商品产品。本发明也提出大豆植株，种子，植物细胞，植物部分，或商品产品含有重组 DNA 分子含有给出的 SEQ ID:1-4 和 SEQ ID NO:9 和其互补序列中的一个核酸序列。本发明也提出大豆植株，种子，植物细胞，后代植株，植株部分，或来自与植株或种子的商品产品含有大豆转化事件 SHZD32-01 并包含重组 DNA 分子，在 DNA 扩增反应中能够产生包括 SEQ ID:1, SEQ ID:2 的扩增产物。

本发明另一方面是在田间使用含有 SHZD32-01 的大豆植株控制杂草的方法，其方法包括田间种植含有转化事件 SHZD32-01 的大豆种子，所述有代表性的种子保藏在中国典型培养物保藏中心（CCTCC），其编号为 P201513。让上述种子萌发并利用有效的草甘膦施用剂量处理上述植株控制该田间杂草的生长。

根据本发明的另一方面，提出生产耐草甘膦大豆的方法包括以下步骤：（a）用一个含有转化事件 SHZD32-01 的耐草甘膦大豆亲本，与第二个没有草甘膦耐受性的亲本大豆进行杂交，产生纯合的后代植株；（b）筛选耐草甘膦的后代植株。详细可描述为，本发明提出通过有性杂交产生耐草甘膦植株和种子的方法是用含有转化事件 SHZD32-01 的耐草甘膦大豆与第二个大豆材料杂交产生种子，种植这些种子得到后代植株，用草甘膦处理这些后代植株，筛选得到抗草甘膦的后代植株。方法也包括，让这些筛选出的后代植株进行自交产生纯合的第二代后代植株，并从中选出抗草甘膦的植株。方法也包括用筛选出的后代植株与另外一个大豆植株（材料）进行有性杂交产生种子，种植这些种子得到第二代后代植株，用草甘膦处理这些第二代后代植株，筛选得到抗草甘膦的第二代后代植株。本发明提出的产生耐草甘膦植株和种子的方法，通过自交含有转化事件 SHZD32-01 的耐草甘膦大豆而产生种子，种植这些种子得到后代植株，用草甘膦处理这些后代植株，选择得到耐草甘膦的后代植株。育种方法可以包括用含有转化事件 SHZD32-01 的亲本植株与第二个也耐草甘膦的亲本大豆杂交，用在每个亲本中找到的与耐草甘膦表型在遗传上连锁的 DNA 分子

标记筛选耐草甘膦后代。

本发明一个方面是提出来自于大豆转化事件 SHZD32-01 的植株或种子，或来自植物部分或种子的产品中转基因/基因组结合区域 DNA 的结构和检测方法。提出的 DNA 分子包含至少一个选自包括 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的转基因/基因组结合区，及其互补序列。结合区分子横跨包含异源 DNA 插入到大豆细胞基因组的区域和插入位点的旁侧序列的大豆基因组 DNA。该结合区序列一方面被定义为分别包含核苷酸 SEQ ID NO:9 的 824-844 或 3994-4014 位置。本发明另一方面，结合区也可以定义为包含侧翼基因组和转基因部分的一个或多个序列，如下列给出的核苷酸序列 SEQ ID NO:9 中的 804-844，774-844，824-864，824-894，774-894,3974-4014，3944-4014,3994-4034，3996-4014,3996-4066，或 3946-4066。这些序列和包含这些序列的植物和种子构成本发明的另一方面。

本发明提出一个来自于大豆转化事件 SHZD32-01 的新 DNA 分子，包含转基因/基因组区域的 SEQ ID NO.3，或其互补序列。大豆植株和种子的基因组中包含 SEQ ID NO.3 为本发明的一个方面，SEQ ID NO.3 进一步包含完整的 SEQ ID NO.1。

根据本发明的另一方面，提出一个包含转基因/基因组区域的 DNA 分子 SEQ ID NO.4，或者其互补序列，该 DNA 分子是大豆转化事件 SHZD32-01 所特有的新 DNA 分子。大豆植株和种子包含 SEQ ID NO.4 是本发明的另一个方面。SEQ ID NO.4 进一步包含完整的 SEQ ID NO.2。

来自 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4, 或 SEQ ID NO.9 的任意核苷酸引物对，或与其互补的序列，当用于 NDA 扩增反应鉴定大豆转化事件 SHZD32-01 的衍生组织时，分别包含 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.9 任何部分的扩增是本发明另一个方面。在一个具体实施例中引物对可以由引物 A（SEQ ID NO.5）和引物 D（SEQ ID NO.8）组成。

本发明的另一方面是大豆植株，或种子，或来自于植株或种子的产品包含转化事件 SHZD32-01，从大豆植株，或种子，或产品中分离基因组 DNA，产生的扩增序列包含 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2。

本发明还有另一个方面是大豆植株，或种子，或来自植株或种子的产品包含转化事件 SHZD32-01，从大豆植株，或种子，或产品中分离的基因组 DNA 在扩增反应中产生的扩增序列，这个 DNA 扩增方法中使用 DNA 引物分子为 SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.6。

本发明的另一方面是大豆植株，或种子，或产品，或来自植株或种子的商品包含转化事件 SHZD32-01，分离大豆植株，或种子，或产品的基因组 DNA，利用 DNA 扩增方法产生扩增片段，在这里的 DNA 扩增方法中使用引物分子 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8。产品或商品可以包含，没有限定，食品或饲料产品，或包含来自一种或多种含有转化事件 SHZD32-01 的下列产品：卵磷脂，脂肪酸，甘油，甾醇，食用油，去脂豆粕，大豆食品包括去脂和烘烤大豆膳食，豆浆豆腐，大豆粉，大豆组织蛋白，和大豆蛋白纤维。

根据本发明的另一方面，提出了检测样品中大豆转化事件 SHZD32-01 特异 DNA 存在的方法。该方法包括：（a）混合样品包括 DNA 与引物；（b）进行核酸扩增反应，产生扩增产物；（c）检测扩增产物，这里的扩增产物包含 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2。使用含有 DNA 引物分子的试剂盒用于 DNA 扩增反应产生包含 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 的扩增是本发明的另一方面。

根据本发明的另一方面，提出了检测样品中大豆转化事件 SHZD32-01 特异 DNA 存在的方法。该方法包括：（a）混合样品包括 DNA 与能够在严格杂交条件下与转化事件 SHZD32-01 的基因组 DNA 进行杂交而不能在该条件下与对照大豆植株 DNA 杂交；（b）使样品和探针处于严格的杂交条件下；（c）检测探针和转化事件 SHZD32-01DNA 的杂交情况，这里所述探针包含 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2。样品可以包含后代种子，植株，或包含转化事件 SHZD32-01 的植株部分，或任何来自含有转化事件 SHZD32-01 的下列产品：卵磷脂，脂肪酸，甘油，甾醇，食用油，去脂豆粕，大豆食品包括去脂和烘烤大豆膳食，豆浆豆腐，大豆粉，浓缩

大豆蛋白，大豆分离蛋白，水解植物蛋白，大豆组织蛋白和大豆蛋白纤维。检测试剂盒包括的 DNA 探针序列包括一个含有与 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 序列相同或互补的 DNA 序列是本发明的另一方面。试剂盒包含的 DNA 分子包含 SEQ ID NO.18，SEQ ID NO.19，或 SEQ ID NO.20，或者它们的互补序列，也是本发明的一个方面。

详细描述：

本发明涉及到一个新的被命名为 SHZD32-01 的耐草甘膦的大豆转化事件，以及含有该事件植株部分，种子和由植株,植株部分，种子和产品而产生的产品。本发明提出一种在含有事件 SHZD32-01 的大豆细胞基因组中含有的新的 DNA 分子，能够用多种方法鉴定样品中这种新的 DNA 分子。本发明提出一种田间种植含有 SHZD32-01 的大豆,在田间用草甘膦除草剂处理杂草和含有 SHZD32-01 的大豆植株控制田间杂草生长。

下列定义和方法为本发明提供更精确的解释。注释和词汇按照相关文献中的常规用法理解。

这里所述大豆（Glycine max），包含所有育成的大豆品种或大豆材料。

这里所用的词汇“包含”意思为包括，但不限定于包括。

草甘膦是指 N-phosphonomethylglycine 及其盐类，草甘膦是农达（Roundup.RTM.）除草剂（孟山都公司）中的活性添加物质。用草甘膦除草剂处理是指用农达 Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® 除草剂或任何其他包括含有草甘膦成分的除草剂。草甘膦的商业用配方实例包括，但不限定于孟山都公司出售的 ROUNDUP®, ROUNDUP®ULTRA, ROUNDUP®ULTRAMAX, ROUNDUP®CT, ROUNDUP®EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP®BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK®和 ACCORD®除草剂,以上这些都含有草甘膦的异丙铵盐；ROUNDUP®WEATHERMAX（草甘膦钾盐),孟山都公司作为除草剂 ROUNDUP®DRY 和 RIVAL®出售,含有草甘膦铵盐;孟山都公司出售的 ROUNDUP®GEOFORCE,含有草甘膦钠盐;先正达农作物保护出售的 TOUCHDOWN®除草剂,含有草甘膦三甲基盐，除草剂还包括国内各农药厂家生产的含上述成分的除草剂，在使用上述任何草甘膦除草剂配方田间处理含有 SHZD32-01 的耐草甘膦大豆可以控制田间杂草的生长而对含有 SHZD32-01 的大豆植株的生长或产量没有影响。

“转化事件”是通过转化将异源 DNA 导入植物细胞，如载有外源基因的载体将该外源基因插入植物基因组而获得再生植株而获得的群体，根据外源基因插入植物基因组的特殊位点进行选择。事件是指原始的转化体及包括异源 DNA 的转化体的后代。转化事件也指通过转化体与另一个品种杂交获得的带有外源 DNA 和侧翼序列 DNA 的后代。转化事件也指将含有插入基因和侧翼序列的原始转化体的 DNA 通过与含有这个插入 DNA 的亲本和不含有这个插入的亲本进行有性杂交导入到后代中，使后代得到该插入基因。

“重组 DNA 分子”是指自然界不存在的 DNA 分子,在人类的干预下创造的 DNA 分子,是两个异源的 DNA 分子人工合成为一个多聚核苷酸序列。本发明将外源基因导入到大豆基因组中与插入位点的大豆基因组结合，形成重组的 DNA 分子。

耐草甘膦大豆的培育最初是通过含有耐草甘膦转化事件 SHZD32-01 的转基因大豆植株的第一个亲本，或是与有耐草甘膦表型的上述植株杂交的后代，与第二个没有草甘膦的耐受性亲本进行有性杂交，产生多个杂交一代植株；用草甘膦处理的方法筛选耐草甘膦的后代植株。这一步骤进一步包括用耐草甘膦的后代植株与第二个或第三个大豆亲本进行回交，用草甘膦进行后代筛选，或使用与该性状相关的分子标记进行筛选获得耐草甘膦的大豆植株。所用的分子标记包括已经鉴定出的事件 SHZD32-01 的转基因插入位点的 5’和 3’的结合区 DNA 分子。

育种方法包括可以用 2 个不同的转化植株进行杂交产生后代包括 2 个独立分离的外源转基因，与一个亲本进行回交，用之前所述方法与非转基因植株进行杂交，无性繁殖，以及在已知文献中叙述的用于不同性状和作物的常用育种方法。

探针是一种分离的核苷酸，附着在常规的检测标记或报告分子上，如放射性同位素，配体，化学荧光剂，或酶。探针与靶核苷酸的一条链互补，本发明的探针是与含转化事件 SHZD32-01 的基因组 DNA 的一条链互补，无论 DNA 来自含有该事件的大豆植株或种子，或样品，或植株或种子的提取物。

本发明的探针不仅包括脱氧核糖核酸，核糖核酸，还包括聚酰胺和其它与靶 DNA 序列特异结合的探针材料用于检测靶 DNA 序列的存在。

引物是分离的多聚核苷酸序列，退火后与互补的靶多聚核苷酸链进行杂交，在引物与靶多聚核苷酸链之间相互结合，而后在多聚酶的作用下沿着靶链进行延长。本发明的引物对用于聚合酶链式反应，或常规的核酸扩增方法进行靶多聚核酸分子的扩增使用。

探针或引物一般是 11 个或更多，18 个或更多，24 或 30 个或更多的多聚核苷酸，在严格的杂交条件控制下，探针和引物与靶核苷酸分子进行特异杂交。本发明的探针与引物与靶分子的序列完全一致，尽管探针不同于靶序列，用常规方法设计探针序列保持它与靶序列在严格条件下有杂交的能力。

探针和引物制备方法参照 Sambrook 等 (1989); Ausubel 等 (1992); 和 Innis 等 (1990)，根据已知序列使用计算机程序进行引物设计(Version 0.5, .COPYRGT. 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.)。

引物和探针是根据这里公布的侧翼序列和插入基因序列而设计(SEQ ID NOS:1-4 and 9)，用来确认和纠正常规方法公布的测序结果，例从含有转化事件 SHZD32-01 的种子分离相关的 DNA 分子，确定核酸分子的序列。另外关于从含有转基因插入和侧翼序列的转化事件 SHZD32-01 的细胞基因组中分离相关的 DNA，这些分子的部分和片段被用作引物或探针。

本发明的核酸探针和引物在严格的条件下与靶 DNA 序列杂交。任何常规的核酸杂交和扩增都能用于鉴定样品中转化事件 SHZD32-01 的特异 DNA 序列的存在。核酸分子或片段在一定的条件下能和其他的核酸分子特异地杂交。如果两个核酸分子能形成反向平行的，双链核苷酸结构，并具有足够的长度在高度严格的条件下保持这一结构，上述两个核酸分子就能特异的和另一个杂交。如果核酸分子显示出完全的互补，就称一个核酸与另一个核酸分子是互补的。当分子的每一个核苷酸与另一个分子都互补，就称这个分子的核苷酸与另一个分子完全互补。如果两个分子杂交足够稳定保持在至少常规低严格条件下退火，称之为微弱互补。同样地，如果分子之间能够在高度严格的条件下杂交足够的稳定保持到退火，就称为互补。Sambrook 等（1989）和 Haymes 等(1985)对常规严格条件有所描述。不是完全互补也是允许的，这并不完全排除分子能够形成双链结构。要使核酸分子作为引物使用，需要有足够的互补序列，才能够在特殊的溶剂和盐的浓度条件下形成稳定的双链结构。

这里所使用的，基本同源序列是核酸序列是在高度严格条件下比较，能特异地与互补的核酸序列杂交。适当严格条件是改进 DNA 杂交条件，如 6 倍的氯化钠/柠檬酸钠 (SSC)在 45℃，随后用 2 倍的 SSC 在 50℃洗涤，在 John Wiley & Sons, N.Y. (1989)的分子生物学流程（Current Protocols in Molecular Biology）6.3.1-6.3.6.有所叙述。如在洗涤步骤中盐的浓度能从低严格条件的大约 2.0 倍 SSC，50℃，到高严格条件的大约 0.2 倍 SSC，50℃。另外，在洗涤步骤中的温度能从地严格条件的室温，大约 22℃，到高严格条件的大约 65℃。温度和盐浓度都可以变化，或者温度，或者盐浓度可以不变而另外一个条件改变。在一个优选实施例中，本发明中的一个核酸和前面给出的 SEQ ID NOS:1-4,和 9 以及互补序列或任意片段的一个或多个核酸分子序列或片段在中度严格条件下杂交，2.0 倍 SSC，65 ℃。在一个特别优选实施例中，本发明的核酸分子与前面给出的 SEQ ID NOS:1-4,和 9 及其互补序列或任意片段中的一个或多个核酸序列在高度严格条件下特异杂交。本发明的一个方面，本发明一个优选的核酸分子标记包含前面提出的核酸序列 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 或者其互补序列或任意一个片段。本发明的另一个方面，本发明一个优选的核酸

标记具有与前面提出的SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2或者其互补序列或两者中任意一个片段80%和100%，或者90%和100%的序列一致性。分子标记的DNA分子包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2或者其互补序列或两者任意一个片段用作植物育种的分子标记鉴定杂交的后代，与Cregan等(1997)所描述的简单序列重复DNA标记分析方法相同。探针和目标DNA的杂交能用已知的任何一种方法实现，这些包括，但不限定于荧光标记，放射性标记，抗体标记和化学发光标记。

关于用特异的扩增引物对靶核酸序列进行扩增（如PCR），“严格反应条件”是指使引物对只与靶核酸序列杂交，一个引物可以与模板DNA结合，在热扩增反应中优先产生独特的扩增产物。

“（与靶序列）特异结合”是指引物和探针在严格杂交条件下只与含有靶序列样品中的靶序列杂交。

“扩增的DNA”或“扩增产物”是指靶序列核酸扩增的产物，是核酸模板的一部分。例如，确定来自有性杂交的大豆植株是否含有转化事件SHZD32-01，或者从田间取到的大豆样本是否含有转化事件SHZD32-01，或者大豆提取物，食品，面粉或油是否含有转化事件SHZD32-01。从大豆植株组织样品或提取物中提取DNA，用一对引物进行核酸扩增，第一个引物来自基因组序列邻近异源转基因DNA插入位点，第二个引物来自于插入的异源转基因DNA序列，经过扩增产生诊断该转化事件的扩增产物。扩增产物具有一定的长度和序列来诊断该转化事件。扩增产物的长度范围从这对引物结合的长度加上一个核苷酸对，或者加上大约50核苷酸碱基对，或者加上大约250个碱基对，或者加上大约350个碱基对，或者更多。

另外，引物可以来自于插入序列两端的旁侧序列，产生的扩增片段包括整个插入的核苷酸序列。引物的位置可以距离插入基因DNA序列有一定的距离，距离为1个到2万个碱基对。“扩增产物”指在DNA热扩增反应下形成的产物。

核酸扩增反应可通过任何一种已知的核酸扩增反应方法完成，包括聚合酶链式反应（PCR）。各种扩增方法的技术已公布并在Innis等(1990)的美国专利号为4,683,195和4,683,202的专利中有所描述。PCR扩增方法已经能够扩增到22kb的基因组DNA和42kb的噬菌体DNA（Cheng等, 1994）。这些方法以及其他已知的PCR扩增方法应用于本发明中。插入的异源DNA序列或大豆转化事件SHZD32-01的侧翼序列可以通过利用这里给出的序列设计引物，通过分子扩增的方法从转化事件中分离出来，用标准的DNA测序方法验证和修正PCR产物或分离的克隆。

利用这里公布的核酸序列和描述或已知的DNA检测方法开发DNA检测试剂盒。试剂盒对于鉴定样品中的大豆转化事件并应用于含有该DNA的大豆育种是非常有价值的。检测该转化事件DNA使用的引物或探针，是与SEQ ID NO.1-4 和 9同源或互补的，或者DNA引物或探针与包含在转基因元件中的DNA同源或互补，这些DNA序列能够作为引物用于DNA扩增反应或作为探针用于DNA杂交方法。大豆基因组中转基因元件的DNA结构如图1所示：中豆32大豆基因组转基因插入侧翼序列的5’端，接下来是终止子（没有T-DNA左边界序列),草甘膦抗性基因G10-EPSPS,拟南芥叶绿体信号肽序列,增强子,启动子,来自土壤农杆菌T-DNA的右臂的一部分,以及相邻的大豆中豆32基因组转基因插入侧序列的3’端。大豆转化事件SHZD32-01中的转基因元件的DNA分子可以作为DNA扩增中的引物分子，这些引物分子能够用作引物系列的部分引物，也包括来自转基因插入侧翼序列的DNA引物分子。大豆转化事件SHZD32-01是由大豆株系中豆32由农杆菌介导法产生的。

本发明具有如下的有益效果：

本发明通过农杆菌介导法将外源抗除草剂转基因插入到大豆（Glycine max）基因组，创造了独特的DNA分子，并公布了该DNA分子的部分序列。本发明的大豆株系含有SHZD32-01转化事件, 表现出很强的草甘膦耐受性，耐草甘膦大豆转化事件的发明将有助于对杂草的控制。转化事件DNA的检测对于鉴定样品中的大豆转化事件并应用于含有该DNA的大豆育种是非常有价值的。

附图说明

图 1 为大豆 SHZD32 中转基因在大豆基因组插入示意图。

保藏生物材料的分类命名为：大豆属栽培大豆种 大豆 SHZD32-01 *Glycine max (L)Merr.*，保存在中国典型培养物保藏中心（China Center for Type Culture Collection, CCTCC）,地址：中国 武汉 武汉大学，保藏日期：2015 年 8 月 18 日，保藏编号为 CCTCC NO:P201513。

具体实施方式

下面为本发明的实施例，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。在不背离本发明基本精神和观点的前提下，在公布的实施例中进行一些改动仍然能够得到相似或相同的结果。

实施例 1

SHZD32-01 基因组特异 DNA 扩增

从大豆转化事件 SHZD32-01 的组织中提取 DNA，包括大豆种子、营养组织或食品。用生工的 DNA 提取试剂盒从组织中分离 DNA，方法见该 DNA 提取试剂盒的说明书。或用 CTAB 法提取 DNA。

从含有大豆转化事件 SHZD32-01 的植株基因组中扩增出的，包括 T-DNA 插入 5’末端的部分基因组侧翼序列的 PCR 扩增产物，该 DNA 产物包含 SEQ ID NO.3。所设计的 PCR 引物一个与转基因插入的 5’末端基因组侧翼序列杂交（DNA 引物 A，SEQ ID NO.5；如 FIG.1），与之配对第二个引物（DNA 引物 B，SEQ ID NO.6）位于转基因终止子区域（见于 SEQ ID NO.9)。

从含有大豆转化事件 SHZD32-01 的植株基因组扩增出的，包括 T-DNA 插入 3’末端的部分基因组侧翼序列的 PCR 扩增产物，该 DNA 产物包含 SEQ ID NO.4。PCR 所用的一个引物设计为与转基因插入 3’端的基因组侧翼序列杂交 (DNA 引物 D, SEQ ID NO.8)，第二个引物 (DNA primer C, SEQ ID NO.7)位于启动子与载体的之间的序列。

事件引物 DNA 用于产生诊断 SHZD32-01 大豆转化事件的扩增产物。这些事件引物包括，但不限定于用于描述 DNA 扩增方法引物 A 和 B(SEQ ID NO.5 和 6)，以及事件引物 C 和 D(SEQ ID NO.7 和 8)。另外任何来自于 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4,或与其互补的这些事件引物，可以分别被用于 DNA 扩增反应产生诊断 SHZD32-01 事件来源的组织的包含 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 的扩增产物使用适合的事件引物能产生 SHZD32-01 的诊断扩增。改变任何反应条件产生诊断转化事件 SHZD32-01 的产物都在常规的技术方法范畴之内。当推断一种提取物含有包含 SHZD32-01 的大豆植株或种子的 DNA，或产品来自含有 SHZD32-01 的植物时，可用之作为模板，用 DNA 扩增方法产生大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增来鉴定 SHZD32-01 是否存在。

使用来自 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 序列的至少一个引物序列产生转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增，使用 PCR 仪（ABI,2720）按照如下步骤进行扩增反应：

DNA 提取：

取新鲜的大豆植株叶片，置于液氮中研磨成粉状。加入 2×CTAB 提取缓液 500 μl，浸透大豆植株的粉末并将离心管颠倒混匀，使植物粉末与 CTAB 充分混匀，于 65℃水浴保温 30～60min，每 10min 轻轻混匀一次。取出离心管，冷却至室温，加入 500μl 经 4℃预冷的氯仿-异戊醇混合液(24:1v/v)，轻缓颠倒混匀，静置 10min。4℃、12000r/min 离心 10min。取上清至另一新离心管中，加等体积事先于-20℃冰箱预冷的异丙醇，稍混匀后于冰箱中沉淀 30 min 以上。4℃，12000 r/min 离心 10 min 后，弃上清后并将离心管倒置于滤纸上，70%的乙醇洗涤沉淀 2 次，并于无菌操作台上吹干水分。；将 DNA 溶解在 50μl TE 缓冲液中，加入 1μl 的 RNaseA (10mg/ml)，37℃温育 15min，-20℃保存；用 Spectrophotometer ND-1000 检测 DNA 浓度，每次上样量为 1.5μl。琼脂糖电泳检测 DNA 浓度：配制 0.8%琼脂糖电泳液，加适量 EB。电

泳条件 U=120V，I=140mA。

需要配置试剂：

CTAB 提取液：2%CTAB，1.4mol/L NaCl，100mmol/L Tris-HCl、pH8.0，20mmol/L EDTA、pH8.0。

CTAB 沉淀液：1% CTAB，50mmol/LTris-HCl、pH8.0，10mmol/L EDTA、pH8.0。

TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA(pH8.0)。

PCR 检测： PCR 反应条件：94℃变性 5 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环，扩增片段为 725bp。

循环结束后 72℃延伸 10 min，然后 4℃保存。取 PCR 扩增产物 10μl，1.2%琼脂糖凝胶电泳检测（含溴化乙锭），电泳 40 min，紫外灯下观察照相。

实施例 2

转基因/基因组序列测定及 Southern 杂交

PCR 产物的 DNA 序列可提供用来设计引物或探针的 DNA 分子，用于鉴定含有转化事件 SHZD32-01 的大豆植株或种子。代表转基因/侧翼序列 5’和 3’的预期片段大小的 PCR 产物通过 2.0%的琼脂糖凝胶电泳被分离出来。被分离出来的 PCR 产物含有 5’和 3’端的横跨转基因插入到基因组之间的插入结合区域。大豆转化事件 SHZD32-01 的 5’和 3’端的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳被纯化，按照 DNA 胶回收试剂盒（SK8131）操作，将 DNA 序列与琼脂糖基质分离出来。将 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接起来，送测序公司测序。

DNA 序列测定得到的核酸序列代表事件 SHZD32-01 转基因/基因组区域的核苷酸测序，见图 1。鉴定结果见 SEQ ID NO.9。SEQ ID NO.9 中包含的基因组和转基因元件描述，见下表 1。5’和 3’端的侧翼序列包括于 SEQ ID NO.9 中，并在 SEQ ID NO.21 和 SEQ ID NO.22 列出。

结合序列是相对较短的核苷酸分子，是新的核酸分子，当进行多核苷酸分子检测时能够作为转化事件 SHZD32-01 的诊断分子。在结合部位的 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 代表 SHZD32-01 一个插入位点中转基因片段和基因组 DNA 每一方面 10 多聚核苷酸。较长或较短的多核苷酸结合序列从 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 中选择出来，接合分子(5’结合区 SEQ ID NO.1 和 3’结合区 SEQ ID NO.2)在 DNA 检测方法中作为 DNA 探针或 DNA 引物分子是十分有用的。检测转化事件的引物和探针专门用于大豆转化事件 SHZD32-01 的检测。引物分子被指定为 SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.14，SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.16，SEQ ID NO.17，探针分子被指定为 SEQ ID NO.12，SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11。另外用于从大豆食品中产生扩增产物的片段还包括 SEQ ID NO.18-20。

表 1 含有 SHZH32-01 大豆基因组 转基因/基因组片段（SEQ ID NO. 9）的基因组和遗传元件

基因元件的位置	序列	功能
插入基因的 5’末端侧翼序列	1-834	大豆基因组 DNA
5’端结合区	824-844	跨域转基因插入的 DNA 区域
CaMVplyA 终止子	841-1024	来源于花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 终止子序列
G10-EPSPS	1030-2379	来源于耐辐射球菌(Deinococcus radiodurans R1) 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶编码序列
信号肽	2586-2380	来自拟南芥的叶绿体信号肽
增强子	2742-2587	来源于烟草花叶病毒，增强子

启动子	3493-2724	来源于花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子
LacZalpha	3986-3752	多克隆位点
3’端结合区	3994-4014	横跨插入位点及大豆基因组
插入基因的 3’末端侧翼序列	4005-4727	大豆基因组 DNA

Southern Blot 分析

含有 SHZD32-01 的植物基因组 DNA 和对照大豆基因组 DNA(每个大约 15mug)被各种限制性酶消化(140U)在 150ul 的总体积包含 15ul 的 buffer (NEB, Beverly, Mass.).限制性核酸内切酶,如,BamHⅠ, PstⅠ, HindⅢ,和 XbaⅠ用于 SHZD32-01 的 Southern 分析。核酸内切酶在适当的温度下消化至少 6 小时。孵育后,DNA 用 3M 醋酸钠和 2.5 体积的乙醇沉淀。接下来 DNA 用 70%的乙醇洗涤,干燥并重新悬浮在 40mul 的 TBE 中。在样品中加入 Loading buffer(0.2 倍),然后在琼脂糖凝胶(0.8%)上 30 瓦电泳 16-18 小时。凝胶被溴化乙锭染色,用去嘌呤溶液处理 (0.125N HCL)10 分钟,用变性溶液处理,(0.5M 氢氧化钠,1.5M 氯化钠)30 分钟,最后用中和溶液(0.5M Trizma base,1.5M 氯化钠)处理 30 分钟。DNA 被转到杂交-N 膜上(Amersham Pharmacia Biotech, Buckingamshire, England)用吸水纸(Schleicher and Schuell, Dassel, Germany)吸 4-6 小时然后用紫外光照固定到膜上。

膜用 20ml 的 DIG Easy Hyb 溶液预杂交在 45℃下 2-4 hours。带有标记的 DNA 探针与 SEQ ID NO.1,或 SEQ ID NO.2,或 SEQ ID NO.3,或 SEQ ID NO.4,或其他序列的一部分同源或互补,没有结合的核酸被去掉。用 10ml 预热的 DIG Easy Hyb,含有变性探针的溶液代替预杂交液。印记在 45℃杂交 16-18 小时。

印记在低严格溶液(5.times.SSC, 0.1.times.SDS)在 45℃下被洗掉,再次重复用较高的严格溶液在 65℃下重复洗涤(0.1.times.SSC, 0.1% SDS)。印记曝光。这些例证了的方法和条件在检测样品中 DNA 的时可以适当改变。

实施例 3

杂草控制

用含有 SHZD32-01 的大豆在田间控制杂草的生长。田间种植含有 SHZD32-01 的大豆种子,种子萌发成为植株,用配方含有草甘膦的除草剂处理田间的植株。草甘膦配方的有效剂量以大约 0.25 lb ae/A (草甘膦酸平衡的含量,磅/坳) 到 3 或更高的剂量用于田间。应用范围从约 0.75 lb ae/A 到 1.5 lb ae/A 在生育季根据需要在田间处理一次或多次控制杂草的生长。从草甘膦处理的植株上收获含有 SHZD32-01 的种子。

上述公开并在权利要求书中引证的上海交通大学保藏的代表 SHZD32-01 的大豆种子保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),中国湖北省武汉市武汉大学校内,邮政编码 430072,该保藏生物材料的分类命名为:大豆属栽培大豆种 大豆 SHZD32-01 *Glycine max (L)Merr.* ,保藏编号为 CCTCC NO:P201513,保藏日期为 2015 年 8 月 18 日,保存期为三十年(自保藏中心收到之日起计算),期满前收到提供培养物样品的请求后再延续保存五年。

以上所述本发明的原理,技术熟练人员能够显而易见地在不偏离这些原则的前提下在程序安排和细节上加以改变。我们的权利要求包括在不偏离本发明权利要求的范围和精神的所有改变。

序列表

SEQ ID NO.1
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 TGCATTTTAACGAATTAATT

SEQ ID NO.2
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 GTTTCCCGCCATAAGGGTGT

SEQ ID NO.3
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 3
<211> 1054
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1
TGCCATCATCAATGGTCACACGGAGTGGGACTACAGAATTTGAAAATAGTAGAGAAAACAGCAGTGGGCACTTGCTATTTTCCTTTCATCA
TTGGAAATTAAATGGGGAAAGGGAAAAAAATATTTCTGTTTTCTACAATGAATGACAATAATAGGAGATTTGGTTTTCGTAGAATCAGAAT

TATTCAAAAAAAGAAAAACAGAATTCCATTGAACGAATTCCCTGCACTTTTGTTGATACTAAGGGTATATCTCTCTCTTGATATTGGGAGA
TTATTTCCTCCATAGAGTACAATTTTTTTTTTTTTTTACTTTTTTCAAGTTTCAACAAGTTTTTACAGTAAATACATAGAAATTTAATTAT
TTTCAAAATTGGATAAAACGCCTTCATTTATAGAGAATTTTCTCTCTCCCTGTGTATTTATTTCTTATAACTTGAAGCTTCTTTGGAATGC
TGCTTTATCTTTTAAAACAGCTTGTTTTAAGGTTAACATTAACTAAATTCCCTATCATCTACTTACTTTGCCGGCCGACTAGTTATAAAAG
AATTAGATGATTCATTGCCTCAACCTATTAGGGTTTTCCCGATGAAGGATTAAATTAGACATAATTAGGTGCATGAAGGCTTAAGTTTGAT
CTTCCTTATTATTATTGTATTAAAAAAAAAGCAAATTACACTAACTCTCTATGTTTAATACTTGTTACACTCAAAGTCACTCATTATTGGA
ACCCTACACATCCCCTTCCCCCTTCGCTGTTGCAACTCATTGCACAAAGACCCCCTAACCGTCTATTTCATTAACTTTAGGATGTTGCTAA
GCACATGCATTTTAACGAATTAATTCGGGGGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTAT
TTTACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTCTTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCCTATAGGAACCCTAATTCCCTTATCTGGGAACT
ACTCACACATTATTATGGAGAAACTCGAGCTCCTATAGGCGGTAGCCTCAGCG

SEQ ID NO.4

<110> 上海交通大学

<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 4

<211> 820

<212> DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<400> 1

1

GAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTT
CCCGCCATAAGGGTGTATACTATAGTTAGTTGTATATGGCTAGTACTATGGCGGCGGTTCCGACCACCACGAGACCGTAGTACAACATGGG
CATGCTGTTGCTCTTGGTTGATGGAGAGGAGGGTGGAGGAGGGGATGAGATGGTGAAGGGGCTTAGAACATCACCCATGATGGTTATAATT
TAGTGTTTTGGTGAAATTCGAAGAGAGAACACAAGTTTTGAAGAAAGTTCTTTTGTAGACAACTAACTATAGTATACACCCTTATGGCCTT
ATCTATTCAATGAGGGTTATAATTTAGATGATGGAATTATTGGAGGGGGTTTATTGATTTATTTTTATTGAAAATATTAAATTAATGTTAA
GTAGTTAAGCTAAAAGCCGTGGTGGTTATGTTATCATTGAAGGGGAGAATATAATTATTTTTTGCTCAAGTTGGATATAATATGTCATGGA
ATATTTACTATTTTAGAGAAGACTAAGAGGAGCAGACAAAGAAATGTACTATAAAGGGGGCAGTGAACAAAGATGGGTGAGAGTGACCAGA
ATTTTGTAGATAAGTGTCCTGTGTCCCTTGCACGTTCTATTTCTTTCTTTGCCTGGGGTTTTGGGAAGCCCCTATGGTTAAATGCTAAAAA
ACAATTTTTTGTATCTATTCGGAAATCAAATTTGCTTCTATTCATCACAGGTAAAGAGACATGTGATTTACTAAGATGTCATTCATAAATC
C

SEQ ID NO.5

<110> 上海交通大学

<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 5

<211> 22
<212> DNA
<213> ORGANISM: Glycince max
<400> 1
1 TGCCATCATCAATGGTCACACG

SEQ ID NO.6
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> ORGANISM:耐辐射球菌(Deinococcus radiodurans R1)
<400> 1
1 CGCTGAGGCTACCGCCTATAGGAGC

SEQ ID NO.7
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> ORGANISM: 大肠杆菌LacZalpha多克隆位点
<400> 1
1 GAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT

SEQ ID NO.8
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> ORGANISM: Glycince max

<400> 1

1 GGATTTATGAATGACATCTTAG

SEQ ID NO.9

<110> 上海交通大学大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 9

<211> 4727

<212> DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<400> 1

1

TGCCATCATCAATGGTCACACGGAGTGGGACTACAGAATTTGAAAATAGTAGAGAAAACAGCAGTGGGCACTTGCTATTTTCCTTTCATCA
TTGGAAATTAAATGGGGAAAGGGAAAAAAATATTTCTGTTTTCTACAATGAATGACAATAATAGGAGATTTGGTTTTCGTAGAATCAGAAT
TATTCAAAAAAAGAAAAACAGAATTCCATTGAACGAATTCCCTGCACTTTTGTTGATACTAAGGGTATATCTCTCTCTTGATATTGGGAGA
TTATTTCCTCCATAGAGTACAATTTTTTTTTTTTTTTACTTTTTTCAAGTTTCAACAAGTTTTTACAGTAAATACATAGAAATTTAATTAT
TTTCAAAATTGGATAAAACGCCTTCATTTATAGAGAATTTTCTCTCTCCCTGTGTATTTATTTCTTATAACTTGAAGCTTCTTTGGAATGC
TGCTTTATCTTTTAAAACAGCTTGTTTTAAGGTTAACATTAACTAAATTCCCTATCATCTACTTACTTTGCCGGCCGACTAGTTATAAAAG
AATTAGATGATTCATTGCCTCAACCTATTAGGGTTTTCCCGATGAAGGATTAAATTAGACATAATTAGGTGCATGAAGGCTTAAGTTTGAT
CTTCCTTATTATTATTGTATTAAAAAAAAAGCAAATTACACTAACTCTCTATGTTTAATACTTGTTACACTCAAAGTCACTCATTATTGGA
ACCCTACACATCCCCTTCCCCCTTCGCTGTTGCAACTCATTGCACAAAGACCCCCTAACCGTCTATTTCATTAACTTTAGGATGTTGCTAA
GCACATGCATTTTAACGAATTAATTCGGGGGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAAATTTTATTGATAGAAGTAT
TTTACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTCTTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCCTATAGGAACCCTAATTCCCTTATCTGGGAACT
ACTCACACATTATTATGGAGAAACTCGAGCTCCTATAGGCGGTAGCCTCAGCGTATTCGAATCTAGCACCAAGAGCTTCAAGGTGAGCGAA
GAACTGAGGGTAGGACTTTCTGATGTGGTGTGCACCGGTGATTCTAAGTGGAGCATCTGCTCTGAGACCAAGAAGGGTGAGAAGCATGATC
ATTCTGTGGTCACCGTGACCATCAGCGGTGATACCACCAGCAAGGTGAGCAGAACCAGTAACGGAGAGAGAATCGGCGGTCTCTCTTGCTC
TAAGACCAAGTCTTTCAAGCTCAGCTCTGGTGTCAGAGATTCTATCGCATTCCTTGAGTCTAAGAGTAGCAACGTTTTCCCAGGTGGTATC
ACCCTCAGCGAAGGCAGCAGCAGCGGTAAGAGCTTGCACGGCGTCGGTGAAGGAATCACCATCTCTAGTAACAGCGTGGAGAGGTCTACCA
CCTCTCACGGTAAGGGTATCACCTTCTCTAACGATATCAGCACCCATCTCTCTAAGAACGTTCACAGCTTCCTTCTCACCCTGGAGGTCGT
GTTCTCTAAGGTTAGAAAGTCTAACCTCACCTGGGAGAAGAGCAGCGGCGGTAAGGATAGCAGCGGAACCAGGGTAATCACCAGGAACGAG
CACTCTACCTGGTCTGTACTTCTGACCACCAGGGATGGAGATTCTTCTAAGGTCATCGGAGGCAGTAGCTCTAACACCGAAATCAGAGAGG
GTGTCAAGTGTCTGTCTAAGAGGAGCGTGGGACTTGATATCACCGGTGAGTCTAAGTTCGAGTCCGTCAGGAAGAAGAGGACCGAGGAACA
TAAGGGCGGAAGCGTACTGGGAGGATCTTTCGGCGGAAACCTCCACTGTACCACCTCTAACTGGACCGGAAACGGAGATAGGGAGTCTACC
ATCGTTGGAGGACACCCAAGCACCAAGTCTTTCGAGGGCTTCAAGAAGGTCACCCTGAGGTCTCTTACCAAGGGAATCAGGGTAATCGGTA
ACGAAAGTTGTACCAGAGGTGAGAGCAGCAACACCCATAAGGAGTCTGGCCACCGCAGCAGCGTTACCTGGGTTAAGGGTAACACCAGCCT
GTGGTCTAGCACCGAAACCTCTGATCACGGCGTCATCACCAACAAGCTCAACACCAGCACCCCAATCTCTGAGGCATCTGAGCATAGCTTC
GGCATCCTCAGAGGTAGCCACACCAACAACTCTGGTTTCACCCTCAGCGAGAGCAGCGGCGAGGAGGTATCTAGTGGTGTAGTTCTTGGAT
GGCTGTGCTCTAAGTTCACCTCTGAGTTCTCTAGCTGGATGCACGATAACGTCGAAGGTAGCTGGAAGAGCGTCGGATCCCTTCTCCGCCG

TGGAAACAGAAGACATGACCTTAAGAGGACGAAGCTCAGAGCCAATTAAAGTCATCCCACTCTTCTTCAATCCCCAAGATGAAGAAATTGG
ATAAGCTCGTGGATGCTGCTGAGTCTTCAGAGAAACCGATAAGGGAGATTTCCTTTGACTGGATTTAGAGAGATTGGAGATAAGAGATGGG
TTCTGCACACCATTGCAGATTCTGCTAACTTGAGCCATGGCTATCGTTCGTAAATGGTGAAAATTTTCAGAAAATTGCTTTTGCTTTAAAA
GAAATGATTTAAATTGCTGCAATAGAAGTAGAATGCTTGATTGCTTGAGATTCGTTTGTTTTGTATATGTTGTGTTGACTCGAGAGAGATA
GATTTGTAGAGAGAGACTGGTGATTTCAGCGTGTCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGTCTTGCGAAGGATAGTGG
GATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATATCACATCAATCCACTTGCTTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGC
TCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCTTTGGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTTGAACGATAGCCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCATTTGTA
GGTGCCACCTTCCTTTTCTACTGTCCTTTTGATGAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGT
TGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGTCGTGCTCCACCATGTTATCAC
ATCAATCCACTTGCTTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCTTTGGGACCACTGTC
GGCAGAGGCATCTTGAACGATAGCCTTTCCTTTATCGCAATGATGGCATTTGTAGGTGCCACCTTCCTTTTCTACTGTCCTTTTGATGAAG
TGACAGATAGCTGGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGTTGAAAAGTCTCAATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTG
TATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGTCGTGCTCCACCATGTTGGCAAGCTGCTCTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCG
CGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCA
CTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAG
CTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTT
ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCC
ATAAGGGTGTATACTATAGTTAGTTGTATATGGCTAGTACTATGGCGGCGGTTCCGACCACCACGAGACCGTAGTACAACATGGGCATGCT
GTTGCTCTTGGTTGATGGAGAGGAGGGTGGAGGAGGGGATGAGATGGTGAAGGGGCTTAGAACATCACCCATGATGGTTATAATTTAGTGT
TTTGGTGAAATTCGAAGAGAGAACACAAGTTTTGAAGAAAGTTCTTTTGTAGACAACTAACTATAGTATACACCCTTATGGCCTTATCTAT
TCAATGAGGGTTATAATTTAGATGATGGAATTATTGGAGGGGGTTTATTGATTTATTTTTATTGAAAATATTAAATTAATGTTAAGTAGTT
AAGCTAAAAGCCGTGGTGGTTATGTTATCATTGAAGGGGAGAATATAATTATTTTTTGCTCAAGTTGGATATAATATGTCATGGAATATTT
ACTATTTTAGAGAAGACTAAGAGGAGCAGACAAAGAAATGTACTATAAAGGGGGCAGTGAACAAAGATGGGTGAGAGTGACCAGAATTTTG
TAGATAAGTGTCCTGTGTCCCTTGCACGTTCTATTTCTTTCTTTGCCTGGGGTTTTGGGAAGCCCCTATGGTTAAATGCTAAAAAACAATT
TTTTGTATCTATTCGGAAATCAAATTTGCTTCTATTCATCACAGGTAAAGAGACATGTGATTTACTAAGATGTCATTCATAAATCC

SEQ ID NO.10

<110> 上海交通大学

<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<400> 1

1 CTTTGCCGGCCGACTAGTTA

SEQ ID NO.11
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 11
<211> 21
<212> DNAORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 ACTAAAATCCAGATCCCCCGA

SEQ ID NO.12
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 AGCTTGGATCAGATTGTCGT

SEQ ID NO.13
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 TGGGTGATGTTCTAAGCCCC

SEQ ID NO.14
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 TGTTGCTAAGCACATGCATTTTA

SEQ ID NO.15
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 ACACCAGAGCTGAGCTTGAA

SEQ ID NO.16
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 TGCCCATGTTGTACTACGGTC

SEQ ID NO.17
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 17

<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 GTCGTGACTGGGAAAACCCT

SEQ ID NO.18
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 TTAACTTTAGGATGTTGCTA

SEQ ID NO.19
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<400> 1
1 ACCCTTAGTATGTATTTGT

SEQ ID NO.20
<110> 上海交通大学
<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法
<160> 86
<170> PatentIn version 2.1
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<400> 1

1 TGGATTTTAGTACTGGATTTTGGT

SEQ ID NO.21

<110> 上海交通大学

<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 21

<211> 834

<212> DNA

<213> ORGANISM: Glycince max

<400> 1

1

TGCCATCATCAATGGTCACACGGAGTGGGACTACAGAATTTGAAAATAGTAGAGAAAACAGCAGTGGGCACTTGCTATTTTCCTTTCATCA
TTGGAAATTAAATGGGGAAAGGGAAAAAAATATTTCTGTTTTCTACAATGAATGACAATAATAGGAGATTTGGTTTTCGTAGAATCAGAAT
TATTCAAAAAAAGAAAAACAGAATTCCATTGAACGAATTCCCTGCACTTTTGTTGATACTAAGGGTATATCTCTCTCTTGATATTGGGAGA
TTATTTCCTCCATAGAGTACAATTTTTTTTTTTTTTTACTTTTTTCAAGTTTCAACAAGTTTTTACAGTAAATACATAGAAATTTAATTAT
TTTCAAAATTGGATAAAACGCCTTCATTTATAGAGAATTTTCTCTCTCCCTGTGTATTTATTTCTTATAACTTGAAGCTTCTTTGGAATGC
TGCTTTATCTTTTAAAACAGCTTGTTTTAAGGTTAACATTAACTAAATTCCCTATCATCTACTTACTTTGCCGGCCGACTAGTTATAAAAG
AATTAGATGATTCATTGCCTCAACCTATTAGGGTTTTCCCGATGAAGGATTAAATTAGACATAATTAGGTGCATGAAGGCTTAAGTTTGAT
CTTCCTTATTATTATTGTATTAAAAAAAAAGCAAATTACACTAACTCTCTATGTTTAATACTTGTTACACTCAAAGTCACTCATTATTGGA
ACCCTACACATCCCCTTCCCCCTTCGCTGTTGCAACTCATTGCACAAAGACCCCCTAACCGTCTATTTCATTAACTTTAGGATGTTGCTAA
GCACATGCATTTTAA

SEQ ID NO.22

<110> 上海交通大学

<120> 大豆转化事件SHZD32-01及其检测方法

<160> 86

<170> PatentIn version 2.1

<210> 22

<211> 723

<212> DNA

<213> ORGANISM: Glycince max

<400> 1

1

ATAAGGGTGTATACTATAGTTAGTTGTATATGGCTAGTACTATGGCGGCGGTTCCGACCACCACGAGACCGTAGTACAACATGGGCATGCT
GTTGCTCTTGGTTGATGGAGAGGAGGGTGGAGGAGGGGATGAGATGGTGAAGGGGCTTAGAACATCACCCATGATGGTTATAATTTAGTGT
TTTGGTGAAATTCGAAGAGAGAACACAAGTTTTGAAGAAAGTTCTTTTGTAGACAACTAACTATAGTATACACCCTTATGGCCTTATCTAT

TCAATGAGGGTTATAATTTAGATGATGGAATTATTGGAGGGGGTTTATTGATTTATTTTTATTGAAAATATTAAATTAATGTTAAGTAGTT
AAGCTAAAAGCCGTGGTGGTTATGTTATCATTGAAGGGGAGAATATAATTATTTTTTGCTCAAGTTGGATATAATATGTCATGGAATATTT
ACTATTTTAGAGAAGACTAAGAGGAGCAGACAAAGAAATGTACTATAAAGGGGGCAGTGAACAAAGATGGGTGAGAGTGACCAGAATTTTG
TAGATAAGTGTCCTGTGTCCCTTGCACGTTCTATTTCTTTCTTTGCCTGGGGTTTTGGGAAGCCCCTATGGTTAAATGCTAAAAAACAATT
TTTTGTATCTATTCGGAAATCAAATTTGCTTCTATTCATCACAGGTAAAGAGACATGTGATTTACTAAGATGTCATTCATAAATCC

权 利 要 求

1. 一种含有大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株或其部分，其特征在于，大豆植株或其部分包含大豆转化事件 SHZD32-01，其有代表性的种子保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO:P201513。
2. 一种权利要求 1 所述的大豆植株的种子，其特征在于，所述的种子含有所述大豆转化事件 SHZD32-01。
3. 一种由权利要求 2 所述的种子生产的大豆商品产品，其特征在于，所述商品产品包含所述大豆转化事件 SHZD32-01。
4. 根据权利要求 3 所述的大豆商品产品，其特征在于，所述商品产品进一步定义为食品、面粉、豆粕或油。
5. 根据权利要求 1 所述的大豆植株部分，其特征在于，进一步定义为细胞、花粉、胚珠、花、芽、根或叶片。
6. 根据权利要求 1 所述的大豆植株，其特征在于，进一步定义为包含所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株的任何世代的后代植株，该后代植株包含所述大豆转化事件 SHZD32-01。
7. 一种大豆转化事件 SHZD32-01 包含大豆植株或其部分，其特征在于，大豆植株或其部分能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增。
8. 根据权利要求 7 所述的大豆植株，其特征在于，所述诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
9. 一种大豆转化事件 SHZD32-01 包含种子，其特征在于，所述的种子能够产生所述大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增。
10. 根据权利要求 9 所述的种子，其特征在于，所述的大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增包括 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
11. 根据权利要求 4 所述的大豆商品产品：食品、面粉、豆粕或油，其特征在于，所述的食品、面粉、豆粕或油进一步定义为含有能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 诊断扩增的核酸，当使用 DNA 扩增方法进行检测时，上述诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
12. 一种产生耐草甘膦除草剂大豆的方法，其特征在于，包含将所述大豆转化事件 SHZD32-01 引入大豆基因组。
13. 根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，包含下列步骤：（a）用第一种包含所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株与第二种不含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株进行杂交产生后代植株；和（b）筛选至少一个第一种含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 并耐草甘膦的后代植株。
14. 根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，进一步包含，通过所述第一种含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 并耐草甘膦的后代植株自交，产生第二代后代植株，并选择至少一个含有所述大豆转化事件 SHZD32-01 的第一种植株的纯合体植株。
15. 一种具有草甘膦耐受性大豆植株、种子或其含有 DNA 的包括草甘膦抗性蛋白 G10-EPSPS 和能够产生大豆转化事件 SHZD32-01 诊断扩增的部分。
16. 根据权利要求 15 所述的具有耐草甘膦耐受性大豆植株、种子或其含有 DNA 的部分，其特征在于，所述的大豆转化事件 SHZD32-01 的诊断扩增包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
17. 一种产生大豆商品产品的方法，其特征在于，包括：（a）获得权利要求 1 所述的大豆植株或部分；和（b）从所述大豆植株或其部分生产所述大豆商品产品。
18. 根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的商品产品被定义为食品、面粉、碎屑、分离蛋白或

油。

19. 一种在田间控制杂草的大豆种植方法，其特征在于，使用权利要求 1 所述的包含大豆转化事件 SHZD32-01 的大豆植株，所述方法包括在田间使用一定剂量的草甘膦以有效地控制杂草的生长，所述大豆表现出耐草甘膦特性。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，在大豆生长阶段从 V1 到 R4 期进行田间处理。

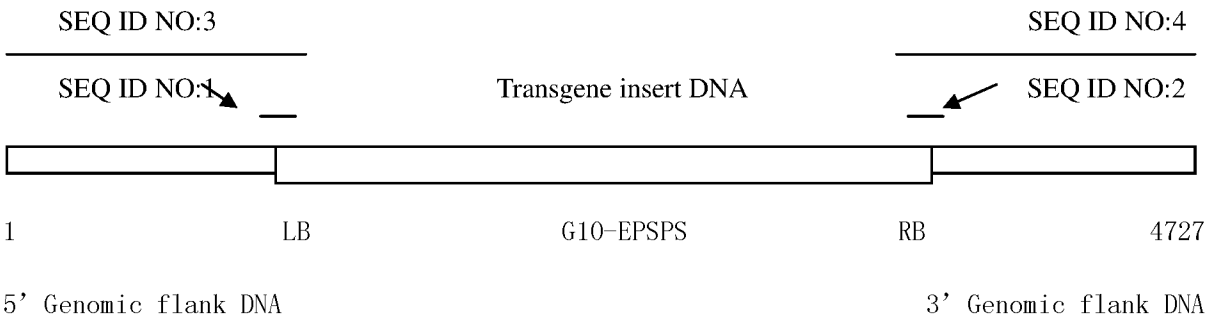

SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:4
SEQ ID NO:1
Transgene insert DNA
SEQ ID NO:2
1
LB
G10-EPSPS
RB
4727
5’ Genomic flank DNA
3’ Genomic flank DNA

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/101416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 5/00 (2006.01) i; C12N 15/09 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, google, EMBL +GenBank+ddbj, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT

Key Words: toleration, herbicide, convert, 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, Glycince, SHZD32, soybean, glyphosate, resistance, N-phosphonomethylglycine, acid equivalent, ae, acre, EPSPS, searching on SEQ ID NOs. 1-22

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105219767 A (SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY), 06 January 2016 (06.01.2016), see the whole document	1-20
PX	ZHANG, Jiajin et al., "Study on Herbicide-Resistance and Survival Competitiveness in Cultivated Land of Transgenic Glyphosate-Resistant Soybean", JOURNAL OF SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY (AGRICULTURAL SCIENCE), number 5, 21 July 2016 (21.07.2016), see the whole document	1-20
X	CN 101252831 A (MONSANTO TECHNOLOGY, LLC), 27 August 2008 (27.08.2008), see abstract, claims 1-25, description, embodiment 3, table 3, and figure 1	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 December 2016 (05.12.2016)	**27 December 2016 (27.12.2016)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **LUO, Xiao** Telephone No.: (86-10) **62089158**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/101416

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105219767 A	06 January 2016	None	
CN 101252831 A	27 August 2008	AP 2693 A	16 July 2013
		AR 053496 A1	09 May 2007
		AR 053497 A1	09 May 2007
		AR 054052 A1	30 May 2007
		AR 085663 A2	16 October 2013
		AU 2006252680 A1	07 December 2006
		AU 2006252801 A1	07 December 2006
		AU 2011201461 A1	21 April 2011
		BRPI 0610051 A2	25 May 2010
		BRPI 0610088 A2	09 December 2008
		BRPI 0610654 A2	13 July 2010
		CA 2609418 A1	07 December 2006
		CA 2609777 A1	07 December 2006
		CA 2609854 A1	30 November 2006
		CN 101253268 A	27 August 2008
		CN 101316513 A	03 December 2008
		CN 104328085 A	04 February 2015
		EP 1883303 A2	06 February 2008
		EP 1885176 A2	13 February 2008
		EP 1885861 A2	13 February 2008
		EP 2275561 A1	09 January 2011
		EP 2975129 A1	20 January 2016
		JP 2008545413 A	18 December 2008
		JP 2015006192 A	15 January 2015
		KR 20080050548 A	09 June 2008
		MX 2007014970 A	15 February 2008
		MX 2007014971 A	12 February 2008
		MX 2007014972 A	15 February 2008
		NZ 563718 A	30 July 2010
		RU 2007149328 A	10 July 2009
		SG 179442 A1	27 April 2012
		UA 94582 C2	25 May 2011
		US 2006288447 A1	21 December 2006
		US 2006282915 A1	14 December 2006
		US 2010099859 A1	22 April 2010
		US 2010100980 A1	22 April 2010
		US 2012070839 A1	22 March 2012
		US 2006282911 A1	14 December 2006
		US 2014259221 A1	11 September 2014
		US 2015113686 A1	23 April 2015
		UY 29570 A1	29 December 2006
		WO 2006128095 A2	30 November 2006
		WO 2006130436 A2	07 December 2006
		WO 2006130494 A2	07 December 2006
		ZA 200710175 B	29 October 2008
		ZA 200710177 B	29 October 2008

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/101416

A. 主题的分类

A01H 5/00(2006.01)i；C12N 15/09(2006.01)i；C12Q 1/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A01H C12N C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：CNABS，CNKI，DWPI，SIPOABS，CNTXT，WOTXT，USTXT，EPTXT，ISI Web of Knowledge，google，EMBL+GenBank+ddbj,中国专利生物序列检索系统； 关键词：大豆，草甘膦，抗性，耐受性，除草剂，转化，5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶，Glycince，SHZD32，soybean，glyphosate，resistance，N-phosphonomethylglycine，acid equivalent，ae，acre，EPSPS，对SEQ ID NO.1-22进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 105219767 A (上海交通大学) 2016年 1月 6日 (2016-01-06) 参见全文	1-20
PX	张家进 等. "抗草甘膦转基因大豆的抗性及栽培地生存竞争能力研究" 上海交通大学学报（农业科学版），第5期，2016年 7月 21日 (2016-07-21)， 参见全文	1-20
X	CN 101252831 A (孟山都技术有限公司) 2008年 8月 27日 (2008-08-27) 参见摘要，权利要求1-25，说明书实施例3，表3和说明书附图1	1-20

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 12月 5日	2016年 12月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 罗霄 电话号码 (86-10)62089158

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/101416

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105219767	A	2016年 1月 6日	无			
CN	101252831	A	2008年 8月 27日	AP	2693	A	2013年 7月 16日
				AR	053496	A1	2007年 5月 9日
				AR	053497	A1	2007年 5月 9日
				AR	054052	A1	2007年 5月 30日
				AR	085663	A2	2013年 10月 16日
				AU	2006252680	A1	2006年 12月 7日
				AU	2006252801	A1	2006年 12月 7日
				AU	2011201461	A1	2011年 4月 21日
				BRPI	0610051	A2	2010年 5月 25日
				BRPI	0610088	A2	2008年 12月 9日
				BRPI	0610654	A2	2010年 7月 13日
				CA	2609418	A1	2006年 12月 7日
				CA	2609777	A1	2006年 12月 7日
				CA	2609854	A1	2006年 11月 30日
				CN	101253268	A	2008年 8月 27日
				CN	101316513	A	2008年 12月 3日
				CN	104328085	A	2015年 2月 4日
				EP	1883303	A2	2008年 2月 6日
				EP	1885176	A2	2008年 2月 13日
				EP	1885861	A2	2008年 2月 13日
				EP	2275561	A1	2011年 1月 9日
				EP	2975129	A1	2016年 1月 20日
				JP	2008545413	A	2008年 12月 18日
				JP	2015006192	A	2015年 1月 15日
				KR	20080050548	A	2008年 6月 9日
				MX	2007014970	A	2008年 2月 15日
				MX	2007014971	A	2008年 2月 12日
				MX	2007014972	A	2008年 2月 15日
				NZ	563718	A	2010年 7月 30日
				RU	2007149328	A	2009年 7月 10日
				SG	179442	A1	2012年 4月 27日
				UA	94582	C2	2011年 5月 25日
				US	2006288447	A1	2006年 12月 21日
				US	2006282915	A1	2006年 12月 14日
				US	2010099859	A1	2010年 4月 22日
				US	2010100980	A1	2010年 4月 22日
				US	2012070839	A1	2012年 3月 22日
				US	2006282911	A1	2006年 12月 14日
				US	2014259221	A1	2014年 9月 11日
				US	2015113686	A1	2015年 4月 23日
				UY	29570	A1	2006年 12月 29日
				WO	2006128095	A2	2006年 11月 30日
				WO	2006130436	A2	2006年 12月 7日
				WO	2006130494	A2	2006年 12月 7日
				ZA	200710175	B	2008年 10月 29日
				ZA	200710177	B	2008年 10月 29日