



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106399482 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 27

(21) 申请号 201610791107.1

专利权人 MS技术有限责任公司

(22) 申请日 2010.11.23

(72) 发明人 J·T·梅森 L·J·莱托

(65) 同一申请的已公布的文献号

M·A·艾比 W·H·艾比

申请公布号 CN 106399482 A

G·威尔兹 S·维尔哈格

(43) 申请公布日 2017.02.15

M·德伯克利尔 V·哈贝克斯

J-M·菲卢洛

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

09014565.7 2009.11.23 EP

有限公司 11038

61/263,707 2009.11.23 US

代理人 傅宇昌

61/367,251 2010.07.23 US

(62) 分案原申请数据

(51) Int.Cl.

201080061916.8 2010.11.23

C12Q 1/6895 (2018.01)

(83) 生物保藏信息

(56) 对比文件

NCIMB 41658 2009.10.12

CN 101151373 A,2008.03.26

NCIMB 41659 2009.10.12

CN 101155933 A,2008.04.02

NCIMB 41660 2009.10.12

WO 2009102873 A1,2009.08.20

PTA-11041 2010.06.11

CN 101238217 A,2008.08.06

PTA-11042 2010.06.11

审查员 武雪梅

(73) 专利权人 拜尔作物科学股份有限公司

权利要求书2页 说明书70页

地址 比利时迪海姆

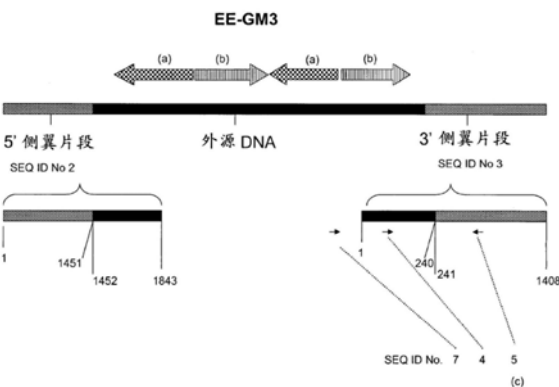
序列表22页 附图6页

(54) 发明名称

耐除草剂大豆植物及鉴定其的方法

(57) 摘要

本发明提供了特定的转基因大豆植物、植物材料和种子,其特征在于此类产物在大豆基因组的特定位置上具有一堆特定的转化事件。还提供了使得能够在生物样品中快速且明确地鉴定此类事件的工具。



1. 用于制备包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆细胞的方法,其中所述原种事件EE-GM3包含在以保藏号NCIMB 41659保藏于NCIMB的参照种子中,且所述原种事件EE-GM2包含在以保藏号NCIMB 41660保藏于NCIMB的参照种子中,并且其中所述原种事件EE-GM3是携带包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的人工基因座,且所述原种事件EE-GM2是携带包含一个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座。

2. 用于制备大豆植物细胞的方法,其在其基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含SEQ ID No.20的核苷酸序列或其互补序列,以及在其基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列,所述EE-GM2是携带包含1个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座,且所述EE-GM2的核苷酸序列包含在SEQ ID No.14或15中所包含的在所述外源DNA侧翼的DNA序列,以及在以保藏号NCIMB 41660保藏的包含EE-GM2的参考种子的植物基因组中的在SEQ ID No.14的序列与SEQ ID No.15的序列之间的外源DNA序列。

3. 包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆种子用于获得大豆产物的用途,其中所述原种事件EE-GM3包含在以保藏号NCIMB 41659保藏于NCIMB的参照种子中,且所述原种事件EE-GM2包含在以保藏号NCIMB 41660保藏于NCIMB的参照种子中,并且其中所述原种事件EE-GM3是携带包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的人工基因座,且所述原种事件EE-GM2是携带包含一个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座。

4. 权利要求3所述的用途,其中所述大豆产物为大豆粕、磨碎的大豆种子、大豆粉或大豆薄片。

5. 包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆产物,其中所述原种事件EE-GM3包含在以保藏号NCIMB 41659保藏于NCIMB的参照种子中,且所述原种事件EE-GM2包含在以保藏号NCIMB 41660保藏于NCIMB的参照种子中,其中所述原种事件EE-GM3包含SEQ ID No.2的核苷酸1441至核苷酸1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251的核苷酸序列,其中所述原种事件EE-GM2包含SEQ ID No.14的核苷酸301至核苷酸322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518的核苷酸序列,其中原种事件EE-GM3是携带包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的人工基因座,且所述原种事件EE-GM2是携带包含1个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座,其中所述大豆产物为大豆粕、磨碎的大豆种子、大豆粉或大豆薄片,并且其中所述大豆产物包含在用由SEQ ID No.18的核苷酸序列组成的引物和由SEQ ID No.19的序列组成的引物进行的聚合酶链式反应中产生151bp的DNA片段的核酸,并且所述大豆产物包含在用由SEQ ID No.4的核苷酸序列组成的引物和由SEQ ID No.5的序列组成的引物进行的聚合酶链式反应中产生263bp的DNA片段的核酸。

6. 包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆种子用于获得大豆产物的用途,其中所述原种事件EE-GM3包含在以保藏号NCIMB 41659保藏于NCIMB的参照种子中,且所述原种事件EE-GM2包含在以保藏号NCIMB 41660保藏于NCIMB的参照种子中,其中所述原种事件EE-GM3包含SEQ ID No.2的核苷酸1441至核苷酸1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251的核苷酸序列,其中所述原种事件EE-GM2包含SEQ ID No.14的核苷酸301至核苷酸322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518的核苷酸序列,其中所述原种事件EE-GM3是携带包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的人工基因座,且所述原种事件EE-GM2是携带包含1个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座。

7. 权利要求6所述的用途,其中所述大豆产物为大豆粕、磨碎的大豆种子、大豆粉或大豆薄片。

8. 包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆细胞的用途,其中所述原种事件EE-GM3包含在以保藏号NCIMB 41659保藏于NCIMB的参照种子中,且所述原种事件EE-GM2包含在以保藏号NCIMB 41660保藏于NCIMB的参照种子中,并且其中所述原种事件EE-GM3是携带包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的人工基因座,且所述原种事件EE-GM2是携带包含一个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座。

9. 权利要求8所述的用途,其中所述大豆植物细胞在其基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含SEQ ID No.20的核苷酸序列或其互补序列,以及在其基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列,所述EE-GM2是携带包含1个拷贝的嵌合pat基因的外源DNA的人工基因座,且所述EE-GM2的核苷酸序列包含在SEQ ID No.14或15中所包含的在所述外源DNA侧翼的DNA序列,以及在以保藏号NCIMB 41660保藏的包含EE-GM2的参考种子的植物基因组中的在SEQ ID No.14的序列与SEQ ID No.15的序列之间的外源DNA序列。

## 耐除草剂大豆植物及鉴定其的方法

[0001] 本申请是申请日为2010年11月23日、申请号为201080061916.8、发明名称为“耐除草剂大豆植物及鉴定其的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 交叉参考相关申请

[0003] 本申请要求2010年7月23日提交的美国临时专利申请No.61/367,251;2009年11月23日提交的美国临时专利申请No.61/263,707;和2009年11月23日提交的欧洲专利申请No.EP 09014565.7的优先权,将所述每一个美国临时专利申请和欧洲专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及转基因大豆植物、植物材料和种子,其特征在于包含至少两个特定的转化事件,具体地在于至少两组编码赋予除草剂抗性的蛋白质的基因的存在,所述基因的组各自位于大豆基因组的特定位置。本发明的大豆植物将耐除草剂表型与在除草剂不存在的情况下等同于非转化大豆品系的不同遗传背景中的农艺性状、遗传稳定性和功能性组合。本发明还提供了用于鉴定包含特定转化事件EE-GM和EE-GM2或EE-GM1的植物材料在生物样品中存在的方法和试剂盒。

[0005] 发明背景

[0006] 植物中转基因的表型表达可通过基因本身的结构和通过其在植物基因组中的位置来确定。同时转基因或“外源DNA”在基因组的不同位置上的存在可以以不同方式影响植物的总体表型。通过基因操作将具有商业吸引力的性状在农业或工业上成功地引入植物视不同的因素而定可以是冗长的过程。遗传转化的植物的实际转化和再生只是一系列选择步骤的第一步,所述一系列选择步骤包括广泛的遗传表征、繁育以及田间试验的评估,最终导致原种事件(elite event)的选择。

[0007] 基于关于新型食品/饲料、GMO和非-GMO产物的分离以及专利材料(proprietary material)的鉴定的讨论,原种事件的明确鉴定变得日益重要。理想地,这样的鉴定方法快速且简单,无需大量实验室装置。此外,所述方法应当提供使得能够明确鉴定原种事件而无需专家解释,但必要时经历得起专家的细查的结果。本文中描述了用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2的特殊工具。

[0008] 在本发明中,EE-GM3已在耐除草剂大豆(大豆(Glycine max))的开发中被鉴定为来自转基因大豆植物群体的良种事件,所述耐除草剂大豆包含与赋予对4-羟基苯丙酮酸二氧合酶(HPPD)抑制剂的抗性的基因组合的编码草甘膦抗性的基因,所述基因各自于植物可表达启动子的控制之下。

[0009] EE-GM1和EE-GM2先前已被鉴定为在耐除草剂大豆(大豆)的开发中被鉴定为来自转基因大豆植物群体的原种事件,所述转基因大豆包含处于植物可表达启动子的控制之下的编码草甘膦抗性的基因,并且描述于W02006/108674和W02006/108675(将两个公布通过引用并入本文)中。

[0010] 本领域已公开了包含耐除草剂基因的大豆植物。然而,现有技术公开内容没有一

个教导或提出本发明。

[0011] 在本领域中已知在大豆植物中获得具有可接受的农艺性状、无产量抑制现象 (yield drag) 以及提供足够的除草剂抗性 (当然针对3个不同种类的除草剂) 的商业耐除草剂原种转化事件绝不简单容易。

[0012] 事实上,已报导市场上发布的具有耐除草剂的第一大豆植物 (事件40-3-2) 与 (近-) 等基因系 (isogenic line) 相比较具有显著的产量抑制现象 (Elmore等 (2001) Agron.J.93:408-412)。

[0013] 同样地,Optimum<sup>TM</sup>GAT<sup>TM</sup>大豆 (事件356043) 经开发将对草甘膦的抗性与对ALS除草剂的抗性组合,但已报导此类大豆本身不满足草甘膦抗性的标准 (无与另一种草甘膦抗性大豆事件 (例如事件40-3-2) 的组合 (参见例如, [www.bloomberg.com/corri/apps/news?pid=newsarchive&sid=ad4L0hH9MKWE](http://www.bloomberg.com/corri/apps/news?pid=newsarchive&sid=ad4L0hH9MKWE)))。

[0014] 本发明的优选实施方案的概述

[0015] 本发明涉及转基因大豆植物、其种子、细胞或组织,所述转基因大豆植物、其种子、细胞或组织包含稳定地整合入其基因组的表达盒 (所述表达盒包含含有2mEPSPS基因的编码序列的耐除草剂基因和含有HPPD-PF W336的编码序列的另一种耐除草剂基因 (如本文实施例1.1中描述和SEQ ID No 1中所示的两个基因)) 以及第二表达盒 (所述第二表达盒包含含有草丁膦乙酰转移酶的编码序列的耐除草剂基因 (如实施例1中描述的和SEQ ID No 11中所示的))。所述转基因大豆植物或其种子、细胞或组织耐受基于草甘膦、基于草胺膦的除草剂以及HPPD抑制剂除草剂例如异噁唑草酮,并且在除草剂不存在的情况下,具有大体上与转基因等基因系相当的农艺性状。在施用一种或多种提供了针对其的抗性的除草剂后,植物将具有与非转基因植物相比较更优的农艺表型。

[0016] 根据本发明,大豆植物或其种子、细胞或组织包括原种事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2。

[0017] 更具体地,本发明涉及转基因大豆、其种子、细胞或组织,其基因组DNA的特征在于这样的事实:当在本文中描述的PCR鉴定方案中进行分析时,使用分别针对EE-GM3的和EE-GM-3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的两个引物,产生对于EE-GM3有特异性的片段,以及此外当在本文中描述的PCR鉴定方案中分析时,使用分别针对EE-GM1或EE-GM2的和包含草胺膦抗性基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的两个引物,产生对于EE-GM1或EE-GM2有特异性的片段。用于检测EE-GM3的引物可分别针对SEQ ID NO:2内的5' 侧翼区域和包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 侧翼区域。用于检测EE-GM3的引物还可分别针对SEQ ID NO:3内的3' 侧翼区域和包含耐除草剂基因的外源DNA的3' 侧翼区域,例如分别包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4或SEQ ID No.:7的核苷酸序列或 (基本上) 由所述核苷酸序列组成的引物,并且产生100至800bp的DNA片段,例如约263bp或706bp的片段。用于检测EE-GM1的引物可分别针对SEQ ID NO:12和包含耐除草剂基因的外源DNA内的5' 侧翼区域。用于检测EE-GM1的引物还可分别针对SEQ ID NO:13和包含耐除草剂基因的外源DNA内的3' 侧翼区域,例如分别包含SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的核苷酸序列或 (基本上) 由所述核苷酸序列组成的引物,并且产生100至500bp的DNA片段,例如约183bp的片段。用于检测EE-GM2的引物可分别针对SEQ ID NO:14和包含耐除草剂基因的外源DNA内的5' 侧翼区域。用于EE-GM2的检测的引物还可分别针对SEQ ID NO:15和包含耐除草剂基因的外源DNA内的3' 侧翼

区域,例如,分别包含SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物,并且产生100至500bp的DNA片段,例如约151bp的片段。

[0018] 包含本发明的原种事件的EE-GM3的参照种子已在登录号NCIMB41659下保藏在NCIMB。包含本发明的原种事件EE-GM1的参照种子已在登录号NCIMB 41658下保藏在NCIMB。包含本发明的原种事件EE-GM2的参照种子已在登录号NCIMB 41660下保藏在NCIMB。包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的参照种子已在登录号PTA-11041下保藏在ATCC。包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的参照种子已在登录号PTA-11042下保藏在ATCC。

[0019] 本发明的一个实施方案是包含原种事件EE-GM3 (以NCIMB登录号NCIMB 41659保藏的包含所述事件的参照种子) 并且还包含原种事件EE-GM1 (以NCIMB登录号NCIMB 41658保藏的包含所述事件的参照种子) 的种子,或包含事件EE-GM3和EE-GM1的种子(在登录号PTA-11041下保藏在ATCC的包含所述事件的参照种子),所述种子将生长成耐受至少3种除草剂,特别地耐草甘膦和/或HPPD抑制剂例如异噁唑草酮和/或谷氨酰胺合成酶抑制剂例如草胺膦的大豆植物。

[0020] 本发明的另一个实施方案是包含原种事件EE-GM3 (以NCIMB登录号NCIMB 41659保藏的包含所述事件的参照种子) 并且还包含原种事件EE-GM2 (以NCIMB登录号NCIMB 41660保藏的包含所述事件的参照种子) 的种子或包含事件EE-GM3和EE-GM2 (在登录号PTA-11042下保藏在ATCC的包含所述事件的参照种子) 的种子,所述种子生长成耐受至少3种除草剂,特别地耐受草甘膦和/或HPPD抑制剂例如异噁唑草酮和/或谷氨酰胺合成酶抑制剂例如草胺膦的大豆植物。

[0021] NCIMB保藏号NCIMB 41659的种子是由至少约95%的包含原种事件EE-GM3的转基因种子组成的种子批,所述转基因种子将生长成耐除草剂植物,其中所述植物为耐受草甘膦和/或异噁唑草酮的植物。可播种可获自保藏的种子或从所述种子获得的种子或后代种子(例如,在与其它具有不同遗传背景的大豆植物杂交后),可用本文中描述的草甘膦或HPPD抑制剂例如异噁唑草酮处理正在生长的植物以获得耐受草甘膦或异噁唑草酮的植物,所述植物包含原种事件EE-GM3。NCIMB保藏号NCIMB 41658和NCIMB 41660的种子是分别由至少约95%的包含原种事件EE-GM1或EE-GM2的转基因种子组成的种子批,所述种子可生长成耐除草剂植物,其中所述植物是抗草胺膦植物。可播种种子,用本文中描述的草胺膦处理正在生长的植物以获得耐草胺膦植物,所述植物包含原种事件EE-GM1或EE-GM2。

[0022] ATCC保藏号PTA-11041的种子是由至少约95%的以纯合子形式包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1的转基因种子组成的种子批,所述种子可生长成耐除草剂植物,其中所述植物是耐草甘膦、草胺膦和/或异噁唑草酮(isoxaflutole)植物。可播种可从保藏的种子获得或从所述种子获得(例如,在与具有不同遗传背景的其他大豆植物杂交后)的植物或后代种子,可用本文中描述的草甘膦、草胺膦和/或HPPD抑制剂例如异噁唑草酮处理正在生长的植物以获得耐草甘膦、草胺膦和/或异噁唑草酮植物,所述植物包含原种事件EE-GM3和EE-GM1。ATCC保藏号PTA-11042的种子是由至少约95%的以纯合子形式包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2的转基因种子组成的种子批,所述种子将生长成耐除草剂植物,其中所述植物是耐草甘膦、草胺膦和/或异噁唑草酮植物。可播种可从保藏的种子获得或从所述种子获得(例如,在与具有不同遗传背景的其他大豆植物杂交后)的种子或后代种子,可用本文中描述的草甘膦、草胺膦和/或HPPD抑制剂例如异噁唑草酮处理正在生长的植物以获

得耐草甘膦、草胺膦和/或异噁唑草酮植物,所述植物包含原种事件EE-GM3和EE-GM2。

[0023] 本发明还涉及来自包含原种事件EE-GM3并且还包含原种事件EE-GM1的植物的细胞、组织、子代和后代,所述植物可通过生长为PTA-11041保藏在ATCC的包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的植物获得,或通过生长来自保藏在NCIMB的具有登录号NCIMB 41659的种子的包含原种事件EE-GM3的植物,然后将所述植物与从保藏在NCIMB的具有登录号NCIMB 41658的种子生长而来的包含良种事件EE-GM1的植物杂交来获得。本发明还涉及来自包含原种事件EE-GM3并且还包含原种事件EE-GM2的植物的细胞、组织、后代和后代,所述植物可通过生长以PTA-11042保藏在ATCC的原种事件EE-GM3和EE-GM2的植物来获得,或通过生长来自保藏在NCIMB的具有登录号NCIMB 41659的种子的包含原种事件EE-GM3的植物,然后将所述植物与从保藏在NCIMB的具有登录号NCIMB 41660的种子生长而来的包含原种事件EE-GM2的植物杂交来获得。本发明还涉及可从上文中刚刚描述的大豆植物或种子获得的植物(例如通过大豆植物或种子的繁殖和/或与其繁育)。本发明还涉及包含原种事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的大豆植物。

[0024] 本发明还涉及用于鉴定包含原种事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的转基因、其细胞或组织的方法,所述方法基于鉴定表征DNA序列或由这样的DNA序列编码的氨基酸序列在转基因植物、细胞或组织中的存在。根据本发明的优选实施方案中,这样的表征DNA序列为包含事件的插入位点的至少15bp、15bp、至少20bp、20bp或30bp或更多碱基对的序列,即包含耐除草剂基因的插入的外源DNA的一部分和与其邻接的大豆基因组的一部分(5'或3'侧翼序区域),从而允许特异性鉴定原种事件。

[0025] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1或原种事件EE-GM3和EE-GM2的方法,所述方法基于特异性识别EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'和/或3'侧翼序列的引物或探针。

[0026] 更具体地,本发明涉及这样的方法,所述方法包括使用两个各自利用至少两个引物的聚合酶链式反应或一个利用至少4个引物的聚合酶链式反应扩增存在于生物样品中的两个核酸的序列,优选以获得两个100至800bp的DNA片段,所述第一引物识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域,所述第二引物识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列,所述第三引物识别EE-GM1或EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域,所述第四引物识别EE-GM1或EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列。用于鉴定EE-GM3的引物可分别识别EE-GM3的5'侧翼区域内的序列(SEQ ID No.2,从位置1至位置1451)或EE-GM3的3'侧翼区域内的序列(SEQ ID No.3的位置241至位置1408的互补序列)和包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列(SEQ ID No.2的位置1452至1843或SEQ ID No.3的位置1至位置240的互补序列或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638或其互补序列)。识别3'侧翼区域的引物可包含SEQ ID No.5的核苷酸序列,识别包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的引物可包含本文中描述的SEQ ID No.4或SEQ ID No.7的核苷酸序列。用于鉴定EE-GM1的引物可分别识别EE-GM1的5'侧翼区域(SEQ ID No.12,从位置1至位置209)或EE-GM1的3'侧翼区域内的序列(SEQ ID No.13的位置569至位置1000的互补序列)和EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列(SEQ ID No.12的位置210至720或SEQ ID No.13的位置1至位置568的互补序列)。识别EE-GM1的5'侧翼区域的引物包含SEQ ID No.16的核苷酸序列,识别EE-GM1的外源DNA内的序列的引物可包含本文

中公开的SEQ ID No.17的核苷酸序列。用于鉴定EE-GM2的引物可分别识别EE-GM2的5'侧翼区域内的序列(SEQ ID No.14,从位置1至位置311)或EE-GM2的3'侧翼区域内的序列(SEQ ID No.15的位置508至位置1880的互补序列)和EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列(SEQ ID No.14的位置312至810的互补序列或SEQ ID No.15的位置1至位置507)。识别EE-GM2的3'侧翼区域的引物可包含SEQ ID No.18的核苷酸序列,识别EE-GM2的外源DNA内的序列的引物可包含本文中描述的SEQ ID No.19的核苷酸序列。可同时或相继进行PCR扩增。

[0027] 本发明更具体地涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1的方法,所述方法包括使用聚合酶链式反应,利用至少两个分别包含SEQ ID No.4和SEQ ID No.5的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物(以获得约263bp的DNA片段)或利用两个分别包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.7的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物(以获得约706bp的DNA片段)以及使用聚合酶链式反应,利用两个分别包含SEQ ID No.16和SEQ ID No.17的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物(以获得约183bp的DNA片段)扩增存在于生物样品中的核酸的至少两个序列。可同时或相继进行两个聚合酶链式反应。

[0028] 本发明更具体地涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM2的方法,所述方法包括使用聚合酶链式反应,利用两个分别包含SEQ ID No.4和SEQ ID No.5的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物(以获得约263bp的DNA片段),或利用两个分别包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.7的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物(以获得约706bp的DNA片段),以及使用聚合酶链式反应,利用两个分别包含SEQ ID No.18和SEQ ID No.19的核苷酸序列或(基本上)由核苷酸所述序列组成的引物(以获得约151bp的DNA片段)扩增存在于生物样品中的核酸的至少两个序列。可同时或相继进行两个聚合酶链式反应。

[0029] 本发明还涉及与EE-GM1的特异性侧翼序列组合的本文中描述的EE-GM3的特异性侧翼序列,所述序列可用于开发鉴定EE-GM3和EE-GM1在生物样品中的同时存在的特异性鉴定方法。此类组合的特异性侧翼序列还可在鉴定测定中用作参照对照材料。更具体地,本发明涉及与EE-GM1的5'和/或3'侧翼区域组合的EE-GM3的5'和/或3'侧翼序列,所述序列可用于开发本文中进一步描述的特异性引物和探针。还适合用作参照材料的是与核酸分子(所述核酸分子包含可利用包含SEQ ID No.16和SEQ ID No.17的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物扩增的序列)组合的优选约150-850bp的核酸分子,所述核酸分子可利用包含SEQ ID No.7和SEQ ID No.5的核苷酸序列或SEQ ID No.4和SEQ ID No.5的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物扩增的序列,特别地使用此类引物在包含EE-GM3和EE-GM1的材料中获得此类核酸分子。

[0030] 本发明还涉及与EE-GM2的特异性侧翼序列组合的本文中描述的EE-GM3的特异性侧翼序列,所述序列可用于开发用于鉴定EE-GM3和EE-GM2在生物样品中的同时存在的特异性鉴定方法。这样的组合的特异性侧翼序列还可在鉴定测定中用作参照对照材料。更具体地,本发明涉及与EE-GM2的5'和/或3'的侧翼区域组合的EE-GM3的5'和/或3'侧翼区域,所述侧翼区域可用于开发本文中进一步描述的特异性引物和探针。还适合用作参照材料的是与核酸分子(所述核酸分子包含可利用包含SEQ ID No.18和SEQ ID No.19的核苷酸或(基本



上)由所述核苷酸序列组成的引物扩增的序列)组合的优选约150-850bp的核酸分子,所述核酸分子包含可利用包含SEQ ID No.7和SEQ ID No.5的核苷酸序列或SEQ ID No.4和SEQ ID No.5的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的引物扩增的序列,特别地使用此类引物在包含EE-GM3和EE-GM2的材料中获得此类核酸分子。

[0031] 本发明还涉及基于此类特异性引物或探针的使用鉴定EE-GM3和EE-GM1在生物样品中的同时存在的鉴定方法。用于EE-GM3检测的引物可包含与引物(所述引物包含选自SEQ ID No 1的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列,例如选自SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1843的核苷酸序列的互补序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列或由或基本上由所述核苷酸序列组成)组合的选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列或SEQ ID 3的核苷酸241至核苷酸1408的核苷酸序列的互补序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列或由或基本由所述核苷酸序列组成。用于EE-GM1检测的引物可包含与引物(所述引物包含选自SEQ ID No 11的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列,例如选自SEQ ID No 12的核苷酸219至核苷酸720的核苷酸序列的互补序列或SEQ ID No 13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列或由或基本上由所述核苷酸序列组成)组合的选自SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列或SEQ ID 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列、由或基本上由所述核苷酸序列组成。引物还可包含位于在它们的最3'末端的这些核苷酸序列,并且还包含无关序列或来源于提及的核苷酸序列但包含错配的序列。

[0032] 本发明还涉及基于此类特异性引物或探针的使用鉴定EE-GM3和EE-GM2在生物样品中的同时存在的方法。用于EE-GM3检测的引物可包含先前段落中描述的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列、由或基本上由所述核苷酸序列组成。用于EE-GM2检测的引物可包含与引物(包含选自SEQ ID No 11的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列,例如SEQ ID No 14的核苷酸312至核苷酸810的核苷酸序列的互补序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列、由或基本上由所述核苷酸序列组成)组合的选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列或SEQ ID 15的核苷酸508至核苷酸1880的核苷酸序列的互补序列的17至约200个连续核苷酸的核苷酸序列、由或基本上由所述核苷酸序列组成。引物还可包含位于它们最3'末端的这些核苷酸序列,并且还包含无关序列或来源于提及的核苷酸序列但包含错配的序列。

[0033] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1的试剂盒,所述试剂盒包括至少一种特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的引物或探针和至少一种特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的引物或探针。

[0034] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM2的试剂盒,所述试剂盒包括至少一种特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的引物或探针和至少一种特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的引物或探针。

[0035] 本发明的试剂盒,除了特异性识别EE-GM3的5'或3'侧翼区域或EE-GM1的5'或3'侧翼区域的引物外,还可包括特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的

其它引物和特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的其它引物,以用于PCR鉴定方案。

[0036] 本发明的试剂盒,除了特异性识别EE-GM3的5' 或3' 侧翼区域和EE-GM2的5' 或3' 侧翼区域的引物外,还可包括特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的其它引物和特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的其它引物,以用于PCR鉴定方案。

[0037] 识别EE-GM3的3' 侧翼区域的引物可包含SEQ ID No.5的核苷酸序列并且识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的转基因或外源DNA的引物可包含SEQ ID No.4或7的核苷酸序列,或与可包含SEQ ID No.16的核苷酸序列的识别EE-GM1的5' 侧翼区域的引物和识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的转基因的引物组合的本文中描述的用于EE-GM3检测的任何其它引物或引物组合可包含SEQ ID No.17的核苷酸序列。

[0038] 识别EE-GM3的3' 侧翼区域的引物可包含SEQ ID No.5的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的转基因或外源DNA的引物可包含SEQ ID No.4或7的核苷酸序列,或与可包含SEQ ID No.18的核苷酸序列的识别EE-GM2的5' 侧翼区域的引物和识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的转基因的引物组合的本文中描述的用于EE-GM3检测的任何其它引物或引物组合可包含SEQ ID No.19的核苷酸序列。

[0039] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1的试剂盒,所述试剂盒包括包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.4的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的PCR引物和包含SEQ ID 16和SEQ ID 17的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的PCR引物,以用于基于EE-GM3/EE-GM1PCR的鉴定。

[0040] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM2的试剂盒,所述试剂盒包括包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.4的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的PCR引物和包含SEQ ID 18和SEQ ID 19的核苷酸序列或(基本上)由所述核苷酸序列组成的PCR引物,以用于基于EE-GM3/EE-GM2PCR的鉴定。

[0041] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM1的试剂盒,所述试剂盒包括两种特异性探针,第一探针包含对应于与EE-GM3特异性区域具有80%至100%的序列同一性的序列(或与所述序列互补)的序列或(基本上)由所述序列组成,并且第二探针包含对应于与EE-GM1特异性区域具有80%至100%的序列同一性的序列(或与所述序列互补)的序列或(基本上)由所述序列组成。优选地,第一探针的序列对应于包含EE-GM3的5' 或3' 侧翼区域的部分的特异性区域并且所述第二探针对应于包含EE-GM1的5' 或3' 侧翼区域的部分的特异性区域。最优选地,EE-GM3特异性探针包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或与ID No.3的核苷酸220至260之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或(基本上)由所述序列组成(或与所述序列互补),并且EE-GM1特异性探针包含与SEQ ID No.12的核苷酸199至220之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或与SEQ ID No.13的核苷酸558至579之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或(基本上)由所述序列组成(或与所述序列互补)。

[0042] 本发明还涉及用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM2的试剂盒,所述试剂盒包括两种特异性探针,第一探针包含对应于与EE-GM3特异性区域具有80%至100%的序列同一性的序列(或与所述序列互补)的序列或(基本上)由所述序列组成,并且第二探针

包含对应于与EE-GM2特异性区域具有80%至100%的序列同一性的序列(或与所述序列互补)的序列或(基本上)由所述序列组成。优选地,第一探针的序列对应于包含EE-GM3的5'或3'侧翼区域的部分的特异性区域并且所述第二探针对应于包含EE-GM2的5'或3'侧翼区域的部分的特异性区域。最优选地,EE-GM3特异性探针包含与SEQ ID No. 2的核苷酸1441至1462之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或与SEQ ID No. 3的核苷酸220至260之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或(基本上)由所述序列组成(或与所述序列互补),并且EE-GM2特异性探针包含与SEQ ID No. 14的核苷酸301至322之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或与SEQ ID No. 15的核苷酸497至518之间的序列具有80%至100%的序列同一性的序列或(基本上)由所述序列组成(或与所述序列互补)。

[0043] 根据本发明的另一个方面,公开了DNA序列,所述DNA序列包含事件的连接位点和足够长度的大豆基因组DNA和每一个事件的包含耐除草剂基因(转基因)的外源DNA的多核苷酸以用作用于检测EE-GM3和EE-GM1的引物或探针。此类序列可分别在连接位点的每一侧包含大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和EE-GM3或EE-GM1的包含耐除草剂基因(转基因)的外源DNA的相似数目的核苷酸。最优选地,此类DNA序列包含大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中的连接位点邻接的包含耐除草剂基因的外源DNA的相似数目的核苷酸以及大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中的连接位点邻接的包含耐除草剂基因的外源DNA的相似数目的核苷酸。

[0044] 根据本发明的另一个方面,公开了DNA序列,所述DNA序列包含事件的连接位点和足够长度的大豆基因组DNA和每一个事件的包含耐除草剂基因(转基因)的外源DNA的多核苷酸以用作用于检测EE-GM3和EE-GM2的引物或探针。此类序列可分别在插入位点的每一侧包含大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和EE-GM3或EE-GM2的包含耐除草剂基因(转基因)的外源DNA的相似数目的核苷酸。最优选地,此类DNA序列包含大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中的连接位点邻接的包含耐除草剂基因的外源DNA的相似数目的核苷酸以及大豆基因组DNA的至少9个核苷酸和与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中的连接位点邻接的包含耐除草剂基因的外源DNA的相似数目的核苷酸。

[0045] 本发明包括的方法和试剂盒可用于不同目的例如但不限于下列目的:鉴定EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2在植物、植物材料或产物例如但不限于包含植物材料或来源于植物材料的食品或饲料产品(新鲜的或加工的)中的存在或测定其(下限)阈值;此外或可选择地,为了分离转基因与非转基因材料,可将本发明的方法和试剂盒用于鉴定转基因植物材料;此外或可选择地,可将本发明的方法和试剂盒用于测定包含EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM1的植物材料的质量(即,纯材料百分比)。

[0046] 本发明还涉及与从EE-GM1或EE-GM2的5'和/或3'侧翼序列开发的特异性引物和探针组合的EE-GM3GM3的5'和/或3'侧翼区域,以及涉及与从EE-GM1或EE-GM2的5'和/或3'侧翼序列开发的特异性引物和探针组合的从EE-GM3的5'和/或3'侧翼序列开发的特异性引物和探针。

[0047] 本发明还涉及从包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的植物或包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的植物获得的基因组DNA。此类基因组DNA可在本文中描述的鉴定测定中用作参照对照材料。

[0048] 本文中还提供了转基因耐除草剂大豆植物或其细胞、部分、种子或后代,其各自包

含至少两个原种事件,所述第一原种事件包含外源DNA,所述外源DNA包含:

[0049] i) 包含来自玉蜀黍的在植物可表达启动子的控制下编码耐草甘膦的EPSPS酶的修饰epsps基因的第一嵌合基因,和

[0050] ii) 包含来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescen*)的编码耐HPPD抑制剂除草剂的酶的修饰hppd基因的第二嵌合基因,并且所述第二原种事件包含含有源自产绿色链霉菌(*Streptomyces viridochromogene*)的在植物可表达的启动子控制下编码草胺膦(或草胺膦)乙酰转移酶的修饰耐草胺膦基因的(第三)嵌合基因。

[0051] 在一个实施方案中,所述第一原种事件包含紧邻所述外源DNA的上游和与其邻接的SEQ ID No 2的核苷酸1至1451以及紧邻所述外源DNA的下游和与其邻接的SEQ ID No 3的核苷酸241至1408,并且所述第二事件包含紧邻所述外源DNA的上游和与其邻接的SEQ ID No 12的核苷酸1至209以及紧邻所述外源DNA的下游和与其邻接的SEQ ID No 13的核苷酸569至1000,或所述第二事件包含紧邻所述外源DNA的上游和与其邻接的SEQ ID No 14的核苷酸1至311以及紧邻所述外源DNA的下游和与其邻接的SEQ ID No 15的核苷酸508至1880。

[0052] 在其它实施方案中,所述原种事件可通过与从已在保藏号PTA-11041或PTA-11042下保藏在ATCC的包含所述事件的参照种子生长而来的大豆植物繁育获得,或可从已在登录号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的包含所述第一事件的参照种子获得,和可从已在登录号NCIMB 41658或NCIMB登录号NCIMB 41660下保藏在NCIMB的包含所述第二事件的参照种子获得。

[0053] 在另一个实施方案中,所述大豆植物、其细胞、部分、种子或后代的基因组DNA,当使用原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID No 4和SEQ ID No 5的核苷酸序列分析其所述第一原种事件时,产生约263bp或263bp的DNA片段,当使用原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID No 16和SEQ ID No 17的核苷酸序列分析其所述第二原种事件时,产生约183bp或183bp的DNA片段,或利用两个分别包含SEQ ID No 18和SEQ ID No 19的核苷酸序列的引物分析时,产生约151bp或151bp的DNA片段。

[0054] 本文中还提供了用于鉴定生物样品中的包含2个原种事件的转基因大豆植物或其细胞、部分、种子或后代的方法,其中所述植物、细胞、种子或后代耐草甘膦、草胺膦和HPPD抑制剂除草剂(例如异噁唑草酮),所述方法包括使用聚合酶链式反应,利用至少两个引物从存在于生物样品中的所述第一事件的核酸扩增100至500bp的DNA片段,所述引物之一识别上面指定的第一原种事件的5'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,或识别所述第一原种事件的3'侧翼区域,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别所述第一事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列,以及包括使用聚合酶链式反应,利用至少两个引物从存在于生物样品中的所述第二事件的核酸扩增50至1000bp或100至500bp的DNA片段,所述引物之一识别上面指定的第二原种事件的5'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 12的核苷酸1至209的核苷酸序列,或识别所述第二原种事件的3'侧翼区域,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 13的核苷酸569至1000的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别所述第二事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No 12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列

或SEQ ID No 13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列。

[0055] 本文中还提供了用于鉴定生物样品中的包含2个原种事件的转基因大豆植物或其细胞、部分、种子或后代的方法,其中所述植物、细胞、种子或后代耐草甘膦、草胺膦和/或HPPD抑制剂除草剂(例如异噁唑草酮),所述方法包括使用聚合酶链式反应,利用至少两个引物从存在于生物样品中的所述第一事件的核酸扩增50至1000或100至500bp的DNA片段,所述引物之一识别上文中指定的第一原种事件的5'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,或识别所述第一原种事件的3'侧翼区域,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别所述第一事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列,以及包括使用聚合酶链式反应,利用至少两个引物从存在于生物样品中的所述第二事件的核酸扩增50至1000bp或100至500bp的DNA片段,所述引物之一识别上文中指定的第二原种事件的5'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列,或识别所述第二原种事件的3'侧翼区域,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别所述第二事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No 14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列。

[0056] 本文中还提供了用于鉴定生物样品中的包含2个原种事件并且耐草甘膦、草胺膦和HPPD抑制剂除草剂(例如异噁唑草酮)的转基因大豆植物或其细胞、部分、种子或后代的试剂盒,所述试剂盒包括一种识别上文中指定的第一原种事件的5'侧翼区域的引物,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,或一种识别所述第一原种事件的3'侧翼区域的引物,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,一种识别所述第一事件的外源DNA内的序列的引物,所述外源DNA包含SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列,并且所述试剂盒包括一种识别上文中指定的第二原种事件的5'侧翼区域的引物,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列,或一种识别所述第二原种事件的3'侧翼区域的引物,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别所述第二事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列。

[0057] 本文中还提供用于鉴定生物样品中的包含2个原种事件并且耐草甘膦、草胺膦和HPPD抑制剂除草剂(例如异噁唑草酮)的转基因大豆植物或其细胞、部分、种子或后代的试剂盒,所述试剂盒包括一种识别上文中指定的第一原种事件的5'侧翼区域的引物,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,或一种识别所述第一原种事件的3'侧翼区域,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,一种识别所述第一事件的外源DNA内的序列的引物,所述外源DNA包含SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列,并且所述试剂盒包括一种识别上文中指定的第二原种事件的5'侧翼区域(所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序

列)或识别所述第二原种事件的3'侧翼区域(所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列)的引物,所述引物的另一种引物识别所述第二事件的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列。

[0058] 本文中还提供了在它们的基因组中包含核酸分子的大豆植物、植物细胞、组织或种子(所述核酸分子包含与SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列、SEQ ID No.20的核苷酸位置2257至核苷酸位置16601的核苷酸序列或它们的互补序列具有至少97%、98%或至少99%或99.5%的序列同一性的核苷酸序列或与SEQ ID No.20或其互补序列具有至少97%、98%或至少99%或99.5%的序列同一性的核苷酸序列),以及在它们的基因组中包含核酸分子的大豆植物、植物细胞、组织或种子(所述核酸分子包含与EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列具有至少97%、98%或至少99%或99.5%的序列同一性的核苷酸序列),已在保藏号NCIMB 41658下保藏的包含EE-GM1的参照种子和已在保藏号NCIMB 41660下保藏的包含EE-GM2的参照种子。在本发明的一个实施方案中,所述植物、植物细胞、组织或种子中的EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列是SEQ ID No 12或13中的DNA序列(例如外源DNA序列),或SEQ ID No 14或15中的DNA序列(例如外源DNA序列),或包含SEQ ID No 12的序列的第一核苷酸与SEQ ID No 13的序列的最后一个核苷酸之间的SEQ ID No 12和13的植物基因组(例如在包含本发明的EE-GM1或EE-GM2的保藏的种子中)的DNA序列,或包含SEQ ID No 14的序列的第一核苷酸与SEQ ID No 15的序列的最后一个核苷酸之间的SEQ ID No 14和15的植物基因组的DNA序列。

[0059] 本发明的一个实施方案提供在它们的基因组中包含核酸分子的大豆植物、植物细胞、组织或种子(所述核酸分子与SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列杂交,或与SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列杂交,或SEQ ID No.20的核苷酸序列或其互补序列杂交),以及在它们的基因组中包含核酸分子的大豆植物、植物细胞、组织或种子(所述核酸分子与EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列杂交),已在保藏号NCIMB 41658下保藏的包含EE-GM1的参照种子和已在保藏号NCIMB 41660下保藏的包含EE-GM2的参照种子。在本发明的一个实施方案中,所述植物、植物细胞、组织或种子中的EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列是SEQ ID No 12或13中的外源DNA,或SEQ ID No 14或15中的外源DNA,或包含SEQ ID No 12的序列的第一核苷酸与SEQ ID No 13的序列的最后一个核苷酸之间的SEQ ID No 12和13的植物基因组(例如在包含本发明的EE-GM1或EE-GM2的保藏的种子中)的外源DNA序列,或包含SEQ ID No 14的序列的第一核苷酸与SEQ ID No 15的序列的最后一个核苷酸之间的SEQ ID No 14和15的植物基因组的外源DNA序列。

[0060] 附图简述

[0061] 可结合附图(通过引用并入本文)理解无意将本发明限定于描述的特定实施方案的下列实施例,其中:

[0062] 图1:引用的核苷酸序列与原种事件EE-GM3的引物之间的关系的示意图。黑色条:外源DNA;阴影条:植物来源的DNA;格纹箭头(a):嵌合HPPD PF W366编码基因(关于嵌合基因的组成参见表1);阴影箭头(b):嵌合2mEPSPS编码基因(关于嵌合基因的组成参见表1);黑色箭头:寡核苷酸引物,条下的数字表示核苷酸位置;(c)是指显示的核苷酸序列的互补

序列;注意:示意图未按规定比例绘制。

[0063] 图2:通过针对EE-GM3开发的PCR鉴定方案获得的结果。凝胶的上样序列:泳道1:分子量标准(100bp梯带);泳道2和3:来自包含转基因事件EE-GM3的大豆植物的DNA样品;泳道4-7:来自未包含原种事件EE-GM3但包含相同的耐除草剂基因(其它转化事件)的转基因大豆植物的DNA样品;泳道8:来自wt大豆的DNA样品;泳道9:无模板DNA对照;泳道10:分子量标准。

[0064] 图3:引用的核苷酸序列与原种事件EE-GM1的引物之间的关系的示意图。黑色条:外源DNA;阴影条:植物来源的DNA;水平条纹箭头(d):嵌合草胺膦乙酰转移酶编码基因(关于嵌合基因的组成参见SEQ ID No.11);黑色箭头:寡核苷酸引物,条下的数字表示核苷酸位置;(c)是指显示的核苷酸序列的互补序列。注意:示意图未按规定比例绘制。

[0065] 图4:引用的核苷酸序列与原种事件EE-GM2的引物之间的关系的示意图。黑色条:外源DNA;阴影条:植物来源的DNA;水平条纹箭头(d):嵌合草胺膦乙酰转移酶编码基因(关于嵌合基因的组成参见SEQ ID No.11);黑色箭头:寡核苷酸引物,条下的数字表示核苷酸位置;(c)是指显示的核苷酸序列的互补序列。NA:不适用的;注意:示意图未按规定比例绘制。

[0066] 图5:针对EE-GM1开发的PCR鉴定方案。凝胶的上样序列:泳道1:来自包含转基因事件EE-GM1的大豆植物的DNA样品;泳道2:来自未包含原种事件EE-GM1的转基因大豆植物的DNA样品;泳道3:来自野生型大豆植物的对照DNA样品;泳道4:无模板DNA对照;泳道5:分子量标准。

[0067] 图6:针对EE-GM2开发的PCR鉴定方案。凝胶的上样序列:泳道1:来自包含转基因事件EE-GM2的大豆植物的DNA样品;泳道2:来自未包含原种事件EE-GM2的转基因大豆植物的DNA样品;泳道3:来自野生型大豆植物的对照DNA样品;泳道4:无模板DNA对照;泳道5:分子量标准。

[0068] 本发明的优选实施方案的详细描述

[0069] 重组DNA分子在植物基因组中的组合通常由细胞或组织的转化产生。整合的具体位点通常归因于随机整合。

[0070] 作为用重组DNA或“转化DNA”转化植物细胞或组织的结果而被引入植物基因组的和源自这样的转化DNA的DNA在下文中称为包含一个或多个“转基因”的“外源DNA”。EE-GM3的转基因是草甘膦和HPPD抑制剂耐除草剂基因。在本发明的说明书中“植物DNA”将指源自己被转化的植物的DNA。植物DNA通常见于对应的野生型植物的相同基因座中。外源DNA的特征可在于重组DNA分子在植物基因组中整合的位点上的定位和构型。其中已插入了重组DNA的植物基因组中的位置也称为“插入位点”或“靶位点”。可将重组DNA至称为“插入前植物DNA”的植物基因组的区域中的插入与植物DNA的缺失(称为“靶位点缺失”)结合。如本文中所示,“侧翼区域”或“侧翼序列”是指与引入的DNA不同的至少20bp,优选至少50bp和达到5000bp的DNA的序列,优选来自植物基因组的恰好位于外源DNA的上游并且与其邻接或恰好位于外源DNA的下游并且与其邻接的DNA。导致外源DNA的随机整合的转化方法将导致具有不同侧翼区域的转化体,所述侧翼区域对于每一个转化体是特征性的和独特的。当通过常规杂交将重组DNA引入植物时,其在植物基因组中的插入位点或其侧翼区域将通常不被改变。



[0071] 如本文中所用,“分离的核酸(序列)”或“分离的DNA(序列)”是指不再存在于其所分离自的天然环境中的核酸或DNA(序列),例如,在另一种细菌宿主或植物基因组中的核酸序列,或融合至来自另一种来源的DNA或核酸的核酸或DNA,例如当包含在处于植物可表达启动子的控制之下的嵌合基因中时。

[0072] 事件定义为(人工)基因座,所述基因座,作为基因工程的结果,携带包含至少一个拷贝的目标基因的外源DNA或转基因。事件的常见等位基因状态为外源DNA的存在或不存在。事件的表型特征在于转基因的表达。在基因水平上,事件是植物的基因组成的部分。在分子水平上,事件的特征在于限制性图谱(例如,通过Southern印迹确定的),在于转基因的上游和/或下游侧翼序列、分子标志的定位和/转基因的分子构型。通常地,用包含至少一个目标基因的DNA转化植物产生包含许多分离事件的转化体群体,所述每一个转化体是独特的。事件的特征在于外源DNA和侧翼序列的至少一个序列。

[0073] 如本文中所用,原种事件是基于转基因的表达和稳定性以及其与包含其的植物的最佳农艺特征的相容性,从通过利用相同转化DNA的转化获得的一组事件选择的事件。因此用于原种事件选择的标准是如下的一项或多项,优选两项或更多项,有利地所有项:

[0074] a) 外源DNA的存在不削弱植物的其它期望的特征,例如与农艺性状或商业价值相关的特征;

[0075] b) 事件的特征在于明确确定的分子构型,所述分子构型可稳定地遗传并且可针对其开发用于身份控制(identity control)的适当工具;

[0076] c) 目标基因在携有所述事件的植物可能在正常农艺应用中所暴露的许多环境条件下,以商业可接受的水平在事件的杂合子(或半合子)和纯合子条件中都显示正确的、适当的和稳定的空间和时间表型表达。

[0077] 优选地,将外源DNA与植物基因组中的位置连接,所述位置使得能够容易地进行至期望的商业遗传背景中的基因渗入。

[0078] 通过在不同的相关遗传背景中进行原种事件的基因渗入,然后观察对1、2个或所有标准例如上述a)、b)和c)的顺应性来将事件的状态确认作为原种事件。

[0079] 因此“原种事件”是指满足上述标准的包含外源DNA的基因座。植物、植物材料或后代例如种子可在其基因组中包含一个或多个原种事件。

[0080] 开发用于鉴定原种事件或包含原种事件的植物或植物材料或包含含有原种事件的植物材料的产物的工具基于原种事件的特定基因组特征,例如包含外源DNA的基因组区域的特定限制性图谱、分子标志或外源DNA的侧翼区域的序列。

[0081] 一旦已对外源DNA的一个或两个侧翼区域进行了测序,则可利用分子生物学技术开发特异性识别样品的核酸(DNA或RNA)中的该(这些)序列的引物和探针。例如,可开发PCR法来鉴定生物样品(例如植物、植物材料或包含植物材料的产物的样品)中的原种事件。这样的PCR基于至少两个特异性“引物”,一个识别原种事件的5'或3'侧翼区域内的序列并且另一个识别外源DNA内的序列。引物优选具有15至35个核苷酸的序列,所述序列在最优化的PCR条件下分别“特异性识别”原种事件的5'或3'侧翼区域和原种事件的外源DNA内的序列,以便从包含原种事件的核酸样品扩增特异性片段(“整合片段”或鉴别扩增子(discriminating amplicon))。这意味着在最优化的PCR条件下只有靶向整合片段而无植物基因组或外源DNA中的其它序列被扩增。



[0082] 适用于EE-GM3的鉴定的PCR引物可以是下列序列:

[0083] -长度范围为17nt至约200nt的寡核苷酸,其在它们的3'末端上包含选自5'侧翼序列(SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451)中的植物DNA的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列(识别5'侧翼序列的引物);或

[0084] -长度范围为17nt至约200nt的寡核苷酸,其在它们的3'末端上包含选自3'侧翼序列(SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列)中的植物DNA的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列(识别3'侧翼序列的引物);或

[0085] -长度范围为17nt至约200nt的寡核苷酸,其在它们的3'末端上包含选自插入的DNA序列(SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列)的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列(识别外源DNA的引物);或

[0086] -长度范围为17nt至约200nt的寡核苷酸,其包含选自插入的DNA序列(SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240)的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列;或

[0087] -长度范围为17nt至约200nt的寡核苷酸,其包含选自插入的DNA片段或其互补序列(SEQ ID No 1或SEQ ID No 20的核苷酸位置1452至16638)的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸,优选20个连续核苷酸的核苷酸序列。

[0088] 所述引物当然可以比提及的17个连续核苷酸长,可以例如为20、21、30、35、50、75、100、150、200nt长或甚至更长。引物可完全由选自提及的侧翼序列和外源DNA序列的核苷酸序列的核苷酸序列组成。然而,引物在它们的5'末端(即定位在3'的17个连续核苷酸之外的)上的核苷酸序列不太重要。因此,引物的5'序列可视情况而定包含选自侧翼序列或外源DNA的核苷酸序列或由所述序列组成,但可包含几个(例如,1、2、5或10)错配。引物的5'序列甚至可完全为与侧翼序列或外源DNA无关的核苷酸序列,例如代表一个或多个限制性内切酶识别位点的核苷酸序列。此类无关序列或具有错配的侧翼DNA序列应当优选不长于100,更优选不长于50或甚至25个核苷酸。

[0089] 此外,适当的引物可在它们的3'末端包含横跨植物DNA源性序列与外源DNA序列之间的连接区(位于EE-GM3的SEQ ID No 2的核苷酸1451-1452和SEQ ID No 3的核苷酸240-241上)的核苷酸序列或由或基本上由所述核苷酸序列组成,只要提及的定位在3'的17个连续核苷酸不仅仅来源于SEQ ID No 2或3中的外源DNA或植物源性序列。

[0090] 对于本领域技术人员也立即明白的是恰当选择的PCR引物不应当包含彼此互补的序列。

[0091] 为了本发明的目的,“SEQ ID No:X中所示的核苷酸序列的互补序列”是可通过按照沙加夫法则( $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ )用它们的互补核苷酸替代核苷酸并且以5'至3'方向,即以所示的核苷酸序列的相反方向读取序列从所示核苷酸序列衍生的核苷酸序列。

[0092] 适用于EE-GM3的引物的实例是SEQ ID No 5(3'侧翼序列识别引物)、SEQ ID No 4(与3'侧翼序列识别引物一起使用的外源DNA识别引物)或SEQ ID No 7(与3'侧翼序列识别引物一起使用的外源DNA识别引物)的寡核苷酸序列。

[0093] 适用于EE-GM3的寡核苷酸引物的其它实例在它们的3'末端包含下列序列或(基本上)由此类序列组成:

[0094] a.5'侧翼序列识别引物:

[0095] -SEQ ID No 2的核苷酸264至核苷酸283的核苷酸序列

- [0096] -SEQ ID No 2的核苷酸266至核苷酸285的核苷酸序列
- [0097] -SEQ ID No 2的核苷酸1240至核苷酸1259的核苷酸序列
- [0098] -SEQ ID No 2的核苷酸265至核苷酸285的核苷酸序列
- [0099] -SEQ ID No 2的核苷酸265至核苷酸283的核苷酸序列
- [0100] -SEQ ID No 2的核苷酸1239至核苷酸1259的核苷酸序列
- [0101] -SEQ ID No 2的核苷酸1241至核苷酸1259的核苷酸序列
- [0102] -SEQ ID No 2的核苷酸1244至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0103] -SEQ ID No 2的核苷酸1248至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0104] -SEQ ID No 2的核苷酸1250至核苷酸1269的核苷酸序列
- [0105] -SEQ ID No 2的核苷酸262至核苷酸279的核苷酸序列
- [0106] -SEQ ID No 2的核苷酸263至核苷酸279的核苷酸序列
- [0107] -SEQ ID No 2的核苷酸264至核苷酸285的核苷酸序列
- [0108] -SEQ ID No 2的核苷酸266至核苷酸283的核苷酸序列
- [0109] -SEQ ID No 2的核苷酸1238至核苷酸1259的核苷酸序列
- [0110] -SEQ ID No 2的核苷酸1242至核苷酸1259的核苷酸序列
- [0111] -SEQ ID No 2的核苷酸1243至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0112] -SEQ ID No 2的核苷酸1245至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0113] -SEQ ID No 2的核苷酸1247至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0114] -SEQ ID No 2的核苷酸1249至核苷酸1269的核苷酸序列
- [0115] -SEQ ID No 2的核苷酸1249至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0116] -SEQ ID No 2的核苷酸263至核苷酸285的核苷酸序列
- [0117] -SEQ ID No 2的核苷酸267至核苷酸283的核苷酸序列
- [0118] -SEQ ID No 2的核苷酸1242至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0119] -SEQ ID No 2的核苷酸1243至核苷酸1259的核苷酸序列-
- [0120] -SEQ ID No 2的核苷酸1246至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0121] -SEQ ID No 2的核苷酸1246至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0122] -SEQ ID No 2的核苷酸1248至核苷酸1269的核苷酸序列
- [0123] -SEQ ID No 2的核苷酸1250至核苷酸1271的核苷酸序列
- [0124] -SEQ ID No 2的核苷酸1250至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0125] -SEQ ID No 2的核苷酸1241至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0126] -SEQ ID No 2的核苷酸1245至核苷酸1267的核苷酸序列
- [0127] -SEQ ID No 2的核苷酸1247至核苷酸1269的核苷酸序列
- [0128] -SEQ ID No 2的核苷酸1247至核苷酸1263的核苷酸序列
- [0129] -SEQ ID No 2的核苷酸1249至核苷酸1271的核苷酸序列
- [0130] -SEQ ID No 2的核苷酸1242至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0131] -SEQ ID No 2的核苷酸1241至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0132] -SEQ ID No 2的核苷酸1243至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0133] -SEQ ID No 2的核苷酸1240至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0134] -SEQ ID No 2的核苷酸1244至核苷酸1261的核苷酸序列

- [0135] -SEQ ID No 2的核苷酸1239至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0136] -SEQ ID No 2的核苷酸1245至核苷酸1261的核苷酸序列
- [0137] b. 与5'侧翼序列识别引物一起使用的外源DNA序列识别引物:
- [0138] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1751的核苷酸序列的互补序列
- [0139] -SEQ ID No 2的核苷酸1735至核苷酸1754的核苷酸序列的互补序列
- [0140] -SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1750的核苷酸序列的互补序列
- [0141] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1750的核苷酸序列的互补序列
- [0142] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1752的核苷酸序列的互补序列
- [0143] -SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1749的核苷酸序列的互补序列
- [0144] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1749的核苷酸序列的互补序列
- [0145] -SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1751的核苷酸序列的互补序列
- [0146] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1753的核苷酸序列的互补序列
- [0147] -SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1748的核苷酸序列的互补序列
- [0148] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1748的核苷酸序列的互补序列
- [0149] -SEQ ID No 2的核苷酸1735至核苷酸1751的核苷酸序列的互补序列
- [0150] -SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1752的核苷酸序列的互补序列
- [0151] -SEQ ID No 2的核苷酸1732至核苷酸1754的核苷酸序列的互补序列
- [0152] SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1747的核苷酸序列的互补序列
- [0153] SEQ ID No 2的核苷酸1731至核苷酸1753的核苷酸序列的互补序列
- [0154] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1746的核苷酸序列的互补序列
- [0155] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1745的核苷酸序列的互补序列
- [0156] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1747的核苷酸序列的互补序列
- [0157] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1744的核苷酸序列的互补序列
- [0158] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1748的核苷酸序列的互补序列
- [0159] SEQ ID No 2的核苷酸1727至核苷酸1749的核苷酸序列的互补序列
- [0160] SEQ ID No 2的核苷酸1726至核苷酸1745的核苷酸序列的互补序列
- [0161] SEQ ID No 2的核苷酸1726至核苷酸1744的核苷酸序列的互补序列
- [0162] SEQ ID No 2的核苷酸1726至核苷酸1746的核苷酸序列的互补序列
- [0163] SEQ ID No 2的核苷酸1726至核苷酸1747的核苷酸序列的互补序列
- [0164] SEQ ID No 2的核苷酸1726至核苷酸1748的核苷酸序列的互补序列
- [0165] SEQ ID No 2的核苷酸1724至核苷酸1744的核苷酸序列的互补序列
- [0166] SEQ ID No 2的核苷酸1724至核苷酸1745的核苷酸序列的互补序列
- [0167] SEQ ID No 2的核苷酸1724至核苷酸1746的核苷酸序列的互补序列
- [0168] SEQ ID No 2的核苷酸1461至核苷酸1478的核苷酸序列的互补序列
- [0169] SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1686的核苷酸序列的互补序列
- [0170] SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1486的核苷酸序列的互补序列
- [0171] -SEQ ID No 2的核苷酸1508至核苷酸1527的核苷酸序列的互补序列
- [0172] -SEQ ID No 2的核苷酸1667至核苷酸1686的核苷酸序列的互补序列
- [0173] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1687的核苷酸序列的互补序列

- [0174] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1689的核苷酸序列的互补序列
- [0175] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1704的核苷酸序列的互补序列
- [0176] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1705的核苷酸序列的互补序列
- [0177] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1709的核苷酸序列的互补序列
- [0178] -SEQ ID No 2的核苷酸1467至核苷酸1486的核苷酸序列的互补序列
- [0179] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1497的核苷酸序列的互补序列
- [0180] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1498的核苷酸序列的互补序列
- [0181] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1507的核苷酸序列的互补序列
- [0182] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1508的核苷酸序列的互补序列
- [0183] -SEQ ID No 2的核苷酸1672至核苷酸1688的核苷酸序列的互补序列
- [0184] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1690的核苷酸序列的互补序列
- [0185] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1691的核苷酸序列的互补序列
- [0186] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1706的核苷酸序列的互补序列
- [0187] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1707的核苷酸序列的互补序列
- [0188] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1708的核苷酸序列的互补序列
- [0189] -SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1487的核苷酸序列的互补序列
- [0190] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1499的核苷酸序列的互补序列
- [0191] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1505的核苷酸序列的互补序列
- [0192] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1506的核苷酸序列的互补序列
- [0193] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1507的核苷酸序列的互补序列
- [0194] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1508的核苷酸序列的互补序列
- [0195] -SEQ ID No 2的核苷酸1666至核苷酸1686的核苷酸序列的互补序列
- [0196] -SEQ ID No 2的核苷酸1667至核苷酸1687的核苷酸序列的互补序列
- [0197] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1688的核苷酸序列的互补序列
- [0198] -SEQ ID No 2的核苷酸1672至核苷酸1689的核苷酸序列的互补序列
- [0199] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1707的核苷酸序列的互补序列
- [0200] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1709的核苷酸序列的互补序列
- [0201] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1710的核苷酸序列的互补序列
- [0202] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1500的核苷酸序列的互补序列
- [0203] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1509的核苷酸序列的互补序列
- [0204] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1689的核苷酸序列的互补序列
- [0205] -SEQ ID No 2的核苷酸1672至核苷酸1690的核苷酸序列的互补序列
- [0206] -SEQ ID No 2的核苷酸1672至核苷酸1691的核苷酸序列的互补序列
- [0207] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1705的核苷酸序列的互补序列
- [0208] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1706的核苷酸序列的互补序列
- [0209] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1710的核苷酸序列的互补序列
- [0210] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1488的核苷酸序列的互补序列
- [0211] -SEQ ID No 2的核苷酸1488至核苷酸1507的核苷酸序列的互补序列
- [0212] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1510的核苷酸序列的互补序列

[0213] -SEQ ID No 2的核苷酸1495至核苷酸1512的核苷酸序列的互补序列  
[0214] -SEQ ID No 2的核苷酸1495至核苷酸1513的核苷酸序列的互补序列  
[0215] -SEQ ID No 2的核苷酸1495至核苷酸1514的核苷酸序列的互补序列  
[0216] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1692的核苷酸序列的互补序列  
[0217] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1694的核苷酸序列的互补序列  
[0218] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1695的核苷酸序列的互补序列  
[0219] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1696的核苷酸序列的互补序列  
[0220] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1703的核苷酸序列的互补序列  
[0221] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1704的核苷酸序列的互补序列  
[0222] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1711的核苷酸序列的互补序列  
[0223] -SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1488的核苷酸序列的互补序列  
[0224] -SEQ ID No 2的核苷酸1488至核苷酸1506的核苷酸序列的互补序列  
[0225] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1511的核苷酸序列的互补序列  
[0226] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1690的核苷酸序列的互补序列  
[0227] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1697的核苷酸序列的互补序列  
[0228] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1709的核苷酸序列的互补序列  
[0229] -SEQ ID No 2的核苷酸1467至核苷酸1487的核苷酸序列的互补序列  
[0230] -SEQ ID No 2的核苷酸1488至核苷酸1508的核苷酸序列的互补序列  
[0231] -SEQ ID No 2的核苷酸1495至核苷酸1511的核苷酸序列的互补序列  
[0232] -SEQ ID No 2的核苷酸1491至核苷酸1512的核苷酸序列的互补序列  
[0233] -SEQ ID No 2的核苷酸1666至核苷酸1687的核苷酸序列的互补序列  
[0234] -SEQ ID No 2的核苷酸1667至核苷酸1688的核苷酸序列的互补序列  
[0235] -SEQ ID No 2的核苷酸1672至核苷酸1692的核苷酸序列的互补序列  
[0236] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1693的核苷酸序列的互补序列  
[0237] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1707的核苷酸序列的互补序列  
[0238] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1490的核苷酸序列的互补序列  
[0239] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1491的核苷酸序列的互补序列  
[0240] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1501的核苷酸序列的互补序列  
[0241] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1509的核苷酸序列的互补序列  
[0242] -SEQ ID No 2的核苷酸1495至核苷酸1515的核苷酸序列的互补序列  
[0243] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1691的核苷酸序列的互补序列  
[0244] -SEQ ID No 2的核苷酸1673至核苷酸1694的核苷酸序列的互补序列  
[0245] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1698的核苷酸序列的互补序列  
[0246] -SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1489的核苷酸序列的互补序列  
[0247] -SEQ ID No 2的核苷酸1667至核苷酸1689的核苷酸序列的互补序列  
[0248] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1708的核苷酸序列的互补序列  
[0249] -SEQ ID No 2的核苷酸1688至核苷酸1710的核苷酸序列的互补序列  
[0250] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1711的核苷酸序列的互补序列  
[0251] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1492的核苷酸序列的互补序列

- [0252] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1510的核苷酸序列的互补序列
- [0253] -SEQ ID No 2的核苷酸1666至核苷酸1688的核苷酸序列的互补序列
- [0254] -SEQ ID No 2的核苷酸1687至核苷酸1709的核苷酸序列的互补序列
- [0255] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1712的核苷酸序列的互补序列
- [0256] -SEQ ID No 2的核苷酸1467至核苷酸1488的核苷酸序列的互补序列
- [0257] -SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1490的核苷酸序列的互补序列
- [0258] -SEQ ID No 2的核苷酸1488至核苷酸1509的核苷酸序列的互补序列
- [0259] -SEQ ID No 2的核苷酸1489至核苷酸1511的核苷酸序列的互补序列
- [0260] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1699的核苷酸序列的互补序列
- [0261] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1493的核苷酸序列的互补序列
- [0262] -SEQ ID No 2的核苷酸1472至核苷酸1494的核苷酸序列的互补序列
- [0263] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1502的核苷酸序列的互补序列
- [0264] -SEQ ID No 2的核苷酸1670至核苷酸1692的核苷酸序列的互补序列
- [0265] -SEQ ID No 2的核苷酸1469至核苷酸1491的核苷酸序列的互补序列
- [0266] -SEQ ID No 2的核苷酸1488至核苷酸1510的核苷酸序列的互补序列
- [0267] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1712的核苷酸序列的互补序列
- [0268] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1713的核苷酸序列的互补序列
- [0269] -SEQ ID No 2的核苷酸1692至核苷酸1714的核苷酸序列的互补序列
- [0270] -SEQ ID No 2的核苷酸1467至核苷酸1489的核苷酸序列的互补序列
- [0271] -SEQ ID No 2的核苷酸1678至核苷酸1700的核苷酸序列的互补序列
- [0272] -SEQ ID No 2的核苷酸1481至核苷酸1503的核苷酸序列的互补序列
- [0273] -SEQ ID No 2的核苷酸1691至核苷酸1713的核苷酸序列的互补序列
- [0274] c.3'侧翼序列识别引物:
- [0275] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸847的核苷酸序列的互补序列
- [0276] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸849的核苷酸序列的互补序列
- [0277] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸846的核苷酸序列的互补序列
- [0278] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸848的核苷酸序列的互补序列
- [0279] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸848的核苷酸序列的互补序列
- [0280] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸850的核苷酸序列的互补序列
- [0281] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸845的核苷酸序列的互补序列
- [0282] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸847的核苷酸序列的互补序列
- [0283] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸849的核苷酸序列的互补序列
- [0284] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸851的核苷酸序列的互补序列
- [0285] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸844的核苷酸序列的互补序列
- [0286] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸846的核苷酸序列的互补序列
- [0287] -SEQ ID No 3的核苷酸828至核苷酸850的核苷酸序列的互补序列
- [0288] -SEQ ID No 3的核苷酸830至核苷酸852的核苷酸序列的互补序列
- [0289] -SEQ ID No 3的核苷酸992至核苷酸1009的核苷酸序列的互补序列
- [0290] -SEQ ID No 3的核苷酸731至核苷酸752的核苷酸序列的互补序列

- [0291] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸795的核苷酸序列的互补序列
- [0292] -SEQ ID No 3的核苷酸731至核苷酸753的核苷酸序列的互补序列
- [0293] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸794的核苷酸序列的互补序列
- [0294] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸796的核苷酸序列的互补序列
- [0295] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸793的核苷酸序列的互补序列
- [0296] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸797的核苷酸序列的互补序列
- [0297] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸792的核苷酸序列的互补序列
- [0298] -SEQ ID No 3的核苷酸776至核苷酸798的核苷酸序列的互补序列
- [0299] -SEQ ID No 3的核苷酸733至核苷酸752的核苷酸序列的互补序列
- [0300] -SEQ ID No 3的核苷酸733至核苷酸753的核苷酸序列的互补序列
- [0301] -SEQ ID No 3的核苷酸733至核苷酸754的核苷酸序列的互补序列
- [0302] -SEQ ID No 3的核苷酸733至核苷酸755的核苷酸序列的互补序列
- [0303] -SEQ ID No 3的核苷酸838至核苷酸854的核苷酸序列的互补序列
- [0304] -SEQ ID No 3的核苷酸246至核苷酸263的核苷酸序列的互补序列
- [0305] -SEQ ID No 3的核苷酸838至核苷酸855的核苷酸序列的互补序列
- [0306] -SEQ ID No 3的核苷酸245至核苷酸264的核苷酸序列的互补序列
- [0307] d. 与3'侧翼序列识别引物一起使用的外源DNA序列识别引物:
- [0308] -SEQ ID No 3的核苷酸173至核苷酸192的核苷酸序列
- [0309] -SEQ ID No 3的核苷酸22至核苷酸41的核苷酸序列
- [0310] -SEQ ID No 3的核苷酸172至核苷酸192的核苷酸序列
- [0311] -SEQ ID No 3的核苷酸174至核苷酸192的核苷酸序列
- [0312] -SEQ ID No 3的核苷酸191至核苷酸210的核苷酸序列
- [0313] -SEQ ID No 3的核苷酸171至核苷酸192的核苷酸序列
- [0314] -SEQ ID No 3的核苷酸175至核苷酸192的核苷酸序列
- [0315] -SEQ ID No 3的核苷酸190至核苷酸210的核苷酸序列
- [0316] -SEQ ID No 3的核苷酸192至核苷酸210的核苷酸序列
- [0317] -SEQ ID No 3的核苷酸176至核苷酸192的核苷酸序列
- [0318] -SEQ ID No 3的核苷酸189至核苷酸210的核苷酸序列
- [0319] -SEQ ID No 3的核苷酸193至核苷酸210的核苷酸序列
- [0320] -SEQ ID No 3的核苷酸188至核苷酸210的核苷酸序列
- [0321] -SEQ ID No 3的核苷酸194至核苷酸210的核苷酸序列
- [0322] -SEQ ID No 3的核苷酸199至核苷酸218的核苷酸序列
- [0323] -SEQ ID No 3的核苷酸200至核苷酸218的核苷酸序列
- [0324] -SEQ ID No 3的核苷酸197至核苷酸218的核苷酸序列
- [0325] -SEQ ID No 3的核苷酸201至核苷酸218的核苷酸序列
- [0326] -SEQ ID No 3的核苷酸201至核苷酸220的核苷酸序列
- [0327] -SEQ ID No 3的核苷酸200至核苷酸220的核苷酸序列
- [0328] -SEQ ID No 3的核苷酸199至核苷酸220的核苷酸序列
- [0329] -SEQ ID No 3的核苷酸200至核苷酸221的核苷酸序列

[0330] -SEQ ID No 3的核苷酸199至核苷酸221的核苷酸序列

[0331] -SEQ ID No 3的核苷酸150至核苷酸172的核苷酸序列

[0332] 适用于鉴定EE-GM1的PCR引物已描述于W02006/108674中,特别是在第8页第4行至第26页第7行(通过引用并入本文)。

[0333] 适用于鉴定EE-GM2的PCR引物已描述于W02006/108675中,特别是在第8页第4行至第33页第4行(通过引用并入本文)。

[0334] 如本文中所用,“SEQ ID No.Z的位置X至位置Y的核苷酸序列”表示包含两个核苷酸终点的核苷酸序列。

[0335] 优选地,扩增片段具有50至500个核苷酸的长度,例如,100至350个核苷酸的长度。特异性引物可具有分别与原种事件以及原种事件的外源DNA的5'或3'侧翼区域内的序列具有80至100%的同一性的序列,只要错配仍然允许在最优化的PCR条件下利用这些引物特异性鉴定所述原种事件。然而可允许的错配的范围可由本领域技术人员凭经验容易地确定或对于本领域技术人员来说是已知的。

[0336] 整合片段的检测可以以各种方式进行,例如通过凝胶分析后进行大小评估。还可对整合片段进行直接测序。用于检测扩增的DNA片段的其它序列特异性方法在本领域也是已知的。

[0337] 由于引物的序列及其在基因组中的相对位置对于原种事件是独特的,因此整合片段的扩增将只在包含原种事件(的核酸)的生物样品中发生。优选地,当进行PCR以鉴定原种事件EE-GM3和EE-GM1或原种事件EE-GM3和EE-GM2在未知样品中的存在时,将对照包括在一组引物中,可利用所述引物扩增所述事件的植物物种的“管家基因”内的片段。管家基因是在大多数细胞类型中表达并且与对于所有细胞是共同的基础代谢活性有关的基因。优选地,从管家基因扩增的片段大于扩增的整合片段。取决于待分析的样品,可包括其它对照。

[0338] 标准PCR方案描述于本领域中,例如描述于'PCR扩增手册'(Roche Molecular Biochemicals,第2版,1999)和其它参考资料中。在针对每一个原种事件的“PCR(或聚合酶链式反应)鉴定方案”中指定了用于PCR的最佳条件,包括特异性引物的序列。然而应理解,针对具体的实验条件可能需要调整PCR鉴定方案的许多参数,或略微改变所述参数以获得相似的结果。例如,使用不同的方法制备DNA可能需要调整例如所使用的引物、聚合酶的量 and 退火条件。类似地,其它引物的选择可确定用于PCR鉴定方案的其它最佳条件。然而这些调整对于本领域技术人员来说是显然的,并且在现有PCR应用手册例如上文中引用的手册中进行进一步详细说明。

[0339] 或者,特异性引物可用于扩增可用作用于鉴定生物样品中的EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的“特异性探针”的整合片段。在允许探针与样品核酸中的它们的对应片段杂交的条件下将生物样品的核酸与探针接触,导致核酸/探针杂交体的形成。可检测(例如通过核酸或探针的标记)这类杂交体的形成,其中这类杂交体的形成表示存在EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2。基于与特异性探针(在固相载体上或在溶液中)杂交的此类鉴定方法已在本领域中进行了描述。特异性探针优选是在最优化条件下与原种事件的5'或3'侧翼区域内的区域(优选还包含与其邻接的外源DNA的部分(在下文中称为“特异性区域”))特异性杂交的序列。优选,特异性探针包含与特异性区域的核苷酸序列具有至少80%、优选80至85%、更优选85至90%、特别优选90至95%、最优选95%至100%的同一性(或互补)的50至



500bp, 优选100至350bp的序列。优选地, 所述特异性探针将包含与原种事件特异性区域具有同一性(或互补)的约15至约100个连续核苷酸的序列。

[0340] 此外, 还可使用本文中提供的原种事件特异性序列信息来开发对于原种事件EE-GM3和EE-GM1或对于原种事件EE-GM3和EE-GM2是特异的检测方法, 所述方法与基于PCR的扩增法不同。此类替代检测方法包括基于特定核酸结构的侵入切割(invasive cleavage)的线性信号放大检测法, 也称为Invader<sup>TM</sup>技术(如例如美国专利5,985,557“*Invasive Cleavage of Nucleic Acids*”, 6,001,567“*Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage*”中所描述的, 通过引用并入本文)。为了利用该方法进行EE-GM3检测, 靶序列可与包含SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1469的核苷酸序列或其互补序列的标记的第一核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸223至核苷酸240的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 并且还可与包含SEQ ID No 2的核苷酸1434至核苷酸1451的核苷酸序列或其互补序列的第二核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸258的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 其中所述第一寡核苷酸与第二寡核苷酸重叠至少一个寡核苷酸。通过该杂交产生的双链体或三链体结构允许利用酶(Cleavase<sup>®</sup>)进行选择性的探针切割, 从而使靶序列保持完整。随后可能地通过导致进一步信号放大的中间步骤检测切割的标记探针。为了利用该方法进行EE-GM1检测, 靶序列可与包含SEQ ID No 12的核苷酸210至核苷酸227的核苷酸序列或其互补序列的标记的第一核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 13的核苷酸561至核苷酸568的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 并且还可与包含SEQ ID No 12的核苷酸192至核苷酸209的核苷酸序列或其互补序列的第二核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸586的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 其中所述第一寡核苷酸与第二寡核苷酸重叠至少一个寡核苷酸。通过该杂交产生的双链体或三链体结构允许利用酶(Cleavase<sup>®</sup>)进行选择性的探针切割, 从而使靶序列保持完整。随后可能地通过导致进一步信号放大的中间步骤检测切割的标记探针。为了利用该方法进行EE-GM2检测, 靶序列可与包含SEQ ID No 14的核苷酸312至核苷酸329的核苷酸序列或其互补序列的标记的第一核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 15的核苷酸490至核苷酸507的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 并且还可与包含SEQ ID No 14的核苷酸294至核苷酸311的核苷酸序列或其互补序列的第二核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸525的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交, 其中所述第一寡核苷酸与第二寡核苷酸重叠至少一个寡核苷酸。通过该杂交产生的双链体或三链体结构允许利用酶(Cleavase<sup>®</sup>)进行选择性的探针切割, 从而使靶序列保持完整。随后可能地通过导致进一步信号放大的中间步骤检测切割的标记探针。

[0341] 如本文中所用, “试剂盒”是指为了进行本发明的方法, 更具体地, 鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3或确定包含EE-GM3的植物材料的接合性状态而使用的一组试剂。更具体地, 本发明的试剂盒的优选实施方案包括至少一个或两个如上所述用于鉴定原种事件的特异性引物, 或用于确定接合性状态的三个特异性引物。任选地, 试剂盒还可包括本文中描述的用于PCR鉴定方案的任何其它试剂。或者, 根据本发明的另一个实施方案, 试剂盒可包括上述特异性探针, 其与生物样品的核酸特异性杂交以鉴定EE-GM3存在于其中。任选地, 试剂

盒还可包括用于使用特异性探针鉴定生物样品中的EE-GM3的任何其它试剂(例如但不限于杂交缓冲液、标记物)。

[0342] 为了进行质量控制(例如,种子批的纯度)、检测原种事件在植物材料或包含或来源于植物材料(例如但不限于食品或饲料产品)中的存在或不存在,可使用本发明的试剂盒,并且特别地可调整其组分。

[0343] 如本文中所用,关于核苷酸序列(DNA或RNA)的“序列同一性”是指具有相同核苷酸的位置的数目除以两个序列的较短者中的核苷酸序列的数目。利用Wilbur和Lipmann算法(Wilbur和Lipmann,1983,Proc.Nat.Acad.Sci.USA80:726),使用20个核苷酸的窗口大小、4个核苷酸的字长以及为4的空位罚分进行两个核苷酸序列的比对。可以例如使用Genetics Computer Group的序列分析软件包(GCG,University of Wisconsin Biotechnology Center)方便地进行序列数据的计算机辅助分析和解释,包括上文中描述的序列比对。当此类序列具有至少约75%、特别地至少约80%、更特别地至少约85%、更特别地至少约90%、特别地至少约95%、更特别地至少约98%或至少约99%的序列同一性时,序列被标示为“基本上相似”。很清楚,当RNA序列被认为与DNA基本上相似或与DNA序列具有一定程度的序列同一性时,DNA序列中的胸苷(T)被认为等同于RNA序列中的尿嘧啶(U)。同样地,很清楚小的差异或突变可随着时间过去在DNA序列中出现并且对于本发明的事件特异性引物或探针可允许一些错配,这样在本文中在本发明的任何实施方案中对于本发明的任何3'或5'侧翼DNA或任何插入物或外源DNA或任何引物或探针指定的任何DNA序列,也包括基本上与本文中提供的序列相似的序列,例如与本发明的任何3'或5'侧翼DNA、任何引物或探针或任何插入物或外源DNA的给定的序列杂交或与所述序列具有至少90%、95%、96%、97%、98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0344] 如本文中所用,术语“引物”包括能够以模板依赖性方法例如PCR引发新生核酸的合成任何核酸。通常地,引物是10至30个核苷酸的寡核苷酸,但可使用更长的序列。可以以双链形式提供引物,尽管单链形式是优选的。探针可用作引物,但被设计用以结合靶DNA或RNA并且无需用于扩增过程中。

[0345] 如本文中所用,当指特异性引物时,术语“识别”是指特异性引物在方法中所示的条件(例如PCR鉴定方案的条件)下与原始事件的核酸序列特异性杂交的事实,其中通过阳性对照和阴性对照的存在确定特异性。

[0346] 如本文中所用,术语“杂交”当指特异性探针时,是指探针在标准严格条件下结合原种事件的核酸序列特异性区域的事实。如本文中所用,标准严格条件是指本文中描述的用于杂交的条件或指如由Sambrook等,1989(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)描述的常规杂交条件,所述杂交条件例如可包括下列步骤:1)将植物基因组DNA片段固定在滤膜上,2)将滤膜在42℃下于50%甲酰胺、5X SSPE、2X Denhardt's试剂和0.1%SDS中预杂交1或2小时,或在68℃下于6X SSC、2X Denhardt's试剂和0.1%SDS中预杂交1至2小时,3)添加已被标记的杂交探针,4)温育16至24小时,5)在室温下于1X SSC、0.1%SDS中洗涤滤膜20分钟,6)在68℃下于0.2X SSC、0.1%SDS中洗涤滤膜3次,每次20分钟,和7)使用增感屏,将滤膜在-70℃下暴露于X-射线胶片24至48小时。

[0347] 如本文中所用,生物样品是植物、植物材料或包含植物材料的产物的样品。术语

“植物”意欲包括处于任何成熟阶段的大豆(大豆)植物组织以及获自或来源于任何这样的植物的任何细胞、组织或器官,包括但不限于任何种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。如本文中所用,“植物材料”是指获自或来源于植物的材料。包含植物材料的产物涉及食品、饲料或使用植物材料产生的或可被植物材料污染的其它产物。应理解,在本发明的说明书中,测试此类生物样品的对于EE-GM3、EE-GM1和EE-GM2有特异性的核酸的存在,所述核酸的存在暗示着核酸在样品中的存在。因此本文中提及的用于鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3和EE-GM2或EE-GM3和EE-GM1的方法涉及鉴定生物样品中的包含原种事件的核酸。

[0348] 如本文中所用,“包含”将解释为指定提及的所述特征、整数、步骤、试剂或组分的存在,但不排除一个或多个特征、整数、步骤或组合分或其组群的存在或添加。因此,例如,包含核苷酸或氨基酸的序列的核酸或蛋白质可包含比实际上引述的核苷酸或氨基酸更多的核苷酸或氨基酸,即包括在更大的核酸或蛋白质中。包含功能或结构上确定的DNA序列的嵌合基因可包含额外的DNA序列,例如启动子和转录终止序列。

[0349] 本发明还涉及在大豆中进行的一堆原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1或一堆原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2的开发,包含一堆此类事件的植物,从这些植物获得的后代以及来源于包含这些堆的植物的植物细胞或植物材料。可如实施例1中所述获得包含原种事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的植物。可使用常规繁育法将包含单个事件的植物杂交,然后鉴定其包含两个不同事件的后代来获得堆。

[0350] 可按照实施例2中针对EE-GM3和EE-GM1所描述的PCR鉴定方案鉴定包含EE-GM3和EE-GM1的大豆植物或植物材料。简而言之,使用特异性识别EE-GM3的5' 或3' 侧翼序列内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:5的序列的引物和识别外源DNA内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:4的序列的引物,以及还使用特异性识别EE-GM1的5' 或3' 侧翼序列内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:16的序列的引物和识别外源DNA内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:17的序列的引物通过PCR扩增存在于生物样品中的大豆基因组DNA。

[0351] 可按照实施例2中针对EE-GM3和EE-GM2所描述的PCR鉴定方案鉴定包含EE-GM3和EE-GM2的大豆植物或植物材料。简而言之,使用特异性识别EE-GM3的5' 或3' 侧翼序列内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:5的序列的引物和识别外源DNA内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:4的序列的引物,以及还使用特异性识别EE-GM2的5' 或3' 侧翼序列内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:18的序列的引物和识别外源DNA内的序列的引物例如具有SEQ ID NO:19的序列的引物通过PCR扩增存在于生物样品中的大豆基因组DNA。

[0352] 扩增内源大豆序列的部分的DNA引物用作PCR扩增的阳性对照。当进行PCR扩增时,材料产生预期大小的片段,材料包含来自具有原种事件EE-GM3和EE-GM1的大豆植物或来自具有原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆植物的植物材料。

[0353] 具有EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的植物的特征在于它们的草甘膦抗性,以及在于它们对HPPD抑制剂例如异噁唑草酮的抗性以及还在于它们对草铵膦的抗性。具有事件堆的植物的特征也在于在除草剂应用不存在的情况下具有可与商购获得的大豆品种相比较的农艺特征。已观察到,外源DNA在本文中描述的大豆植物基因组的插入区域中的存在赋予了包含该事件的植物特别令人感兴趣的表型和分子特征。

[0354] 本发明的一个实施方案在大豆植物中提供了可通过在大豆基因组的特定位置插

入转基因获得的原种事件EE-GM3和EE-GM1和/或EE-GM2的组合,所述原种事件赋予此类大豆植物对草甘膦、草胺膦和HPPD抑制剂除草剂例如异噁唑草酮的抗性,其中与等基因系相比较(如本文中所用,“等基因系”或“近等基因系”是具有相同遗传背景但不存在转基因的大豆品系,例如具有与用于转化的植物相同的遗传背景的植物,或已失去转基因的分离姊妹系),此类原种事件对此类大豆的农艺性状不产生负面影响此类大豆植物的产量的任何影响。具体地,本发明在大豆植物中提供了原种事件EE-GM3和EE-GM1和/或EE-GM2的组合,其中与等基因系相比较,所述原种事件在此类大豆植物的基因组中的插入或存在在此类大豆植物中不引起增加对疾病的易感性,不引起产量抑制现象,或不引起增强的倒伏。因此,本发明在大豆植物中提供了称为EE-GM3和EE-GM1和/或EE-GM2的原种事件的组合,所述组合产生可耐受草甘膦、草胺膦和HPPD抑制剂除草剂(同时或单独地)的施用而与等基因系相比较不负面影响所述大豆植物的产量的大豆植物,所述大豆植物在它们的疾病易感性或倒伏方面与等基因大豆植物相比较不具有统计上显著的差异。这些特征使得原种事件的现有组合对控制大豆田中的耐草甘膦的杂草极具吸引力,并且还可用于在大豆田中防止或延迟其它耐草甘膦的发展(例如,通过施用草甘膦和异噁唑草酮和/或草胺膦,或通过施用异噁唑草酮和草甘膦和/或草胺膦,或通过施用草胺膦和草甘膦和/或异噁唑草酮,确保至少2个或甚至3个不同作用模式的除草剂施用于大豆田)。

[0355] 本文中还提供了包含事件EE-GM3和原种事件EE-GM1或EE-GM2的大豆植物或其部分,其中包含事件EE-GM3的代表性大豆种子已于NCIMB登录号41659下保藏,包含原种事件EE-GM1的代表性大豆种子已于登录号NCI MB 41658下保藏在NCIMB,包含原种事件EE-GM2的代表性种子已于登录号NCIMB 41660下保藏在NCIMB,包含事件EE-GM3和EE-GM1的代表性大豆种子已于登录号PTA-11041下保藏在ATCC,包含事件EE-GM3和EE-GM2的代表性大豆种子已于登录号PTA-11042下保藏在ATCC。

[0356] 可通过本领域可获得的任何方法,包括通过将来自保藏的种子的植物杂交,收集其后代,然后鉴定包含原种事件的适当组合的后代植物将各个原种事件(如可见于各自保藏的种子中的)组合来获得包含EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的大豆植物或其部分。本文中还提供了包含此类事件的此类植物的种子以及从此类种子产生的大豆产物,其中所述大豆产物包含事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2。此类大豆产物可以是膳食、磨碎的种子、粉末、薄片等或可包括所述形式。特别地,这样的大豆产物包含产生诊断事件EE-GM3和原种事件EE-GM1或EE-GM2的扩增子,例如包含SEQ ID No.2或3、SEQ ID No.14或15和/或SEQ ID No.12或13的扩增子的核酸。本文中还提供了用于产生大豆产物的方法,包括获得包含事件EE-GM3和原种事件EE-GM1或EE-GM2的大豆种子,和从其产生这样的大豆产物。

[0357] 本文中还提供了大豆植物,其为任何上述大豆植物的后代,并且包含事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2。

[0358] 本文中还提供了用于产生耐草甘膦和/或草胺膦和/或异噁唑草酮除草剂的大豆植物的方法,其包括:具体地通过将包含事件EE-GM3的第一大豆植物与包含EE-GM1和/或EE-GM2的大豆植物杂交,然后选择耐草甘膦和/或草胺膦和/或异噁唑草酮的后代植物来将事件EE-GM3和事件EE-GM1或EE-GM2引入这样的植物的基因组。

[0359] 本文中还提供了耐草甘膦和草胺膦和/或异噁唑草酮植物,所述植物明确地不具有产量抑制现象,具有可接受的农艺特征,包含2mEPSPS、HPPD和PAT蛋白,并且能够产生诊

断事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的扩增子。

[0360] 本文中还提供了用于控制包含事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的大豆植物的田中或待种植此类大豆植物的田中的杂草的方法,包括用有效量的基于异噁唑草酮、基于草甘膦和/或草铵膦的除草剂处理田,其中此类植物抗此类除草剂。

[0361] 本文中还提供了包含EE-GM3和EE-GM1的大豆植物、细胞、组织或种子,其特征在于在其细胞的基因组中包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.3的核苷酸220至261具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列或所述序列的互补序列,以及还包含与SEQ ID No.12的核苷酸199至220具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.13的核苷酸558至579具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列或所述序列的互补序列。

[0362] 本文中还提供了包含EE-GM3和EE-GM2的大豆植物、细胞、组织或种子,其特征在于在其细胞的基因组中包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.3的核苷酸220至261具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列或所述序列的互补序列,以及还有与SEQ ID No.14的核苷酸301至322具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.15的核苷酸497至518具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列或所述序列的互补序列。

[0363] 如本文中所用,术语“异噁唑草酮”是指除草剂异噁唑草酮[即(5-环丙基-4-异噁唑基)[2-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯基]甲酮],其活性代谢物二酮腈以及包含所述化合物的任何混合物或溶液。对于对包含本发明的事件的植物的应用是有用的HPPD抑制性除草剂为二酮腈,例如2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲磺酰-4-三氟甲基苯基)-丙烷-1,3-二酮和2-氰基-1-[4-(甲磺酰基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙烷-1,3-二酮;其它异噁唑类;和吡唑啉盐类,例如苯吡唑草酮[即[3-(4,5-二氢-3-异噁唑基)-2-甲基-4-(甲磺酰基)苯基](5-羟基-1-甲基-1H-吡唑-4-基)甲酮],和磺酰草吡唑(pyrasulfotole)[(5-羟基-1,3-二甲基吡唑-4-基(2-甲磺酰-4-三氟甲基苯基)甲酮];或盐酸苯偶氮吡胺[2-[4-(2,4-二氯苯甲酰基)-1,3-二甲基吡唑-5-基氧基]乙酰苯]。

[0364] 在本发明的一个实施方案中,在种植大豆植物或播种之前,可用HPPD抑制剂除草剂例如异噁唑草酮('IFT')处理待种植包含EE-GM3事件的大豆植物的田,所述除草剂可清除田中可被HPPD抑制剂杀死的杂草,从而使得能够实施免耕,然后,随后在该相同的预处理的田上种植或播种大豆(使用HPPD抑制剂除草剂的烧毁应用)。IFT的残余活性还将保护正在出芽和生长的大豆植物在早期生长阶段免受杂草的竞争。一旦大豆植物具有一定的大小,并且杂草有趋势重现,则可将草甘膦或HPPD抑制剂-草甘膦混合物作为芽后除草剂在植物的顶部上方施用。

[0365] 在本发明的另一个实施方案中,可在大豆植物出芽前但在种子播种后(可在播种前使用其它方法,通常地常规耕地实践例如耕犁、凿式耕犁(chissel ploughing)或苗床准备使田间无杂草),用HPPD抑制剂除草剂例如IFT处理其中播种了包含EE-GM3事件的种子的田,其中残余活性将使田间保持无被除草剂杀死的杂草,以便正在出芽和生长的大豆植物没有杂草竞争(HPPD抑制剂除草剂的芽后施用)。一旦大豆植物具有一定的大小,并且杂草

有趋势重现,则可将草甘膦—或HPPD抑制剂—草甘膦混合物—作为芽后除草剂在植物的顶部上方施用。

[0366] 在本发明的另一个实施方案中,可在大豆植物(已从播种的种子出芽)的顶部上方用HPPD抑制剂除草剂例如IFT处理包含EE-GM3事件的植物,这可清除田中可被HPPD抑制剂杀死的杂草,可将该应用与利用作为芽后除草剂的草甘膦的处理一起(例如,在喷雾罐混合物中),在其之前或之后于植物的顶部上方施用(HPPD抑制剂除草剂(具有或不具有草甘膦)的芽后施用)。

[0367] 同样地,根据本发明,可用下列杀虫剂、除草剂或杀真菌剂处理具有EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2的大豆植物,或可用包含下列杀虫剂、除草剂或杀真菌剂的种子包衣包被具有EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2的大豆种子:

[0368] 大豆除草剂:

[0369] 甲草胺(Alachlor)、苯达松(Bentazone)、氟乐灵(Trifluralin)、氯嘧磺隆(Chlorimuron-Ethyl)、氯酯磺草胺(Cloransulam-Methyl)、噁唑禾草灵(Fenoxaprop)、氟磺胺草醚(Fomesafen)、吡氟禾草灵(Fluazifop)、草甘膦、甲氧咪草烟(Imazamox)、灭草唑(Imazaquin)、咪草烟(Imazethapyr)、(S-) 丙草胺(Metolachlor)、嗪草酮(Metribuzin)、二甲戊灵(Pendimethalin)、得杀草(Tepraloxydim)、异噁唑草酮、草铵膦。

[0370] 大豆杀虫剂:

[0371]  $\lambda$ -三氟氯氰菊酯(cyhalothrin)、灭多威(Methomyl)、对硫磷(Parathion)、硫双威(Thiocarb)、吡虫啉(Imidacloprid)、氯虫酰肼(Clothianidin)、噻虫嗪(Thiamethoxam)、噻虫啉(Thiacloprid)、啉虫脒(Acetamiprid)、呋虫胺(Dinotofuran,)、氟虫酰胺(Flubendiamide)、Rynaxypyr、Cyazypyr、多杀菌素(Spinosad)、乙基多杀菌素(Spinotoram)、埃玛菌素(Emamectin-Benzate)、氟虫腈(Fipronil)、乙虫腈(Ethiprole)、溴氰菊酯(Deltamethrin)、 $\beta$ -氟氯氰菊酯( $\beta$ -Cyfluthrin)、 $\gamma$ 和 $\lambda$ 三氟氯氰菊酯、4-[[ (6-氯吡啶-3-基) 甲基] (2,2-二氟乙基) 氨基] 呋喃-2 (5H) -酮、螺虫乙酯(Spirotetramat)、螺螨酯(Spinodiclofen)、杀铃脲(Triflumuron)、氟啉虫酰胺(Flonicamid)、硫双威(Thiodicarb)、 $\beta$ -氟氯氰菊酯。

[0372] 大豆杀真菌剂:

[0373] 腈嘧菌酯(Azoxystrobin)、环丙唑醇(Cyproconazole)、氟环唑(Epoconazole)、粉唑醇(Flutriafol)、吡唑醚菌酯(Pyraclostrobin)、戊唑醇(Tebuconazole)、布洛芬、丙硫菌唑(Prothioconazole)、氟醚唑(Tetraconazole)。

[0374] 下列实施例描述了原种事件EE-GM3、EE-GM1和EE-GM2以及包含事件EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的堆的植物的鉴定以及用于特异性鉴定生物样品中的原种事件EE-GM3、EE-GM1或EE-GM2及其堆的工具的开发。

[0375] 除非在实施例中另外指出,否则按照“Sambrook J和Russell DW(编著)(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York”和“Ausubel FA,Brent R,Kingston RE,Moore DD,Seidman JG,Smith JA和Struhl K(编著)(2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley&Sons, New York”中描述的标准方案进行所有重组技术。

[0376] 标准材料和参考资料描述于“Croy RDD(编)(1993) Plant Molecular Biology

LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford”和“Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 第2版, Academic Press, San Diego”中。用于聚合酶链式反应 (PCR) 的标准材料和方法可见于“McPherson MJ and Møller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford”和“PCR Applications Manual, 第3版 (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim或 www.roche-applied-science.com”中。

[0377] 应当理解, 下列实施例中的任何实验室方案例如PCR方案中的许多参数可能需要针对具体实验室条件进行调整, 并且可略作改进以获得相似结果。例如, 使用不同方法制备DNA或在PCR法中选择其它引物可决定用于PCR方案的其它最佳条件。然而这些调整对于本领域技术人员来说是显然的, 并且在现有PCR应用手册中进行进一步说明。

[0378] 在说明书和实施例中, 参考下列序列:

[0379] SEQ ID No.1: 载体pSF10的SalI片段核苷酸序列。

[0380] SEQ ID No.2: 包含侧翼连接EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'区域的核苷酸序列。

[0381] SEQ ID No.3: 包含侧翼连接EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'区域的核苷酸序列。

[0382] SEQ ID No.4: 引物SOY028

[0383] SEQ ID No.5: 引物SOY029

[0384] SEQ ID No.6: 引物SMP187

[0385] SEQ ID No.7: 引物STV019

[0386] SEQ ID No.8: 扩增子的核苷酸序列

[0387] SEQ ID No.9: 用于扩增对照片段的引物1 (SOY01)

[0388] SEQ ID No.10: 用于扩增对照片段的引物的2 (SOY02)

[0389] SEQ ID No.11: pB2/P35SAcK的核苷酸序列

[0390] SEQ ID No.12: 包含侧翼连接EE-GM1中的外源DNA的5'区域的核苷酸序列

[0391] SEQ ID No.13: 包含侧翼连接EE-GM1中的外源DNA的3'区域的核苷酸序列

[0392] SEQ ID No.14: 包含侧翼连接EE-GM2中的外源DNA的5'区域的核苷酸序列

[0393] SEQ ID No.15: 包含侧翼连接EE-GM2中的外源DNA的3'区域的核苷酸序列

[0394] SEQ ID No.16: 引物SOY06

[0395] SEQ ID No.17: 引物SOY07

[0396] SEQ ID No.18: 引物SOY09

[0397] SEQ ID No.19: 引物SOY010

[0398] SEQ ID No.20: EE-GM3中的外源DNA和植物侧翼序列的核苷酸序列

[0399] SEQ ID No.21: 引物SHA 130

[0400] SEQ ID No.22: 引物SHA 178

## 实施例

[0401] 1. 利用耐除草剂基因转化大豆

[0402] 1.1. 包含2mEPSPS和HPPD-Pf-W336嵌合基因的外源DNA的描述

[0403] 质粒pSF10为pUC 19衍生的克隆载体,其包含位于约7.3kb的SalI片段上的嵌合2mepsps基因和嵌合hppd-Pf-W336。两个SalI限制性位点之间包含的DNA的完全说明示于下表1中。核苷酸序列示于SEQ ID No.1中。

[0404] 表1.pSF10的SalI限制性位点之间包含的DNA的核苷酸位置 (SEQ ID No 1)

[0405]

核苷酸位置	取向	说明和参考资料
188-479	互补	3'nos: 包括来自根癌土壤杆菌( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )的pTiT37的T-DNA的胭脂碱合酶基因的3'非翻译区的序列(Depicker 等,1982, <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> , 1, 561-573)
480-1556	互补	hppdPfW336: 通过用色氨酸替代氨基酸甘氨酸336修饰的荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )株A32的4-羟基苯丙酮酸二氧合酶的编码序列,如由Boudec等(2001)美国专利6245968B1
1557-1928	互补	TPotp Y: 最优化的转运肽衍生物的编码序列(位置55被改变成酪氨酸),包含玉蜀黍(玉米)和葵花( <i>Helianthus annuus</i> )(向日葵)的RuBisCO小亚基基因的序列,如由Lebrun等(1996)US5510471所描述的。



[0406]

1929-2069	互补	5'tev: 序列包括烟草蚀纹病毒的前导序列, 如由 Carrington 和 Freed(1990)Journal of Virology, 64, 1590-1597 所描述的。
2070-3359	互补	Ph4a748 ABBC: 序列包括拟南芥的组蛋白 H4 基因的启动子区域, 包含内部复制(Chaboute 等, 1987)Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
3360-4374		Ph4a748: 序列包括拟南芥的组蛋白 H4 基因的启动子区域(Chaboute 等, 1987)Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
4375-4855		内含子 1 h3At: 拟南芥的组蛋白 H3.III 变体的基因 II 的第一个内含子 (Chaubet 等, 1992)Journal of Molecular Biology, 225, 569-574.
4856-5227		TPotp C: 最优化的转运肽的编码序列, 包含玉蜀黍(玉米)和葵花(向日葵)的 RuBisCO 小亚基基因的序列, 如由 Lebrun 等(1996)US5510471 所描述的
5228-6565		2mepsps: 玉蜀黍(玉米)的双突变 5-烯醇-丙酮基莽草酸-3-磷酸合酶基因的编码序列(Lebrun 等, 1997)WO9704103-A 1
6566-7252		3'组蛋白 At: 包括拟南芥的组蛋白 H4 基因的 3'非翻译区的序列(Chaboute 等, 1987)Plant Molecular Biology, 8, 179-191.

[0407] 1.2. 事件EE-GM3

[0408] 通过至大豆类型Jack的细胞内的直接基因转移将约7.3kb的HPLC纯化的SalI线性化的pSF10片段(包含耐2mEPSPS草甘膦基因和耐HPPD抑制剂基因HPPD-Pf-W336)用于获得转化的大豆植物(Nickell, C.D., G.R.Noel, D.J.Thomas和R.Waller.Registration of 'Jack' soybean.Crop Sci 1365.30.1990),然后将转化的植物细胞再生成转基因能育大豆植物。

[0409] 1.2.1原种事件EE-GM3的鉴定

[0410] 基于广泛选择法选择原种事件EE-GM3,所述选择法基于耐除草剂基因的良好表达和稳定性,并且评估其与最佳农艺特征例如株高、节距(height to node)、直立(stand)、活力(vigor)、种子产量的相容性。从使用相同嵌合基因获得的许多不同转化事件选择含有该事件的大豆植物。该事件的选择中使用的参数为:a)对田间试验中异噁唑草酮除草剂施用的可接受的抗性,b)对田间试验中草甘膦除草剂施用的可接受的抗性,c)对田间试验的异噁唑草酮和草甘膦除草剂的组合施用的可接受的抗性,d)耐除草剂转基因在大豆植物基因组的单个基因座上的插入,载体主链不存在,e)与用于转化的亲本植物相似的总体农艺学(成熟度、倒伏、疾病易感性等),和f)无因转化DNA的插入引起的产量抑制现象(与在相同条件下生长的无事件的等基因系例如用于转化的植物品系相比较时)。

[0411] 在T3代,选择大豆转化事件EE-GM3的纯合品系的种子产量。在亲本品种Jack适应

的地区进行多位点重复农艺田间研究 (Multi-location replicated agronomic field study)。田间评估包括除草剂抗性和农艺性状。发现包含EE-GM3的植物的农艺性能与Jack相当(当不施用除草剂时)。

[0412] 田间评估还显示携带EE-GM3事件的植物具有：

[0413] -与Jack相比较相似的植物形态学和种子特征，

[0414] -与Jack相比较对大豆疾病的反应无变化，和

[0415] -与Jack相比较在种子萌发或休眠上无变化。

[0416] 将从温室中的初始转化体(T0)植物(用构建体转化的植物，以产生事件EE-GM3)收获的种子(T1或S1代)种植在田中。种植3个小区，以0、2或4kg/ha草甘膦进行喷施。从显示期望水平的耐除草剂草甘膦的抗性的植物收获种子。

[0417] 将从田间生长的自花授粉T1植物收获的种子(T2代)按“株行(plant to row)”播种。行(完全或部分抗性)和行内个体植物(抗性或敏感性)的分离数据的卡方分析显示EE-GM3的单个插入的预期的孟德尔遗传。

[0418] 继续选择和种子增加直至品系被确定为对于转化事件EE-GM3是纯合的，并且被选择用于在第4代进行核心种子生产。随后，将T5代种子用作开发不同品种的候选者。将第6代(T6代)中的植物在设计用以将事件移入与更广的商业大豆种质基础的基因渗入程序中与常规大豆繁育系(breeding line)杂交。将F1杂交植物(EE-GM3品系x常规品系)生长至成熟，种植F2种子。利用设计用以鉴定EE-GM3插入物的接合性的PCR引物分析901株F2植物的叶样品。观察到按照孟德尔法则进行的单插入分离的1:2:1的预期比率。

[0419] 将选择的事件EE-GM3引入不同的商业遗传背景，比较不同位置上的田间试验的结果。使用不同的处理，用草甘膦除草剂和/或异噁唑草酮除草剂攻击植物。植物展现良好的除草剂抗性。将数百个不同的包含事件EE-GM3的大豆品种用于遗传研究，施用除草剂。随后在田间增加从该试验选择的品系，也用除草剂处理所述品系。从该试验，增加了50个选择的品系，也对这些品系进行除草剂处理。用异噁唑草酮和草甘膦喷施用的较后品系的植物毒性评分显示反应的差异性，但品系间的反应范围反映相似的差异性，如在相同处理和环境条件下生长的原始Jack背景中的EE-GM3事件的4个重复间观察到的。因此，对于包含EE-GM3的植物观察到广泛的种质间的对相关除草剂的抗性。

[0420] 此外，包含事件EE-GM3的植物具有正常的叶、花和荚形态学、优良能育性，并且在多个遗传背景中不显示疾病或异常昆虫易感性。在至多个遗传背景的基因渗入过程中，未观察到异常问题或异常情况。

[0421] 在一个季节中，设计10位置研究以比较包含转化事件EE-GM3的双耐除草剂大豆与转化亲本品种Jack和一些非转基因大豆品种的农艺性状。使用随机化完全区组设计，将EE-GM3植物种植在重复区，使用常规杂草控制或使用期望的除草剂、草甘膦和异噁唑草酮。以70克ai/Ha的目标速率(target rate)用异噁唑草酮除草剂和以1060克ai/Ha的目标速率用草甘膦除草剂喷施具有包含转化事件EE-GM3的大豆植物的小区。在约V4-V5植物生长阶段以叶面喷雾的方式对这些植物施用除草剂。在早、中和晚季进行农艺学观察。Jack和非转基因品种区的植物密度(参数；直立计数(stand count))比事件EE-GM3区中的高一个标准差。早期直立数差异可能是种子批质量的结果，因为EE-GM3播种种子是在反季节苗圃中产生，而非转基因品种的种子是在紧接着的美国正常生产季节产生的。然而，达到50%的萌发

和植物活力评级 (plant vigor rating) 的天数相同, 这表明对于这些性能参数种子批是可比较的。在晚季直立计数中, Jack 和非转基因品种与 EE-GM3 植物保持一个标准差的差异。EE-GM3 事件植物的小区产量也比 Jack 的小区产量低一个标准差, 这可能是由于 EE-GM3 事件小区的更低植物密度的结果。非转基因品种的产量比 Jack 高, 由于在最近的品种中发现的产量潜能的提高, 这是可预期的。

[0422] 在一个试验中, 在3个生长阶段: V4-5、R1 和完全成熟进行植物健康评级。第一评级在期望的除草剂施用后不久进行。在最终的植物健康评级时, 用两种除草剂喷施的含有 EE-GM3 的植物具有与未喷施的 Jack 植物或未喷施的包含 EE-GM3 的植物相同的评分。在由农艺员工进行评级中, 喷施除草剂的植物在 V4-5 和 R1 植物生长阶段接受 3-4 (中度伤) 的健康评级。未喷施的植物 (未转化的 Jack 或包含 EE-GM3 的大豆植物) 被评级为 4.6-4.8 (5 的评级表示无损伤)。在最终植物健康评级时, 所有小区接受为 5 的相同评级 (无损伤)。

[0423] 一个试验季是异常降雨之一并且在期望的除草剂施用后 EE-GM3 植物中的作物损伤比在其它季节中观察到的更明显。田间评估还包括监测适合性特征 (fitness character) (生殖、疾病抗性、生殖力、种子散布、休眠、持久性 (persistence))。对于生殖特征; 至萌发的天数、达到 50% 的开花的天数和达到 90% 荚果成熟的天数, EE-GM3 与 Jack 植物都不相同。在对疾病和虫害的天然浸染的反应中差异不显著。虽然 EE-GM3 产生比 Jack 少的最终产量, 但未发现生殖力 (100 粒种子重量) 的差异。种子分散参数 (豆荚落粒 (pod shattering) 和植物倒伏) 的评估发现 EE-GM3 和 Jack 具有相同的豆荚落粒评分, 但发现 EE-GM3 植物不太容易倒伏。从 10 个位置收获的种子的评估发现没有因萌发或休眠测试而产生的问题。

[0424] 在这些试验中, 在具有异常降雨的季中, 无论杂草控制处理如何, EE-GM3 植物的最终产量都低于 Jack 的产量一个标准差 (可能是 EE-GM3 事件小区的更低植物密度的结果)。在异常潮湿的季节中, EE-GM3 小区的作物损伤 (10-30% 的作物面积变白) 据报导在草甘膦和异噁唑草酮除草剂的叶面施用后达到 6 周。然而, 到成熟时, “无损伤” 植物健康评级被赋予所有小区。在原种大豆品种背景中进行 EE-GM3 基因渗入的重复多位点田间试验, 当与不包含转基因的近等基因姊妹系相比较时, 预期显示包含事件 EE-GM3 的植物与近等基因系 (在除草剂处理不存在的情况下) 之间无产量差异。

[0425] 此外, 在重复田间试验中, 当用 IFT (70gr ai/ha 和 0.5% NIS, Agridex) 进行芽前或芽后处理时, 在包含 EE-GM3 的大豆植物中发现显著的作物抗性 (低于 10% 的变白), 但当利用磺酰草吡啶 (35gr ai/ha 和 0.5% NIS, Agridex) (另一种 HPPD 抑制剂除草剂) 的芽后施用处理时, 也在包含 EE-GM3 的大豆植物中发现显著的作物抗性 (低于 10% 的变白)。

[0426] 1.2.2 原种事件 EE-GM3 的侧翼区域和外源 DNA 的鉴定

[0427] EE-GM3 原种事件中的侧翼连接包含耐除草剂基因的外源 DNA 的区域的序列被测定为如下:

[0428] 1.2.2.1. 右 (5') 侧翼区域

[0429] 对被鉴定为包含 5' 侧翼区域的片段进行测序, 其核苷酸序列示于 SEQ ID No. 2 中。核苷酸 1 与 1451 之间的序列对应于植物 DNA, 而核苷酸 1452 与 1843 之间的序列对应于外源 DNA。

[0430] 1.2.2.2. 左 (3') 侧翼区域

[0431] 对被鉴定为包含3'侧翼区域的片段进行测序,其核苷酸序列示于SEQ ID No.3中。核苷酸1与240之间的序列对应于外源DNA,而核苷酸241与1408之间的序列对应于植物DNA。

[0432] 1.2.2.3.EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA

[0433] 通过使用不同的分子技术,已确定原种事件EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA以头接头取向包含两个部分3'组蛋白At序列,后接2个几乎完全拷贝的以头接头取向排列的pSF10的SalI片段(参见图1)。

[0434] 因此EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA按顺序包含下列序列:

[0435] -从核苷酸1至核苷酸199:对应于SEQ ID 1的nt 6760至nt 6958的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;

[0436] -从核苷酸200至核苷酸624:对应于SEQ ID 1的nt 6874至nt 7298的核苷酸序列的核苷酸序列;

[0437] -从核苷酸625至核苷酸7909:对应于SEQ ID 1的nt 7至nt 7291的核苷酸序列的核苷酸序列;

[0438] -从核苷酸7910至核苷酸15163:对应于SEQ ID 1的nt 12至nt 7265的核苷酸序列的核苷酸序列;和

[0439] -从核苷酸15164至核苷酸15187:对应于SEQ ID 3的nt 217至nt 240的核苷酸序列的核苷酸序列(该序列不对应于pSF10质粒DNA或野生型植物DNA,从而被称为填充DNA)。

[0440] SEQ ID No 2的核苷酸1至1451的5'侧翼序列在该外源DNA之前紧邻其上游并且与外源DNA邻接,并且SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的3'侧翼序列在外源DNA之后紧邻其下游并且与外源DNA邻接。

[0441] EE-GM3中的外源DNA和侧翼DNA序列的确认完全DNA测序产生了SEQ ID No.20中报导的序列。在该序列中,插入的DNA是从核苷酸位置1452至核苷酸位置16638,以头接头取向排列的2个来自pSF10的几乎完全的拷贝是从核苷酸位置2257至核苷酸位置16601。SEQ ID No.20的5'侧翼DNA序列是SEQ ID No.20的核苷酸位置1至核苷酸位置1451的序列,并且SEQ ID No.20的3'侧翼DNA序列是SEQ ID No.20的核苷酸位置16639至核苷酸位置17806的序列。

[0442] 1.3.包含草胺膦乙酰转移酶嵌合基因的外源DNA的描述

[0443] 质粒pB2/P35SAcK为pUC19衍生的克隆载体,其包含嵌合pat基因。载体的描述在下表2中给出。其核苷酸序列示于SEQ ID No.11。

[0444] 表2.pB2/P35SAcK (SEQ ID No 11) 的组分的核苷酸位置

[0445]

核苷酸位置	描述和参考资料
461-1003	来自花椰菜花叶病毒的35S启动子
1004-1011	合成多接头衍生的序列
1012-1563	合成pat基因(来自产绿色链霉菌的氨基酸序列)
1564-1581	合成多接头衍生的序列
1582-1784	来自花椰菜花叶病毒的35S终止子

[0446] 1.4.事件EE-GM1

[0447] 1.4.1EE-GM1的鉴定

[0448] 使用直接基因转移,利用载体pB2/P35SAcK转化大豆来开发耐除草剂大豆。

[0449] 基于广泛选择法选择原种事件EE-GM1,所述选择法基于耐除草剂基因的良好表达和稳定性以及其与最佳农艺特征的相容性。

[0450] 1.4.2原种事件EE-GM1的侧翼区域和外源DNA的鉴定

[0451] 1.4.2.1.右(5')侧翼区域

[0452] 对被鉴定为包含5'侧翼区域的片段进行测序,其核苷酸序列示于SEQ ID No.12中。核苷酸1与209之间的序列对应于植物DNA,而核苷酸210与720之间的序列对应于外源DNA。

[0453] 1.4.2.2.左(3')侧翼区域

[0454] 对被鉴定为包含3'侧翼区域的片段进行测序,其核苷酸序列示于SEQ ID No.13中。核苷酸1与568之间的序列对应于外源DNA,而核苷酸569与1000之间的序列对应于植物DNA。

[0455] 1.4.2.3.EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA

[0456] 通过使用不同分子技术,现已确定原种事件EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA以同向重复结构包含两个拷贝的嵌合pat基因(参见图3)。

[0457] 因此EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA按顺序包含下列序列:

[0458] -从核苷酸1至核苷酸3122:对应于SEQ ID 11的nt 340至nt 3461的核苷酸序列的核苷酸序列;

[0459] -从核苷酸3123至核苷酸3458:对应于SEQ ID 11的nt 1至nt 336的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;

[0460] -从核苷酸3459至核苷酸4073:对应于SEQ ID 11的nt 3462至nt 4076的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;和

[0461] -从核苷酸4074至核苷酸6780:对应于SEQ ID 11的nt 337至nt 3043的核苷酸序列的核苷酸序列;和

[0462] -从核苷酸6781至核苷酸6790:对应于SEQ ID 13的nt 559至nt 568的核苷酸序列的核苷酸序列(该序列不对应于质粒DNA或野生型植物DNA,从而被称为填充DNA)。

[0463] SEQ ID No 12的核苷酸1至209的5'侧翼序列在EE-GM1的该外源DNA之前紧邻其上游并且与外源DNA邻接,并且SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的3'侧翼序列在外源DNA之后紧邻其下游并且与外源DNA邻接。

[0464] 1.5.事件EE-GM2

[0465] 使用直接基因转移,利用载体pB2/P35SAcK转化大豆来开发耐除草剂大豆。

[0466] 基于广泛选择法选择原种事件EE-GM2,所述选择法基于耐除草剂基因的良好表达和稳定性以及其与最佳农艺特征的相容性。

[0467] 1.5.1.原种事件EE-GM2的侧翼区域和外源DNA的鉴定

[0468] 1.5.1.1.右(5')侧翼区域

[0469] 对被鉴定为包含5'侧翼区域的片段进行测序,其核苷酸序列示于SEQ ID No.14中。核苷酸1与311之间的序列对应于植物DNA,而核苷酸312与810之间的序列对应于外源DNA。

[0470] 1.5.1.2.左(3')侧翼区域

[0471] 对被鉴定为包含3'侧翼区域的片段进行测序,其核苷酸序列示于SEQ ID No.15

中。核苷酸1与507之间的序列对应于外源DNA,而核苷酸569与1880之间的序列对应于植物DNA。

[0472] 1.5.1.3.EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA

[0473] 通过使用不同分子技术,现已确定原种事件EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA包含1个拷贝的嵌合pat基因(参见图4)。

[0474] 因此EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA按顺序包含下列序列:

[0475] -从核苷酸1至核苷酸391:对应于SEQ ID 11的nt 3458至nt 3848的核苷酸序列的核苷酸序列;和

[0476] -从核苷酸392至核苷酸3436:对应于SEQ ID 11的nt 413至nt 3457的核苷酸序列的核苷酸序列。

[0477] SEQ ID No 14的核苷酸1至311的5'侧翼序列在EE-GM2的该外源DNA之前紧邻其上游并且与外源DNA邻接,并且SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的3'侧翼序列在外源DNA之后紧邻其下游并且与外源DNA邻接。

[0478] 2.针对EE-GM3的聚合酶链式反应鉴定方案的开发

[0479] 2.1.引物

[0480] 开发识别原种事件内的序列的特异性引物。

[0481] 开发识别EE-GM3的3'侧翼区域内的序列的引物。随后在外源DNA的序列内选择第二引物以便引物横跨约263个核苷酸的序列。发现下列引物在对EE-GM3DNA的PCR反应中产生特别清晰和可重现的结果:

[0482] SOY028:5'-ATC.gCT.TTA.ACg.TCC.CTC.Ag-3 (SEQ ID No.:4)

[0483] (靶:插入DNA)

[0484] SOY029:5'-CAA.ggC.CTC.gAg.ATT.ATC-3' (SEQ ID No.:5)

[0485] (靶:植物DNA)

[0486] 优选地将靶向内源序列的引物包含在PCR混合物中。这些引物用作未知样品和DNA阳性对照的内部对照。利用内源引物对的阳性结果(413bp的PCR扩增片段的存在)表明在基因组DNA制剂中存在丰富的优质DNA可用于产生PCR产物。选择内源引物以识别内源肌动蛋白大豆基因:

[0487] SOY01 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No.:9)

[0488] SOY02 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No.:10)

[0489] 2.2.扩增片段

[0490] PCR反应中的预期扩增片段为:

[0491] 对于引物对SO Y01-SOY02:413bp(内源对照)

[0492] 对于引物对SOY028-SOY029:263bp(EE-GM3原种事件)

[0493] 2.3.模板DNA

[0494] 按照Edwards等(Nucleic Acid Research,19,p1349,1991)从叶冲孔制备模板DNA。当使用利用其它方法制备的DNA时,应当利用不同量的模板进行测试运行。通常50ng的基因组模板DNA产生最佳结果。

[0495] 2.4.指定的阳性和阴性对照

[0496] 为了避免假阳性或阴性,决定应当将下列阳性和阴性对照包括在PCR运行中:

[0497] -Master Mix对照 (DNA阴性对照)。这是其中未向反应物中添加DNA的PCR。当观察到预期的结果 (无PCR产物) 时, 这表明PCR混合物未被靶DNA污染。

[0498] -DNA阳性对照 (已知包含转基因序列的基因组DNA样品)。该阳性对照的成功扩增表明PCR在允许靶序列扩增的条件下运行。

[0499] -野生型DNA对照。这是其中提供的模板DNA是从非转基因植物制备的基因组DNA。当观察到预期的结果: 无转基因PCR产物扩增但内源PCR产物扩增时, 这表明在基因组DNA样品中不存在可检测的转基因背景扩增。

[0500] 2.5. PCR条件

[0501] 在下列条件下获得最佳结果 (在描述中, 用于最佳结果的各种条件意指提供此类条件的实例。很明显, 本领域技术人员可改变条件、试剂和参数 (例如使用其它Taq聚合酶), 并且获得期望的结果):

[0502] 用于25 $\mu$ l反应的PCR混合物包含:

[0503] 20ng模板DNA

[0504] 2.5 $\mu$ l 10x扩增缓冲液 (与Taq聚合酶一起由制造商提供的)

[0505] 0.5 $\mu$ l 10mM dNTP's

[0506] 0.4 $\mu$ l SOY01 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0507] 0.4 $\mu$ l SOY02 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0508] 0.7 $\mu$ l SOY028 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0509] 0.7 $\mu$ l SOY029 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0510] 0.1 $\mu$ l Taq DNA聚合酶 (5个单位/ $\mu$ l)

[0511] 加水至25 $\mu$ l

[0512] 遵照以获取最佳结果的热循环设置 (thermocycling profile) 如下:

[0513] 在95 $^{\circ}$ C下进行4分钟

[0514] 随后: 在95 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0515] 在57 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0516] 在72 $^{\circ}$ C下进行2分钟

[0517] 进行5个循环

[0518] 随后: 在92 $^{\circ}$ C下进行30秒

[0519] 在57 $^{\circ}$ C下进行30秒

[0520] 在72 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0521] 进行25个循环

[0522] 随后: 在72 $^{\circ}$ C下进行10分钟

[0523] 2.6. 琼脂糖凝胶分析

[0524] 为了最佳地显现PCR的结果, 已确定应当将10至20 $\mu$ l的PCR样品施加在1.5%的琼脂糖凝胶 (Tris-硼酸盐缓冲液) 上, 使用适当的分子量标准 (例如100bp梯带Pharmacia)。

[0525] 2.7. 结果的验证

[0526] 已确定, 除非1) DNA阳性对照显示预期的PCR产物 (转基因和内源片段), 2) DNA阴性对照对于PCR扩增呈阴性 (无片段) 和3) 野生型DNA对照显示预期的结果 (内源片段扩增), 否则来自单个PCR运行和单个PCR混合物内的转基因植物DNA样品的数据应当是不可接受的。

[0527] 当按照上述针对EE-GM3的PCR鉴定方案进行时,显示可见量的具有期望大小的转基因和内源PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的相应植物遗传了EE-GM3原种事件。未显示可见量的任一转基因PCR产物但显示可见量的内源PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的相应植物不包含原种事件。未显示可见量的内源PCR产物和转基因PCR产物的泳道表明基因组DNA的质量和/或量不允许PCR产物产生。不能给这些植物评分。应当重复基因组DNA制备,并且必须进行新的PCR运行(利用适当的对照)。

[0528] 2.8. 使用鉴别PCR方案鉴定EE-GM3

[0529] 在尝试筛选未知之前,必须利用适当的对照进行测试运行。开发的方案可能需要针对在实验室之间可能不同的组分(模板DNA制剂、Taq DNA聚合酶、引物的质量、dNTP、热循环仪等)进行最优化。

[0530] 内源序列的扩增在所述方案中起着关键作用。必须获得扩增出等摩尔量的已知转基因基因组DNA模板中的内源序列和转基因序列的PCR和热循环条件。每当靶向内源片段不被扩增时,或每当靶向序列在相同溴化乙锭染色强度下不被扩增时,如通过琼脂糖凝胶电泳判断的,则可能需要PCR条件的最优化。

[0531] 按照上述方案测试来自许多大豆植物的叶材料,其中一些包含EE-GM3。来自原种事件EE-GM3和来自大豆野生型的样品分别被用作阳性对照和阴性对照。

[0532] 图2举例说明利用针对EE-GM3的原种事件PCR鉴定方案对许多大豆植物样品获得的结果。发现泳道2和3中的样品包含原种事件EE-GM3,因为检测到263bp的条带,然而泳道4至8中的样品不包含EE-GM3。泳道6和7包含来自使用相同耐除草剂嵌合基因获得的其它大豆转化事件的样品;泳道8包含来自野生型大豆植物的DNA,泳道9代表阴性对照(水)样品,泳道1和10代表分子量标准(100bp梯带)。

[0533] 2.9. 用于大批种子的EE-GM3检测的dPCR测定

[0534] 建立鉴别PCR(dPCR)测定以检测大批种子中EE-GM3的低水平存在。在可重复条件下在大批非转基因种子中成功地检测到最低水平0.4%(w/w)的转基因种子。因此检测限被确定为0.4%(w/w)。

[0535] 在该靶PCR反应中使用下列引物:

[0536] 靶向T-DNA序列的正向引物:

[0537] SHA130 5'-CTA.TAT.TCT.ggT.TCC.AAT.TTA.TC-3'(SED ID No.12)

[0538] 靶向3'侧翼序列的反向引物:

[0539] SMP178 5'-TgA.ggC.ACg.TAT.TgA.TgA.CC-3'(SEQ ID No.13)

[0540] PCR反应中来自这些引物的预期的扩增片段为115bp。

[0541] 对约200ng的按照改良的Gentra Puregene DNA纯化提取试剂盒(Qiagen)从磨碎的大批种子制备的模板DNA进行靶PCR反应。当使用利用其它方法制备的DNA时,应当使用具有已知相对水平的EE-GM3的样品进行测试运行。

[0542] 理想地应当在单独的PCR运行中进行靶向内源序列的验证参照系统PCR反应,以验证DNA样品对于PCR分析的适合性,以避免假阴性结果。

[0543] 对于未知测试样品,PCR实验理想地应当包括适当的阳性和阴性对照样品,即:

[0544] -Master Mix对照(DNA阴性对照)。这是其中未向反应物中添加DNA的PCR。当对于靶和参照系统反应都观察到预期的结果(无PCR产物)时,这表明PCR混合物未被靶DNA污染。



[0545] -DNA阳性对照(已知包含转基因序列的基因组DNA样品)。该阳性对照的成功扩增表明PCR在允许靶序列扩增的条件下运行。

[0546] -还可将野生型DNA对照添加进该PCR中。这是其中提供的模板DNA是从非转基因植物制备的基因组DNA。当观察到预期的结果:无转基因PCR产物扩增但内源PCR产物扩增时,这表明在基因组DNA样品中不存在可检测的转基因背景扩增。

[0547] 在下列条件下获得最佳结果:

[0548] -用于25 $\mu$ l反应的PCR混合物包含:

[0549] 200ng模板DNA

[0550] 5 $\mu$ l 5x反应缓冲液

[0551] 0.25 $\mu$ l 20mM dNTP

[0552] 0.7 $\mu$ l SHA130 (10皮摩尔/l)

[0553] 0.4 $\mu$ l SMP178 (10皮摩尔/l)

[0554] 0.1 $\mu$ l GO-Taq DNA聚合酶(5个单位/l)

[0555] 加水至25 $\mu$ l

[0556] -遵照以获取最佳结果的热循环设置如下:

[0557] 在95 $^{\circ}$ C下进行4分钟

[0558] 随后:在95 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0559] 在57 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0560] 在72 $^{\circ}$ C下进行2分钟

[0561] 进行5个循环

[0562] 随后:在92 $^{\circ}$ C进行30秒

[0563] 在57 $^{\circ}$ C下进行30秒

[0564] 在72 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0565] 进行30个循环

[0566] 随后:在72 $^{\circ}$ C下进行10分钟

[0567] 为了最佳地显现PCR的结果,已确定应当将10至20 $\mu$ l的PCR产物施加在1.5%的琼脂糖凝胶(Tris-硼酸盐缓冲液)上,使用适当的分子量标准(例如50bp梯带)。

[0568] 当按照上述PCR法进行时,显示可见量的具有期望大小的靶和参照系统PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的测试样品包含高于靶反应的检测限的EE-GM3原种事件的水平。

[0569] 未显示可见量的靶PCR产物但显示可见量的参照系统PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的测试样品包含低于靶反应的检测限的EE-GM3原种事件的水平

[0570] 未显示可见量的内源和转基因PCR产物的泳道表明基因组DNA的质量和/或量不允许PCR产物产生。

[0571] 不能给这些植物评分。应当重复基因组DNA制备,并且必须利用适当的对照进行新的PCR运行。

[0572] 3.特定整合片段作为用于检测包含EE-GM3的材料的探针的用途

[0573] 使用特异性引物SOY028(SEQ ID No.4)和SOY029(SEQ ID No.5)通过PCR获得EE-GM3的特定整合片段,产生具有SEQ ID No 8的核苷酸序列的扩增子,或通过化学合成获得

EE-GM3的特定整合片段,并且标记所述整合片段。将该整合片段用作用于检测生物样品中的EE-GM3的特异性探针。按照标准方法从样品提取核酸。随后将该核酸在经最优化以允许杂交体形成的杂交条件下与特异性探针接触。随后检测杂交体的形成以表明EE-GM3核酸存在于样品中。任选地,使用特异性引物扩增样品的核酸,然后将所述核酸与特异性探针接触。或者,标记所述核酸,然后将其与特异性探针而非整合片段接触。任选地,将特异性探针连接至固体载体(例如,但不限于滤膜、条带或珠粒),随后将其与样品接触。

[0574] 4. 针对EE-GM1的聚合酶链式反应鉴定方案

[0575] 4.1. 引物

[0576] 开发识别原种事件内的序列的特异性引物。更具体地,开发识别EE-GM1的5'侧翼区域内的序列的引物。随后在外源DNA的序列内选择第二引物以便引物横跨约183个核苷酸的序列。发现下列引物在对EE-GM1DNA的PCR反应中产生特别清晰和可重现的结果:

[0577] SOY06:5'-ggC.gTT.CgT.AgT.gAC.TgA.gg-3'(SEQ ID No.:16)

[0578] (靶:植物DNA)

[0579] SOY07:5'-gTT.TTA.CAA.CgT.CgT.gAC.Tgg-3'(SEQ ID No.:17)

[0580] (靶:植物DNA)

[0581] 优选地将靶向内源序列的引物包含在PCR混合物中。这些引物用作未知样品和DNA阳性对照的内部对照。利用内源引物对的阳性结果表明在基因组DNA制剂中存在丰富的优质DNA可用于产生PCR产物。选择内源引物以识别大豆中的管家基因:

[0582] SOY01:5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3'(SEQ ID No.:9)

[0583] (位于大豆肌动蛋白1基因(登录号J01298)中)

[0584] SOY02:5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3'(SEQ ID No.:10)

[0585] (位于大豆肌动蛋白1基因(登录号J01298)中)

[0586] 4.2. 扩增片段

[0587] PCR反应中的预期扩增片段为:

[0588] 对于引物对SOY01-SOY02:413bp(内源对照)

[0589] 对于引物对SOY06-SOY07:183bp(EE-GM1原种事件)

[0590] 4.3. 模板DNA

[0591] 按照Edwards等(Nucleic Acid Research,19,p1349,1991)从叶冲孔制备模板DNA。当使用利用其它方法制备的DNA时,应当利用不同量的模板进行测试运行。通常50ng的基因组模板DNA产生最佳结果。

[0592] 4.4. 指定的阳性和阴性对照

[0593] 为了避免假阳性或阴性,决定应当将下列阳性和阴性对照包括在PCR运行中:

[0594] -Master Mix对照(DNA阴性对照)。这是其中未向反应物中添加DNA的PCR。当观察到预期的结果(无PCR产物)时,这表明PCR混合物未被靶DNA污染。

[0595] -DNA阳性对照(已知包含转基因序列的基因组DNA样品)。该阳性对照的成功扩增表明PCR在允许靶序列扩增的条件下运行。

[0596] -野生型DNA对照。这是其中提供的模板DNA是从非转基因植物制备的基因组DNA。当观察到预期的结果:无转基因PCR产物扩增但内源PCR产物扩增时,这表明在基因组DNA样品中不存在可检测的转基因背景扩增。

[0597] 4.5.PCR条件

[0598] 在下列条件下获得最佳结果:

[0599] -用于25 $\mu$ l反应的PCR混合物包含:

[0600] 2.5 $\mu$ l模板DNA

[0601] 2.5 $\mu$ l 10x扩增缓冲液(与Taq聚合酶一起提供的)

[0602] 0.5 $\mu$ l 10mM dNTP's

[0603] 0.5 $\mu$ l SOY06(10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0604] 0.7 $\mu$ l SOY07(10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0605] 0.25 $\mu$ l SOY01(10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0606] 0.25 $\mu$ l SOY02(10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0607] 0.1 $\mu$ l Taq DNA聚合酶(5个单位/ $\mu$ l)

[0608] 加水至25 $\mu$ l

[0609] -遵照以获取最佳结果的热循环设置如下:

[0610] 在95°C下进行4分钟

[0611] 随后:在95°C下进行1分钟

[0612] 在57°C下进行1分钟

[0613] 在72°C下进行2分钟

[0614] 进行5个循环

[0615] 随后:在92°C下进行30秒

[0616] 在57°C下进行30秒

[0617] 在72°C下进行1分钟

[0618] 进行25个循环

[0619] 随后:在72°C下进行5分钟

[0620] 4.6.琼脂糖凝胶分析

[0621] 为了最佳地显现PCR的结果,已确定应当将10至20 $\mu$ l的PCR样品施加在1.5%的琼脂糖凝胶(Tris-硼酸盐缓冲液)上,使用适当的分子量标准(例如100bp梯带Pharmacia)。

[0622] 4.7.结果的验证

[0623] 已确定,除非1)DNA阳性对照显示预期的PCR产物(转基因和内源片段),2)DNA阴性对照对于PCR扩增呈阴性(无片段)和3)野生型DNA对照显示预期的结果(内源片段扩增),否则来自单个PCR运行和单个PCR混合物内的转基因植物DNA样品的数据应当是不可接受的。

[0624] 当按照上述针对EE-GM1的PCR鉴定方案进行时,显示可见量的具有期望大小的转基因和内源PCR产物的泳道表明,基因组模板DNA从其制备的相应植物遗传了EE-GM1原种事件。未显示可见量的任一转基因PCR产物但显示可见量的内源PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的相应植物不包含原种事件。未显示可见量的内源PCR产物和转基因PCR产物的泳道表明基因组DNA的质量和/或量不允许PCR产物产生。不能给这些植物评分。应当重复基因组DNA制备,并且必须利用适当的对照进行新的PCR运行。

[0625] 4.8.使用鉴别PCR方案鉴定EE-GM1

[0626] 在尝试筛选未知之前,必须利用适当的对照进行测试运行。开发的方案可能需要针对在实验室之间可能不同的组分(模板DNA制剂、Taq DNA聚合酶、引物的质量、dNTP、热循

环仪等)进行最优化。

[0627] 内源序列的扩增在所述方案中起着关键作用。必须获得扩增出等摩尔量的已知转基因基因组DNA模板中的内源序列和转基因序列的PCR和热循环条件。每当靶向内源片段不被扩增时,或每当靶向序列在相同溴化乙锭染色强度下不被扩增时,如通过琼脂糖凝胶电泳判断的,则可能需要PCR条件的最优化。

[0628] 按照上述方案测试来自许多植物的大豆叶材料,其中一些包含EE-GM1。来自原种事件EE-GM1和来自大豆野生型的样品分别被用作阳性和阴性对照。

[0629] 图5举例说明利用针对EE-GM1的原种事件PCR鉴定方案对许多大豆植物样品获得的结果(泳道1至14)。发现泳道1中的样品包含原种事件EE-GM1,因为检测到185bp的条带,然而泳道2、3和4的样品不包含EE-GM1。泳道2包含另一个大豆原种事件,泳道3代表非转基因大豆对照;泳道4代表阴性对照(水)样品,泳道5代表分子量标准(100bp梯带)。

[0630] 5. 特定整合片段作为用于检测包含EE-GM1的材料的探针的用途

[0631] 使用特异性引物SOY06 (SEQ ID No. 16) 和SOY07 (SEQ ID No. 17) 通过PCR,或通过化学合成获得EE-GM1的特定整合片段,并且标记所述整合片段。将该整合片段用作用于检测生物样品中的EE-GM1的特异性探针。按照标准方法从样品提取核酸。随后将该核酸在经最优化以允许杂交体形成的杂交条件下与特异性探针接触。随后检测杂交体的形成以表明EE-GM1核酸存在于样品中。任选地,使用特异性引物扩增样品的核酸,然后将所述核酸与特异性探针接触。或者,标记所述核酸,然后将其与特异性探针而非整合片段接触。任选地,将特异性探针连接至固体载体(例如,但不限于滤膜、条带或珠粒),随后将其与样品接触。

[0632] 6. 针对EE-GM2的聚合酶链式反应鉴定方案。

[0633] 6.1. 引物

[0634] 开发识别原种事件内的序列的特异性引物。更具体地,开发识别EE-GM2的3'侧翼区域内的序列的引物。随后在外源DNA的序列内选择第二引物以便引物横跨约150个核苷酸的序列。发现下列引物在对EE-GM2DNA的PCR反应中产生特别清晰和可重现的结果:

[0635] SOY09:5'-TgT.ggT.TAT.ggC.ggT.gCC.ATC-3' (SEQ ID No.:18)

[0636] (靶:植物DNA)

[0637] SOY010:5'-TgC.TAC.Agg.CAT.CgT.ggT.gTC-3' (SEQ ID No.:19)

[0638] (靶:插入物DNA)

[0639] 优选地将靶向内源序列的引物包含在PCR混合物中。这些引物用作未知样品和DNA阳性对照的内部对照。利用内源引物对的阳性结果表明在基因组DNA制剂中存在丰富的优质DNA可用于产生PCR产物。选择内源引物以识别大豆中的管家基因:

[0640] SOY01:5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No.:9)

[0641] (位于大豆肌动蛋白1基因(登录号J01298)中)

[0642] SOY02:5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No.:10)

[0643] (位于大豆肌动蛋白1基因(登录号J01298)中)

[0644] 6.2. 扩增片段

[0645] PCR反应中的预期扩增片段为:

[0646] 对于引物对SOY01-SOY02:413bp(内源对照)

[0647] 对于引物对SOY09-SOY010:151bp(EE-GM2原种事件)

[0648] 6.3. 模板DNA

[0649] 按照Edwards等 (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991) 从叶冲孔制备模板DNA。当使用利用其它方法制备的DNA时,应当利用不同量的模板进行测试运行。通常50ng的基因组模板DNA产生最佳结果。

[0650] 6.4. 指定的阳性和阴性对照

[0651] 为了避免假阳性或阴性,决定应当将下列阳性和阴性对照包括在PCR运行中:

[0652] -Master Mix对照 (DNA阴性对照)。这是其中未向反应物中添加DNA的PCR。当观察到预期的结果 (无PCR产物) 时,这表明PCR混合物未被靶DNA污染。

[0653] -DNA阳性对照 (已知包含转基因序列的基因组DNA样品)。该阳性对照的成功扩增表明PCR在允许靶序列扩增的条件下运行。

[0654] -野生型DNA对照。这是其中提供的模板DNA是从非转基因植物制备的基因组DNA。当观察到预期的结果:无转基因PCR产物扩增但内源PCR产物扩增时,这表明在基因组DNA样品中不存在可检测的转基因背景扩增。

[0655] 6.5. PCR条件

[0656] 在下列条件下获得最佳结果:

[0657] -用于25 $\mu$ l反应的PCR混合物包含:

[0658] 2.5 $\mu$ l 模板DNA

[0659] 2.5 $\mu$ l 10x扩增缓冲液 (与Taq聚合酶一起提供的)

[0660] 0.5 $\mu$ l 10mM dNTP's

[0661] 0.5 $\mu$ l SOY09 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0662] 0.5 $\mu$ l SOY010 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0663] 0.25 $\mu$ l SOY01 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0664] 0.25 $\mu$ l SOY02 (10皮摩尔/ $\mu$ l)

[0665] 0.1 $\mu$ l Taq DNA聚合酶 (5units/ $\mu$ l)

[0666] 加水至25 $\mu$ l

[0667] -遵照以获取最佳结果的热循环设置如下:

[0668] 在95 $^{\circ}$ C下进行4分钟

[0669] 随后:在95 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0670] 在57 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0671] 在72 $^{\circ}$ C下进行2分钟

[0672] 进行5个循环

[0673] 随后:在92 $^{\circ}$ C下进行30秒

[0674] 在57 $^{\circ}$ C下进行30秒

[0675] 在72 $^{\circ}$ C下进行1分钟

[0676] 进行25个循环

[0677] 随后:在72 $^{\circ}$ C下进行5分钟

[0678] 6.6. 琼脂糖凝胶分析

[0679] 为了最佳地显现PCR的结果,已确定应当将10至20 $\mu$ l的PCR样品施加在1.5%的琼脂糖凝胶 (Tris-硼酸盐缓冲液) 上,使用适当的分子量标准 (例如100bp梯带Pharmacia)。

## [0680] 6.7. 结果的验证

[0681] 已确定,除非1) DNA阳性对照显示预期的PCR产物(转基因和内源片段),2) DNA阴性对照对于PCR扩增呈阴性(无片段)和3) 野生型DNA对照显示预期的结果(内源片段扩增),否则来自单个PCR运行和单个PCR混合物内的转基因植物DNA样品的数据应当是不可接受的。

[0682] 当按照上述针对EE-GM2的PCR鉴定方案进行时,显示可见量的具有期望大小的转基因和内源PCR产物的泳道表明,基因组模板DNA从其制备的相应植物遗传了EE-GM2原种事件。未显示可见量的任一转基因PCR产物但显示可见量的内源PCR产物的泳道表明基因组模板DNA从其制备的相应植物不包含原种事件。未显示可见量的内源PCR产物和转基因PCR产物的泳道表明基因组DNA的质量和/或量不允许PCR产物产生。不能给这些植物评分。应当重复基因组DNA制备,并且必须利用适当的对照进行新的PCR运行。

## [0683] 6.8. 使用鉴别PCR方案鉴定EE-GM2

[0684] 在尝试筛选未知之前,必须利用适当的对照进行测试运行。开发的方案可能需要针对在实验室之间可能不同的组分(模板DNA制剂、Taq DNA聚合酶、引物的质量、dNTP、热循环仪等)进行最优化。

[0685] 内源序列的扩增在所述方案中起着关键作用。必须获得扩增出等摩尔量的已知转基因基因组DNA模板中的内源序列和转基因序列的PCR和热循环条件。每当靶向内源片段不被扩增时,或每当靶向序列在相同溴化乙锭染色强度下不被扩增时,如通过琼脂糖凝胶电泳判断的,则可能需要PCR条件的最优化。

[0686] 按照上述方案测试来自许多植物的大豆叶材料,其中一些包含EE-GM2。来自原种事件EE-GM2和来自大豆野生型的样品分别被用作阳性对照和阴性对照。

[0687] 图6举例说明利用针对EE-GM2的原种事件PCR鉴定方案对许多大豆植物样品获得的结果(泳道1至14)。发现泳道1中的样品包含原种事件,因为检测到185bp的条带,然而泳道2、3和4的样品不包含EE-GM2。泳道2包含另一个大豆原种事件,泳道3代表非转基因大豆对照;泳道4代表阴性对照(水)样品,泳道5代表分子量标准(100bp梯带)。

## [0688] 7. 特定整合片段作为用于检测包含EE-GM2的材料的探针的用途

[0689] 使用特异性引物SOY09 (SEQ ID No.18) 和SOY010 (SEQ ID No.19) 通过PCR,或通过化学合成获得EE-GM2的特定整合片段,并且标记所述整合片段。将该整合片段用作用于检测生物样品中的EE-GM2的特异性探针。按照标准方法从样品提取核酸。随后将该核酸在经最优化以允许杂交体形成的杂交条件下与特异性探针接触。随后检测杂交体的形成以表明EE-GM2核酸存在于样品中。任选地,使用特异性引物扩增样品的核酸,然后将所述核酸与特异性探针接触。或者,标记所述核酸,然后将其与特异性探针而非整合片段接触。任选地,将特异性探针连接至固体载体(例如,但不限于滤膜、条带或珠粒),随后将其与样品接触。

## [0690] 8. 包含EE-GM3和EE-GM1或EE-GM3和EE-GM2的大豆植物的产生以及此类植物的农艺性状的评估

[0691] 通过包含EE-GM3的亲本大豆植物与包含EE-GM1的亲本大豆植物之间的常规杂交已获得包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的组合的大豆植物。使用本文中描述的针对EE-GM1和EE-GM3的PCR鉴定方案鉴定包含两个事件的后代植物。具体地,将包含EE-GM3的植物和几个EE-GM1品系进行杂交。生长所得的F1代,并且喷施草甘膦和草铵膦。从F1植物收获F2种子,并且进行种植(不对F2植物进行喷施)。拔取F2单株植物。种植F2:F3植物行,用草甘膦和草

铵磷进行喷施。鉴定对于EE-GM3和EE-GM1都是纯合的行,随后进行收获。来自该试验的分离数据显示所述事件的预期的孟德尔分离。

[0692] 已通过包含EE-GM3的亲本大豆植物与包含EE-GM2的亲本大豆植物之间的常规杂交获得包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的组合的大豆植物。使用本文中描述的针对EE-GM2和EE-GM3的PCR鉴定方案鉴定包含两个事件的后代植物。具体地,将包含EE-GM3的植物与包含EE-GM2的植物进行杂交。将所得的F1植物与4个常规品系杂交。将来自这些杂交的F1生长在田间,用草甘膦和草铵膦进行喷施。随后种植从耐两种除草剂的F1植物收获的F2种子。用草甘膦和草铵膦对F2植物进行喷施。收获900株耐两种除草剂的植物,在田间试验中种植所述植物。在该试验中获得所述事件的预期孟德尔分离数据。对约40个对于对两种除草剂的抗性纯合的品系筛选农艺一致性以进行进一步研究。这些品系具有良好的耐两种除草剂的抗性和良好的农艺学特征。

[0693] 利用在不同类型的商业种质中包含组合事件的此类大豆植物的田间试验正在多个区位进行,并且对植物的多个农艺学参数进行评估,包括株高、节距、直立、活力、种子产量以及草甘膦、异噁唑草酮和草胺膦抗性水平。

[0694] 9.EE-GM3和EE-GM1或EE-GM2至优选品种的基因渗入

[0695] 通过重复回交至商业大豆品种来引入原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1或EE-GM2,所述商业大豆品种是例如但不限于大豆品种7631014 (US2009252860);大豆品种7431014 (US2009252859);大豆品种7925084 (US2009252858);大豆品种7311153 (US2009252857);大豆品种S070159 (US2009252856);大豆品种7535357 (US2009246353);大豆品种S070160 (US2009246352);大豆品种26074414 (US2009249508);大豆品种7509171 (US2009249507);大豆品种S070158 (US2009246351);大豆品种7511119 (US2009249506);大豆品种7113111 (US2009238945);大豆品种S06-02RM018047 (US7592518);大豆品种7013345 (US2009232957);大豆品种7041461 (US2009235376);大豆品种7549450 (US2009232956);大豆品种7317090 (US2009232955);大豆品种2N2V58015 (US2009226597);大豆品种7243182 (US2009226596);大豆品种7143182 (US2009226595);大豆品种7043182 (US2009220673);大豆品种S070157 (US2009222950);大豆品种306924721 (US2009220672);大豆品种7614385 (US2009220671);大豆品种7925118 (US2009214750);大豆品种7821295 (US2009214749);大豆品种7811336 (US2009214748);大豆品种S070150 (US2009214747);大豆品种6214260 (US2009214746);大豆品种S070152 (US2009214745);大豆品种7429331 (US2009214751);大豆品种26034631 (US2009208634);大豆品种S07-03JR108674 (US7560621);大豆品种S07-03KL016279 (US7560620);大豆品种S06-CL959411 (US7554017);大豆品种SG3870NRR (US2009158453);大豆品种HFPR-G (CA2645702);大豆品种S06-02JR423016 (US7521606);大豆品种S06-01JR119814 (US7518039);大豆品种S06-01JR119448 (US7518038);大豆品种6540220 (US2009055960);大豆品种S060292 (US2009055959);大豆品种S050228 (US2009055958);大豆品种S06-02JR423003 (US7491873);大豆品种S06-02JR423005 (US7491872);大豆品种S06-02JR409114 (US7485782);大豆品种S06-SJ144056 (US7473823);大豆品种 (US7470835);大豆品种6910450 (US2008282369);大豆品种6223012 (US7446246);大豆品种6549250 (US7446245);大豆品种17731225 (US2008271204);大豆品种6928285 (US2008271203);大豆品种6736054 (US2008271169);大豆品种S060299

(US2008271199);大豆品种S060294 (US2008271202);大豆品种6943322 (US2008271201);大豆品种5343260 (US2008263719);大豆品种6439359 (US2008263704);大豆品种6238359 (US2008263703);大豆品种6547272 (US2008263702);大豆品种6929431 (US2008263701);大豆品种6703392 (US2008263700);大豆品种6044483 (US2008263699);大豆品种S050224 (US2008263698);大豆品种6719022 (US2008263697);大豆品种5826056 (US2008263696);大豆品种6265047 (US2008263724);大豆品种6928331 (US2008263695);大豆品种6719331 (US2008263694);大豆品种6636454 (US2008263693);大豆品种6226454 (US2008263718);大豆品种Q0073801 (US2008256657);大豆品种6326393 (US2008256652);大豆品种6408448 (US2008256651);大豆品种6449315 (US2008250524);大豆品种S060296 (US2008250523);大豆品种6012078 (US2008250522);大豆品种6342078 (US2008250521);大豆品种6419156 (US2008250520);大豆品种5723264 (US2008250519);大豆品种S050225 (US2008250518);大豆品种S060298 (US2008244783);大豆品种6935331 (US2008244782);大豆品种6819456 (US2008244787);大豆品种S060297 (US2008244781);大豆品种6135319 (US2008244786);大豆品种6819331 (US2008244780);大豆品种6137445 (US2008244779);大豆品种6917445 (US2008244778);大豆品种6111333 (US2008244777);大豆品种S050229 (US2008244776);大豆品种6114011 (US2008244775);大豆品种6900358 (US2008244784);大豆品种6345184 (US2008244774);大豆品种6836085 (US2008244773);大豆品种6635047 (US2008244772);大豆品种6139105 (US2008244771);大豆品种6434385 (US2008244770);大豆品种S060295 (US2008244769);大豆品种6035184 (US2008244768);大豆品种S060293 (US2008209590);大豆品种6733322 (US2008209594);大豆品种6421326 (US2008209593);大豆品种S060077 (US2008209589);大豆品种6600375 (US2008209592);大豆品种S06-CL821457 (US7420104);大豆品种S07-02KG294306 (US7414178);大豆品种S06-BA046119 (US7414175);大豆品种S07-02KG294307 (US7411114);大豆品种SG3865N (US2008189802);大豆品种6701475 (US7408097);大豆品种1335025 (US2008178316);大豆品种1686017 (US2008178315);大豆品种2388028 (US2008178314);大豆品种2387029 (US2008178313);大豆品种S06-WW152330 (US7388129);大豆品种6424090 (US7385118);大豆品种6723322 (US7385115);大豆品种SG4377NRR (US7385114);大豆品种S06-02JR111334 (US7381864);大豆品种6141287 (US7378577);大豆品种MT110501 (US7378576);大豆品种 (US7378575);大豆品种S06-WW169267 (US7375261);大豆品种6223392 (US7371939);大豆品种S06-CL968413 (US7371937);大豆品种S06-CL951107 (US7368636);大豆品种S06-MT9152077 (US7361810);大豆品种4211676 (US2008092253);大豆品种S06-M059029 (US7355101);大豆品种6548193 (US7345228);大豆品种6440261 (US7345227);大豆品种S060291 (US7342151);大豆品种S06-MT9206166 (US7339094);大豆品种S06-WW013107 (US7339093);大豆品种S06-M03256 (US7335820);大豆品种6134466 (US7332656);大豆品种S06-01JR123373 (US7329800);大豆品种S06-MT9211059 (US7326831);大豆品种26170838 (US2008016590);大豆品种306612412 (US2008016588);大豆品种26660135 (US2008016587);大豆品种306734323 (US2008016586);大豆品种S06-01JR122235 (US7317144);大豆品种5900450 (US7314986);大豆品种S06-MT116260 (US7314984);大豆品种S06-SJ143606 (US7312381);大豆品种S06-98181-G01-35167 (US7309819);大豆品种26082635 (US7304219);大豆品种BA922834



(US7304217);大豆品种01JR123480 (US7304216);大豆品种M061422 (US7304215);大豆品种17082821 (US2007277262);大豆品种17621620 (US2007277261);大豆品种00977706 (US2007277260);大豆品种S060182 (US2007277259);大豆品种26312034 (US7301078);大豆品种26143837 (US7301077);大豆品种435.TCS (US2007271626);大豆品种495.RC (US2007271625);大豆品种5306230 (US7297845);大豆品种S06-WW167686 (US7291772);大豆品种6141145 (US2007245426);大豆品种S050232 (US2007226829);大豆品种5333301 (US2007226828);大豆品种S050215 (US2007226827);大豆品种3235020 (US2007226826);大豆品种5720482 (US2007226825);大豆品种S050216 (US2007226824);大豆品种5512112 (US2007226823);大豆品种3233021 (US2007226822);大豆品种1336024 (US2007226821);大豆品种5348287 (US2007226820);大豆品种5204220 (US2007226819);大豆品种6188027 (US2007226818);大豆品种4183026 (US2007226817);大豆品种S06-WW157958 (US7271325);大豆品种5733056 (US2007209091);大豆品种90501911 (US2007209090);大豆品种S050221 (US2007204361);大豆品种5802205 (US2007204360);大豆品种1000642 (US2007204359);大豆品种5420128 (US2007204358);大豆品种S050222 (US2007199094);大豆品种S050217 (US2007199093);大豆品种S050223 (US2007199092);大豆品种S050218 (US2007199091);大豆品种5419227 (US2007199089);大豆品种5319227 (US2007199088);大豆品种5723045 (US2007199087);大豆品种5051007 (US2007199086);大豆品种5826175 (US2007192893);大豆品种S050231 (US2007192892);大豆品种5826376 (US2007192891);大豆品种5628386 (US2007192890);大豆品种5138236 (US2007186307);大豆品种5608398 (US2007186306);大豆品种S050230 (US2007186305);大豆品种5624126 (US2007180561);大豆品种5019225 (US2007180560);大豆品种5549483 (US2007180559);大豆品种4189010 (US2007180551);大豆品种1486018 (US2007180550);大豆品种S050235 (US2007180549);大豆品种5023230 (US2007180548);大豆品种S050238 (US2007174930);大豆品种5830261 (US2007174928);大豆品种S050226 (US7247772);大豆品种5806063 (US7247771);大豆品种S050233 (US7244881);大豆品种5726085 (US7241939);大豆品种MT000792 (US7238867);大豆品种5521161 (US7235718);大豆品种WW109447 (US7235717);大豆品种BA947474 (US7220898);大豆品种5939002 (US7217870);大豆品种5726175 (US7217869);大豆品种5432082 (US7217868);大豆品种SG0850RR (US7211715);大豆品种SG1750NRR (US7208658);大豆品种MT017827 (US7208657);大豆品种4N2V74028 (US7205458);大豆品种CL431203 (US7202400);大豆品种4N0S63222 (US7199288);大豆品种5520279 (US7196253);大豆品种5834401 (US7196252);大豆品种5621161 (US7196251);大豆品种CL722114 (US7196250);大豆品种5741081 (US7193140);大豆品种CL727422 (US7186895);大豆品种4N2V55022 (US7183468);大豆品种5083011 (US7173169);大豆品种5626085 (US7169976);大豆品种S050051 (US7169974);大豆品种4506816 (US2006294626);大豆品种WW152201 (US7132594);大豆品种CL727636 (US7132593);大豆品种M08851 (US7126047);大豆品种4324401 (US7105728);大豆品种S050164 (US7105727);大豆品种4136015 (US2006195931);大豆品种3133014 (US2006195930);大豆品种S040132 (US2006195929);大豆品种4328386 (US2006195928);大豆品种1339013 (US2006195927);大豆品种4423183 (US2006195925);大豆品种S040131 (US2006195924);大豆品种4929388 (US2006195923);大豆品种4817034 (US2006195922);大

豆品种4916816 (US7098385) ;大豆品种4713487 (US2006191032) ;大豆品种4348019 (US2006191031) ;大豆品种S040122 (US2006191030) ;大豆品种S040133 (US2006185031) ;大豆品种CL821418 (US7091404) ;大豆品种4441080 (US7091403) ;大豆品种4805442 (US2006179509) ;大豆品种4921237 (US2006179508) ;大豆品种4417380 (US2006174369) ;大豆品种4405070 (US2006174368) ;大豆品种4417779 (US7084328) ;大豆品种S040125 (US2006168678) ;大豆品种4909380 (US7081572) ;大豆品种S050162 (US7081571) ;大豆品种6084016 (US7081570) ;大豆品种S050163 (US7078600) ;大豆品种S040135 (US7078598) ;大豆品种S040117 (US7078597) ;大豆品种M03393 (US7071391) ;大豆品种4145306 (US7064253) ;大豆品种900213 (US2006117405) ;大豆品种1000126 (US2006117404) ;大豆品种901023 (US2006117403) ;大豆品种S040130 (US7053280) ;大豆品种4706198 (US7053279) ;大豆品种S040118 (US7053278) ;大豆品种S040119 (US7053277) ;大豆品种S040123 (US7053276) ;大豆品种4442112 (US7049497) ;大豆品种917013 (US7045689) ;大豆品种S040124 (US7045691) ;大豆品种4238491 (US7045690) ;大豆品种S010136 (US7041882) ;大豆品种900613 (US7030297) ;大豆品种4337175 (US7030301) ;大豆品种S040121 (US7030300) ;大豆品种4216033 (US7030299) ;大豆品种S040128 (US7022901) ;大豆品种S040120 (US7022900) ;大豆品种S040127 (US7019199) ;大豆品种S040134 (US7015378) ;大豆品种S040129 (US7015377) ;大豆品种4513420 (US7005564) ;大豆品种943013 (US2006031958) ;大豆品种S030136 (US2006021081) ;大豆品种927013 (US2006021080) ;大豆品种1000109 (US2006015962) ;大豆品种90046112 (US2006010530) ;大豆品种90897327 (US2006010529) ;大豆品种90362421 (US2006010528) ;大豆品种03022253 (US2006010527) ;大豆品种02022433 (US2006010526) ;大豆品种02022323 (US2006010525) ;大豆品种02912951 (US2006010524) ;大豆品种0102115 (US2006010523) ;大豆品种915034 (US2006010522) ;大豆品种0509255 (US2006010521) ;大豆品种4803070 (US6982368) ;大豆品种4704310 (US6979762) ;大豆品种SJ919784 (US2005268362) ;大豆品种CL615261 (US2005268361) ;新型大豆 (US2004199964) ;大豆品种0509214 (US2005210542) ;大豆品种70826751 (US2005193442) ;大豆品种0509243 (US2005193441) ;大豆品种0509246 (US2005193440) ;大豆品种0509253 (US2005193439) ;大豆品种0509247 (US2005193438) ;大豆品种0509252 (US2005193437) ;大豆品种0509241 (US2005193436) ;大豆品种0509249 (US6884927) ;大豆品种0509244 (US2005183158) ;大豆品种0509240 (US2005183157) ;大豆品种0509239 (US2005183156) ;大豆品种0509254 (US2005183155) ;大豆品种0509245 (US2005183154) ;大豆品种0509251 (US2005183153) ;大豆品种4283008 (US6888050) ;大豆品种2386009 (US2005183152) ;大豆品种3282002 (US6870080) ;大豆品种0509248 (US2005183151) ;大豆品种5091007 (US6906249) ;大豆品种0509236 (US2005166281) ;大豆品种0509235 (US2005166280) ;大豆品种0509237 (US2005166279) ;大豆品种SG5322NRR (US2005164390) ;大豆品种SG5030NRR (US2005166278) ;大豆品种SG4911NRR (US2005166277) ;大豆品种S030153 (US2005160504) ;大豆品种S030158 (US2005144680) ;大豆品种S030160 (US2005144679) ;大豆品种S030161 (US2005144678) ;大豆品种S030157 (US2005144677) ;大豆品种S030155 (US2005144676) ;大豆品种S030156 (US2005144675) ;大豆品种S030159 (US2005144674) ;大豆品种S030154 (US6900376) ;大豆品种S020030 (US2005114929) ;大豆品种S030010 (US2005114928) ;大豆

品种SG1431RR (US2005097629) ;大豆品种SG1330NRR (US2005097642) ;大豆品种S030150 (US2005071900) ;大豆品种S022209 (US2005050601) ;大豆品种S022217 (US2005050600) ;大豆品种S022219 (US2005050599) ;大豆品种S030151 (US2005050598) ;大豆品种0491735 (US2005022272) ;大豆品种S022218 (US2005022271) ;大豆品种6190006 (US2004268447) ;大豆品种SG1120RR (US2004250316) ;大豆品种0487681 (US2004237153) ;大豆品种0491717 (US2004237152) ;大豆品种S022220 (US2004237151) ;大豆品种0491715 (US2004237150) ;大豆品种0491712 (US2004237149) ;大豆品种0491718 (US2004237148) ;大豆品种99271316 (US2004221344) ;大豆品种S022212 (US2004221343) ;大豆品种0491737 (US2004221342) ;大豆品种S022211 (US2004221341) ;大豆品种S022210 (US2004221340) ;大豆品种S022213 (US2004221339) ;大豆品种0491725 (US2004221346) ;大豆品种03129016 (US2004221329) ;大豆品种S022208 (US2004221328) ;大豆品种S022207 (US2004221345) ;大豆品种02932 (US2004210968) ;大豆品种94137321 (US2004205862) ;大豆品种94106224 (US2004205861) ;大豆品种94143901 (US2004205859) ;大豆品种0487685 (US2004205858) ;大豆品种92440927 (US2004205857) ;大豆品种0487686 (US2004205856) ;大豆品种S022215 (US2004205855) ;大豆品种S022214 (US2004205854) ;大豆品种0491726 (US2004205849) ;大豆品种92478609 (US2004205853) ;大豆品种922013 (US6781040) ;大豆品种0491727 (US2004205852) ;大豆品种0491728 (US2004205851) ;大豆品种1465003 (US2004098766) ;大豆品种3186004 (US2004019936) ;大豆品种7085005 (US2004205850) ;大豆品种S022204 (US2004199958) ;大豆品种S022206 (US2004199957) ;大豆品种0491731 (US2004199956) ;大豆品种0491733 (US2004199955) ;大豆品种0491738 (US2004199954) ;大豆品种0491732 (US2004199953) ;大豆品种0491729 (US2004199952) ;大豆品种S020011 (US2004199951) ;大豆品种0491739 (US2004199950) ;大豆品种0491730 (US2004199949) ;大豆品种13873 (US2004199948) ;大豆品种954011 (US2004181822) ;大豆品种010022 (US2004181831) ;大豆品种4181001 (US2003229926) ;大豆品种0491721 (US2004168228) ;大豆品种0491723 (US6911581 ()) ;大豆品种0491716 (US2004168226) ;大豆品种0491713 (US2004168225) ;大豆品种0491711 (US2004168224) ;大豆品种0491722 (US2004168223) ;大豆品种0491724 (US2004168222) ;大豆品种0491720 (US2004168221) ;大豆品种0487682 (US2004168220) ;大豆品种0491714 (US2004168219) ;大豆品种0491719 (US2004168218) ;大豆品种DP 5634 RR (US2003177540) ;大豆品种S56-D7 (US2004098765) ;大豆品种926877 (US2004064859) ;大豆品种SE73753 (US2004055059) ;大豆品种SN83594 (US2004055058) ;大豆品种SE71112 (US2004055056) ;大豆品种SE73090 (US2004055054) ;大豆品种SN79526 (US2004055053) ;大豆品种SW90702 (US2004055052) ;大豆品种SN79525 (US2004055051) ;大豆品种SE90345 (US2004055050) ;大豆品种0149928 (US2004055049) ;大豆品种SN83780 (US2004055048) ;大豆品种0053840 (US2004055047) ;大豆品种924001 (US2004055046) ;大豆品种0004747 (US2004055057) ;大豆品种0037357 (US2004055045) ;大豆品种SN83366 (US2004055044) ;大豆品种SN76208 (US2004055043) ;大豆品种0037370 (US2004055042) ;大豆品种SX95512 (US2004049821) ;大豆品种0096008 (US 2004049820) ;大豆品种SN83544 (US2004049819) ;大豆品种0088401 (US2004049818) ;大豆品种SN64195 (US2004049817) ;大豆品种0034754 (US2004049816) ;大豆品种SN71173 (US2004049815) ;大豆品种SN83211 (US2004049814) ;大

豆品种92422749 (US2004045058);大豆品种0120311 (US2004045057);大豆品种S010344 (US2004003438);大豆品种70876922 (US2004003437);大豆品种924496 (US2004003436);大豆品种19705120 (US2003237116);大豆品种19704220 (US2003235914);大豆品种19704280 (US2003237115);大豆品种19704210 (US2003237114);大豆品种S37-N4 (US2003237113);大豆品种19602310 (US2003233685);大豆品种19704120 (US2003233684);大豆品种19704230 (US2003233683);大豆品种1000126 (US2003233682);大豆品种93831526 (US2003221226);大豆品种0322581 (US2003221225);大豆品种0332149 (US2003213028);大豆品种0332144 (US2003213027);大豆品种924788 (US2003213026);大豆品种924861 (US2003213025);大豆品种928070 (US2003213024);大豆品种S010354 (US2003213023);大豆品种S010360 (US2003213022);大豆品种S010361 (US2003213021);大豆品种S010363 (US2003213020);大豆品种S010364 (US2003213019);大豆品种0332148 (US2003208805);大豆品种0332147 (US2003208804);大豆品种0332146 (US2003208803);大豆品种0332135 (US2003208802);大豆品种1000144 (US2003208801);大豆品种0332143 (US2003208800);大豆品种0332145 (US2003208799);大豆品种S010345 (US2003204884);大豆品种0332131 (US2003204883);大豆品种0332130 (US2003204882);大豆品种0332129 (US2003204881);大豆品种0332122 (US2003204880);大豆品种S010350 (US2003204879);大豆品种S010355 (US2003204878);大豆品种031766 (US2003204877);大豆品种S010353 (US2003204876);大豆品种0322580 (US2003200579);大豆品种0322579 (US2003200578);大豆品种S010347 (US2003200577);大豆品种S010349 (US2003200576);大豆品种0332141 (US2003200575);大豆品种0332142 (US2003200574);大豆品种0332133 (US2003200573);大豆品种0332134 (US2003200572);大豆品种0332139 (US2003200571);大豆品种0332137 (US2003200570);大豆品种XB33U08 (US7598435);大豆品种XB27D08 (US7592519);大豆品种XB41M08 (US7589261);大豆品种XB05J08 (US7589260);大豆品种XB33T08 (US7589259);大豆品种XB30Y08 (US7586025);大豆品种XB40U08 (US7582813);大豆品种XB29M08 (US7582811);大豆品种93Y10 (US2009144843);大豆品种D4325666 (US2009055957);大豆品种D4125897 (US2009055956);大豆品种D4698573 (US2009055955);大豆品种D4356652 (US2009019592);大豆品种D4456885 (US2009019591);大豆品种D4698013 (US2009019590);大豆品种D4637114 (US2009019589);大豆品种D4102367 (US2009019595);大豆品种D4266582 (US2009019594);大豆品种D4422801 (US2009019593);大豆品种D4520980 (US2009019588);大豆品种D4521369 (US2009019587);大豆品种D4223057 (US2009019586);大豆品种D4682156 (US2009019585);大豆品种D4233569 (US 2009019584);大豆品种D4925614 (US2009019583);大豆品种D4203144 (US2009019604);大豆品种D4102536 (US2009019582);大豆品种D4865324 (US2009019581);大豆品种D4825495 (US2009019580);大豆品种D4659251 (US2009019579);大豆品种D4258962 (US2009019578);大豆品种D4253969 (US2009019577);大豆品种D4696658 (US2009019603);大豆品种D4256925 (US2009019576);大豆品种D4253681 (US2009019575);大豆品种D4789254 (US2009019574);大豆品种D4713125 (US2009019573);大豆品种D4526223 (US2009019572);大豆品种D4556201 (US2009019571);大豆品种D4012368 (US2009019570);大豆品种D4452019 (US2009019569);大豆品种D4201483 (US2009019568);大豆品种D4463892 (US2009019567);大豆品种

D4159630 (US2009019566) ; 大豆品种D4470236 (US2009019565) ; 大豆品种D4063284 (US2009019564) ; 大豆品种D4021792 (US2009013429) ; 大豆品种D4902530 (US2009013428) ; 大豆品种D4367012 (US2009013427) ; 大豆品种D4923560 (US2009013426) ; 大豆品种D4253854 (US2009013425) ; 大豆品种D4210110 (US2009007290) ; 大豆品种D4523081 (US2009007289) ; 大豆品种D4328762 (US2009007288) ; 大豆品种D4483789 (US2009007287) ; 大豆品种D4311702 (US2009007286) ; 大豆品种D4127789 (US2008313765) ; 大豆品种D4361423 (US2008313764) ; 大豆品种D4208814 (US2008313763) ; 大豆品种D4201139 (US2008313762) ; 大豆品种D4120384 (US2008313761) ; 大豆品种D4572906 (US2008313760) ; 大豆品种D4301279 (US2008313759) ; 大豆品种D4422957 (US2008313758) ; 大豆品种D4256958 (US2008313757) ; 大豆品种4074328 (US2008282366) ; 大豆品种XB47Q06 (US2008244767) ; 大豆品种XB26R06 (US2008244766) ; 大豆品种4991629 (US2008216190) ; 大豆品种4158090 (US2008216189) ; 大豆品种XB40K07 (US2008209582) ; 大豆品种D0069201 (US2008178345) ; 大豆品种D0064801 (US2008178320) ; 大豆品种D0063801 (US2008178344) ; 大豆品种D0061501 (US2008178343) ; 大豆品种4938051 (US2008178319) ; 大豆品种4880500 (US2008178318) ; 大豆品种4835953 (US2008178317) ; 大豆品种4684181 (US2008178342) ; 大豆品种4427363 (US2008178340) ; 大豆品种4676311 (US2008178339) ; 大豆品种4953710 (US2008178337) ; 大豆品种4857548 (US2008178336) ; 大豆品种4551757 (US2008178335) ; 大豆品种4027271 (US2008178334) ; 大豆品种4274171 (US2008178333) ; 大豆品种0341931 (US2008178332) ; 大豆品种4282159 (US2008178331) ; 大豆品种4852004 (US2008178330) ; 大豆品种4688589 (US2008178329) ; 大豆品种4614131 (US2008178327) ; 大豆品种4201823 (US2008178326) ; 大豆品种92M22 (US2008178350) ; 大豆品种4174206 (US2008178322) ; 大豆品种4305498 (US2008178321) ; 大豆品种4423586 (US2008172761) ; 大豆品种4568207 (US2008172756) ; 大豆品种4840308 (US2008172755) ; 大豆品种4256323 (US2008172754) ; 大豆品种4789516 (US7399907) ; 大豆品种90Y40 (US2008168581) ; 大豆品种4959932 (US7396983) ; 大豆品种4062885 (US7394000) ; 大豆品种4858197 (US7390940) ; 大豆品种4092390 (US7390939) ; 大豆品种4735486 (US7390938) ; 大豆品种4219527 (US7388132) ; 大豆品种4599695 (US7388131) ; 大豆品种4554257 (US7388130) ; 大豆品种4896902 (US7385113) ; 大豆品种4367308 (US7385112) ; 大豆品种4589609 (US7385111) ; 大豆品种4640250 (US7385110) ; 大豆品种4540394 (US7385109) ; 大豆品种4297661 (US7385108) ; 大豆品种4958786 (US7381866) ; 大豆品种4440685 (US7375262) ; 大豆品种4008211 (US7371938) ; 大豆品种4778469 (US7368637) ; 大豆品种4766295 (US7355103) ; 大豆品种4436909 (US7355102) ; 大豆品种4812469 (US7351886) ; 大豆品种4761767 (US7351885) ; 大豆品种4142393 (US7329801) ; 大豆品种4502135 (US7326832) ; 大豆品种4353363 (US7321082) ; 大豆品种91B42 (US7317143) ; 大豆品种0330739 (US2007271622) ; 大豆品种0384279 (US7294768) ; 大豆品种4175567 (US2007256187) ; 大豆品种4336643 (US2007256186) ; 大豆品种4671685 (US2007256185) ; 大豆品种4309194 (US2007256190) ; 大豆品种0330738 (US2007256184) ; 大豆品种0045477 (US2007256183) ; 大豆品种0437973 (US2007256182) ; 大豆品种0457028 (US2007256181) ; 大豆品种0367478 (US2007256180) ; 大豆品种0358232 (US2007256179) ; 大豆品种0417158 (US2007256178) ; 大豆品种4559809 (US2007256177) ; 大豆品种0196172

(US2007256176);大豆品种4785923 (US2007256175);大豆品种4587513 (US2007256174);大豆品种0409670 (US2007256173);大豆品种4010165 (US2007256172);大豆品种0421133 (US2007256171);大豆品种0240187 (US2007256170);大豆品种0387907 (US2007256169);大豆品种0232405 (US2007256168);大豆品种0146529 (US2007256167);大豆品种4788561 (US2007256166);大豆品种457114 (US2007256165);大豆品种0149217 (US2007256164);大豆品种4247825 (US2007254366);大豆品种0212938 (US2007256163);大豆品种0146565 (US2007256162);大豆品种4647672 (US2007256161);大豆品种0215818 (US2007256160);大豆品种0384531 (US2007256159);大豆品种4878185 (US2007254365);大豆品种4498438 (US2007256158);大豆品种0436052 (US2007256157);大豆品种4782157 (US2007256156);大豆品种0385457 (US2007256155);大豆品种0385240 (US2007256154);大豆品种4735316 (US2007256153);大豆品种0277524 (US2007256152);大豆品种0276951 (US2007256151);大豆品种XB37L07 (US2007245429);大豆品种XB35X07 (US2007226837);大豆品种XB35S07 (US2007226836);大豆品种XB35F07 (US2007226835);大豆品种XB34R07 (US2007226834);大豆品种XB34L07 (US2007226833);大豆品种XB34D07 (US2007226832);大豆品种XB33G07 (US2007226831);大豆品种98Y11 (US2007169220);大豆品种0137335 (US7241941);大豆品种XB15E07 (US2007150980);大豆品种92M52 (US2007150979);大豆品种XB47R07 (US2007136888);大豆品种XB46V07 (US2007136887);大豆品种XB57E07 (US2007136886);大豆品种XB54X07 (US2007136885);大豆品种XB54V07 (US2007136884);大豆品种XB52Q07 (US2007136883);大豆品种XB37M07 (US2007136882);大豆品种XB37J07 (US2007136881);大豆品种XB34Q07 (US2007136880);大豆品种XB32S07 (US2007136879);大豆品种XB32J07 (US2007136878);大豆品种XB31R07 (US2007136877);大豆品种XB31J07 (US2007136876);大豆品种XB29K07 (US2007136875);大豆品种XB31H07 (US2007136874);大豆品种XB30G07 (US2007136873);大豆品种XB30E07 (US2007136872);大豆品种XB25E07 (US2007136871);大豆品种XB26X07 (US2007136870);大豆品种XB23L07 (US2007136869);大豆品种XB 19Z07 (US2007136868);大豆品种XB19E07 (US2007136867);大豆品种XB18M07 (US2007136866);大豆品种XB18K07 (US2007136865);大豆品种XB18J07 (US2007136864);大豆品种XB17W07 (US2007136863);大豆品种XB17U07 (US2007136862);大豆品种XB15B07 (US2007136861);大豆品种XB12R07 (US2007136860);大豆品种XB11J07 (US2007136859);大豆品种XB04E07 (US2007136858);大豆品种XB02K07 (US2007136857);大豆品种XB49V07 (US2007136856);大豆品种XB48X07 (US2007136855);大豆品种92M75 (US2007136854);大豆品种XB48W07 (US2007136853);大豆品种XB44G07 (US2007136852);大豆品种XB42K07 (US2007136851);大豆品种XB42H07 (US2007136850);大豆品种XB41J07 (US2007136849);大豆品种XB40Y07 (US2007136848);大豆品种XB40X07 (US2007136847);大豆品种XB39E07 (US2007136846);大豆品种XB38W07 (US2007136845);大豆品种XB38S07 (US2007136844);大豆品种XB23V07 (US2007136843);大豆品种XB31M07 (US2007130652);大豆品种XB28E07 (US2007130651);大豆品种XB25S07 (US2007130650);大豆品种XB21N07 (US2007130649);大豆品种XB03Q07 (US2007130648);大豆品种XB49Q07 (US2007130647);大豆品种XB06M07 (US2007130646);大豆品种S04-97130-15-02 (US7196249);大豆品种S04-97026-N99-42648-01 (US7189896);大豆品种S05-97016-G99-21212 (US7186894);大豆品种S05-99048-19 (US7164064);大豆品种

92B14 (US7161065) ;大豆品种98R31 (US2007006350) ;大豆品种S05-97177-N00-22972 (US7132592) ;大豆品种XB25G06 (US2006225160) ;大豆品种91M70 (US2006174381) ;大豆品种XB24R06 (US2006162029) ;大豆品种S03-95368-N98-52902 (US7078594) ;大豆品种S05-97130-51 (US7078599) ;大豆品种XB11L06 (US2006130187) ;大豆品种94B13 (US7064251) ;大豆品种94B74 (US7064250) ;大豆品种XB27J06 (US2006112462) ;大豆品种XB29N06 (US2006112460) ;大豆品种XB28T06 (US2006112459) ;大豆品种XB16W06 (US2006112458) ;大豆品种XB18C06 (US2006112456) ;大豆品种XB 10M06 (US2006107391) ;大豆品种XB06K06 (US2006107390) ;大豆品种XB28V06 (US2006107389) ;大豆品种XB004A06 (US2006107388) ;大豆品种XB12L06 (US2006107387) ;大豆品种XB005A06 (US2006107386) ;大豆品种XB25H06 (US2006107385) ;大豆品种XB39W06 (US2006107384) ;大豆品种XB27K06 (US2006107383) ;大豆品种XB29R06 (US2006107382) ;大豆品种XB 16S06 (US2006107381) ;大豆品种XB36V06 (US2006107380) ;大豆品种XB07N06 (US2006107379) ;大豆品种XB23H06 (US2006107378) ;大豆品种XB35C06 (US2006107377) ;大豆品种XB32L06 (US2006107376) ;大豆品种XB58P06 (US2006107375) ;大豆品种XB36M06 (US2006107374) ;大豆品种XB22G06 (US2006107373) ;大豆品种XB36Q06 (US2006107372) ;大豆品种91M61 (US2006107371) ;大豆品种XB32A06 (US2006107370) ;大豆品种XB19V06 (US2006107369) ;大豆品种XB43C06 (US2006107368) ;大豆品种XB22N06 (US2006107367) ;大豆品种XB38E06 (US2006107366) ;大豆品种XB37U06 (US2006107365) ;大豆品种XB37Q06 (US2006107364) ;大豆品种XB00D06 (US2006107363) ;大豆品种XB14N06 (US2006107362) ;大豆品种XB31H06 (US2006107361) ;大豆品种XB21Z06 (US2006107360) ;大豆品种XB005B06 (US2006107359) ;大豆品种XB15W06 (US2006107358) ;大豆品种XB33N06 (US2006107357) ;大豆品种XB18W06 (US2006107356) ;大豆品种XB32M06 (US2006107355) ;大豆品种XB19F06 (US2006107354) ;大豆品种S03-95021-55-138-AB (US7026531) ;大豆品种94M41 (US7002061) ;大豆品种91M50 (US6998518) ;大豆品种92B13 (US6989475) ;大豆品种93B68 (US6989474) ;大豆品种93B09 (US6979759) ;大豆品种92M00 (US6972352) ;大豆品种XB08P05 (US2005120433) ;大豆品种XB26V05 (US2005150023) ;大豆品种XB21R05 (US2005108795) ;大豆品种XB28E05 (US2005114942) ;大豆品种XB58K05 (US2005114941) ;大豆品种XB27B05 (US2005114940) ;大豆品种XB21S05 (US2005150022) ;大豆品种XB26U05 (US2005138695) ;大豆品种XB35K05 (US2005150021) ;大豆品种XB18S05 (US2005120436) ;大豆品种XB25C05 (US2005120435) ;大豆品种90M01 (US2005120434) ;大豆品种XB22H05 (US2005150020) ;大豆品种XB22K05 (US2005114939) ;大豆品种XB58G05 (US2005114938) ;大豆品种XB57U05 (US2005120432) ;大豆品种XB49M05 (US2005120431) ;大豆品种XB20D05 (US2005144683) ;大豆品种XB41B05 (US2005150019) ;大豆品种XB38T05 (US2005120430) ;大豆品种XB13T05 (US2005120429) ;大豆品种XB19Y05 (US2005120428) ;大豆品种XB43D05 (US2005120427) ;大豆品种XB40E05 (US2005120426) ;大豆品种XB39N05 (US2005120425) ;大豆品种93M01 (US2005120424) ;大豆品种XB31W05 (US2005223439) ;大豆品种XB32C05 (US2005114937) ;大豆品种XB40D05 (US2005120423) ;大豆品种92M61 (US2005120422) ;大豆品种91M91 (US2005114936) ;大豆品种XB33Y05 (US2005120421) ;大豆品种XB34A05 (US2005120420) ;大豆品种XB13U05 (US2005114935) ;大豆品种XB12K05 (US2005114934) ;大豆品种XB30P05 (US2005120419) ;大豆品种XB57T05 (US2005114933) ;大

豆品种XB17S05 (US2005114932) ;大豆品种XB25Y05 (US2005114930) ;大豆品种XB25S05 (US2005150017) ;大豆品种XB43W04 (US2004177420) ;大豆品种XB44W04 (US2004177419) ;大豆品种XB53J04 (US2004199960) ;大豆品种XB43V04 (US2004216192) ;大豆品种XB49K04 (US2004172668) ;大豆品种XB27P04 (US 2004205864) ;大豆品种XB29L04 (US2004177418) ;大豆品种XB29K04 (US2004177417) ;大豆品种XB41U04 (US2004231017) ;大豆品种XB34D04 (US2004177416) ;大豆品种XB09J04 (US2004172711) ;大豆品种XB32Y04 (US2004194169) ;大豆品种XB44D04 (US2004172710) ;大豆品种XB44C04 (US2004172709) ;大豆品种XB10L04 (US2004172708) ;大豆品种XB 19U04 (US2004172707) ;大豆品种XB02F04 (US2004172706) ;大豆品种XB25X04 (US2004172705) ;大豆品种XB26L04 (US2004172704) ;大豆品种XB11F04 (US2004172703) ;大豆品种XB40Z04 (US2004177415) ;大豆品种XB40Y04 (US2004181833) ;大豆品种XB007C04 (US2004181832) ;大豆品种96M20 (US2004172702) ;大豆品种XB39J04 (US2004172701) ;大豆品种XB29A04 (US2004172700) ;大豆品种XB35P04 (US2004172699) ;大豆品种XB58Z04 (US2004177414) ;大豆品种XB43R04 (US2004172698) ;大豆品种XB35L04 (US2004172697) ;大豆品种XB06H04 (US2004172696) ;大豆品种XB59U04 (US2004172695) ;大豆品种XB64C04 (US2004172694) ;大豆品种95M80 (US2004172693) ;大豆品种XB35Q04 (US2004177413) ;大豆品种XB04D04 (US2004177412) ;大豆品种XB08L04 (US2004177411) ;大豆品种XB18Q04 (US2004177410) ;大豆品种XB16Q04 (US2004177409) ;大豆品种XB55K04 (US2004172692) ;大豆品种XB57M04 (US2004172691) ;大豆品种XB25L04 (US2004205863) ;大豆品种XB48T04 (US2004194168) ;大豆品种XB42X04 (US2004199959) ;大豆品种XB31T04 (US2004177408) ;大豆品种XB31U04 (US2004194167) ;大豆品种XB30E04 (US2004177407) ;大豆品种XB31R04 (US2004177406) ;大豆品种S03-95341-A98-60618 (US6909033) ;大豆品种SN97-6946 (US2004168227) ;大豆品种94M70 (US6864408) ;大豆品种92M70 (US6797866) ;大豆品种92M71 (US6858782) ;大豆品种91M40 (US6828490) ;大豆品种93M80 (US6849789) ;大豆品种XB39N03 (US6864407) ;大豆品种93M90 (US6846975) ;大豆品种90M90 (US6852913) ;大豆品种92M72 (US6960708) ;大豆品种91M90 (US6849788) ;大豆品种92M50 (US6855876) ;大豆品种92M30 (US6951974) ;大豆品种93M60 (US6797865) ;大豆品种93M40 (US6791016) ;大豆品种93M41 (US6835875) ;大豆品种XB15P03 (US6797864) ;大豆品种XB24H03 (US6936752) ;大豆品种XB05A03 (US6815585) ;大豆品种92M80 (US6849787) ;大豆品种XB33S03 (US6855875) ;大豆品种XB48P03 (US6797863) ;大豆品种XB29X03 (US6806406) ;大豆品种XB02C03 (US6800795) ;大豆品种XB29W03 (US6858781) ;大豆品种91M10 (US6958437) ;大豆品种92M10 (US6916975) ;大豆品种XB10G03 (US6806405) ;大豆品种92M31 (US6846974) ;大豆品种XB38D03 (US6806404) ;大豆品种XB34N03 (US6803508) ;大豆品种XB30W03 (US6809236) ;大豆品种XB37J03 (US6844488) ;大豆品种SE72581 (US2004148665) ;大豆品种SE90076 (US2004148664) ;大豆品种SD82997 (US2004148663) ;大豆品种0037393 (US2004148662) ;大豆品种0088414 (US2004148661) ;大豆品种0149926 (US2004148660) ;大豆品种0037209 (US2004148659) ;大豆品种93B36 (US6833498) ;大豆品种90B74 (US6812384) ;大豆品种90B51 (US6818809) ;大豆品种91B03 (US6815584) ;大豆品种95B43 (US6818808) ;大豆品种95B42 (US6815583) ;大豆品种92B47 (US6812383) ;大豆品种SE90346 (US2004055055) ;大豆品种0007583 (US2004010824) ;大豆品种0008079 (US2004010823) ;大豆品种S02-AP98041-



2-333-01 (US2003121076) ; 大豆品种S02-98041-2-251-01 (US2003182694) ; 大豆品种S02-AP98041-2-262-02 (US2003196220) ; 大豆品种S02-95021-55-240-BA (US2003188348) ; 大豆品种APA94-31572 (US2003061641) ; 大豆品种AP98041-1-203 (US2003056251) ; 大豆品种APA95-15294 (US2003061640) ; 大豆品种AP98041-4-117 (US2003056250) ; 大豆品种91B33 (US6580018) ; 大豆品种93B85 (US6605762) ; 大豆品种92B76 (US6610911) ; 大豆品种92B38 (US6605761) ; 大豆品种94B24 (US6613967) ; 大豆品种94B73 (US6605760) ; 大豆品种93B86 (US6610910) ; 大豆品种91B12 (US6583343) ; 大豆品种95B34 (US6605759) ; 大豆品种94B23 (US6605758) ; 大豆品种90B11 (US6583342) ; 大豆品种91B92 (US6586659) ; 大豆品种95B96 (US6605757) ; 大豆品种93B72 (US6566589) ; 大豆品种95B97 (US6613966) ; 大豆品种92B95 (US6608243) ; 大豆品种93B47 (US6583341) ; 大豆品种97B52 (US6605756) ; 大豆品种93B15 (US6617499) ; 大豆品种94B54 (US6613965) ; 大豆品种93B67 (US6573433) ; 大豆品种93B87 (US6727410) ; 大豆品种96B51 (US6613964) ; 大豆品种92B84 (US6730829) ; 大豆品种92B12 (US6605755) ; 大豆品种90A07 (US6320105) ; 大豆品种93B26 (US6342659) ; 大豆品种96B21 (US6369301) ; 大豆品种92B63 (US6326529) ; 大豆品种93B46 (US6323402) ; 大豆品种92B75 (US6362400) ; 大豆品种93B08 (US6323401) ; 大豆品种97B62 (US6323400) ; 大豆品种92B37 (US6323399) ; 大豆品种92B56 (US6339186) ; 大豆品种93B66 (US6307131) ; 大豆品种92B62 (US6346657) ; 大豆品种92B36 (US6369300) ; 大豆品种90B73 (US6316700) ; 大豆品种95B95 (US6323398) ; 大豆品种93B65 (US6229074) ; 大豆品种92B24 (US6284950) ; 大豆品种94B53 (US6235976) ; 大豆品种94B22 (US6140557) ; 大豆品种93B84 (US6143956) ; 大豆品种95B32 (US6229073) ; 大豆品种95B53 (US6147283) ; 大豆品种93B35 (US6153816) ; 大豆品种93B07 (US6143955) ; 大豆品种92B74 (US6124526) ; 大豆品种92B35 (US6166296) ; 大豆品种94B45 (US6162968) ; 大豆品种96B01 (US6143954) ; 大豆品种93B53 (US6335197) 。

[0696] 观察到原种事件至这些品种中的基因渗入未显著影响这些品种的任何期望的表型或农艺学特征(无产量抑制现象),同时转基因的表达(如通过草甘膦和/或异噁唑草酮或草胺膦抗性测定的)满足商业可接受的水平。

[0697] 有利地可将堆与市场上可获得的一种或多种其它大豆事件进一步组合,所述其它大豆事件包括但不限于其它耐除草剂事件,例如USDA-APHIS申请(petition)中描述的事件:09-349-01p、09-201-01p、09-183-01p、09-082-01p、09-015-01p、06-354-01p、06-271-01p、06-178-01p、98-238-01p、98-014-01p、97-008-01p、96-068-01p、95-335-01p、93-258-01p(参见例如,[www.aphis.usda.gov/brs/not\\_reg.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html))或US 2006-282915中描述的事件MON89788(草甘膦抗性)、WO 2008/054747中描述的事件DP-305423-1(高油酸/ALS抑制剂抗性)、US2009130071中描述的MON87701、US2009036308中描述的事件3560.4.3.5或US2008312082中描述的事件DP-305423-1或WO 2010/080829中描述的事件BPS-CV127-9(事件127)。

[0698] 如下文权利要求中所用,除非另外明确地指出,否则术语“植物”意欲包括任何成熟阶段的植物组织以及采自或来源于任何此类植物的细胞、组织或器官,包括但不限于任何种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。

[0699] 将包含原种事件EE-GM3的参照种子于2009年10月12日在NCIMB登录号NCIMB 41659下作为32-RRMM-0531保藏在NCIMB(Ferguson Building,Craibstone Estate,

Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland), 验证其成活力。EE-GM3的别名为事件FG-072或MST-FG072-3。

[0700] 将包含原种事件EE-GM1的参照种子于2009年10月12日在NCIMB登录号NCIMB 41658下作为32RRMM0368保藏在NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland)。EE-GM1的别名为事件LL27、A2704-12或ACS-GM005-3。

[0701] 将包含原种事件EE-GM2的参照种子于2009年10月12日在NCIMB登录号NCIMB 41660下作为32CON0688保藏在NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland)。EE-GM2的别名为事件LL55、A5547-127或ACS-GM006-4。

[0702] 将包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的参照种子于2010年6月11日在ATCC登录号PTA-11041下作为111606大豆保藏在ATCC (美国典型培养物保藏中心, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA)。

[0703] 将包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的参照种子于2010年6月11日在ATCC登录号PTA-11042下作为05SHX2XEB大豆保藏在ATCC (美国典型培养物保藏中心, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA)。

[0704] 本发明的上述说明旨在举例说明而不非限定。

[0705] 所述实施方案的各种改变或变更对本领域技术人员来说是可想到的。在不背离本发明的精神或范围的情况下进行此类改变和变更。

[0706] 本发明的一些实施方案如下：

[0707] 1. 一种用于鉴定原种事件EE-GM3和EE-GM1在生物样品中的同时存在的方法，所述方法包括利用特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域，和利用特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM1特异性区域。

[0708] 2. 实施方案1所述的方法，所述方法包括使用利用至少两个引物的第一聚合酶链式反应，和使用利用至少两个引物的第二聚合酶链式反应，从存在于所述生物样品中的核酸扩增两个50至1000bp的DNA片段，在所述第一聚合酶链式反应中，所述引物之一识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 侧翼区域或EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3' 侧翼区域，所述5' 侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列，所述3' 侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列，所述引物的另一个引物识别EE-GM3的外源DNA内的序列，所述外源DNA包含SEQ ID No. 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列，或所述引物的另一个引物识别EE-GM3的外源DNA内的序列，所述外源DNA包含SEQ ID No. 1的核苷酸序列或其互补序列，或包含SEQ ID No. 20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列，并且在所述第二聚合酶链式反应中，所述引物之一识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 侧翼区域或EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的3' 侧翼区域，所述5' 侧翼区域包含SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列，所述3' 侧翼区域包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核

核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别EE-GM1的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No.13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列,或所述引物的另一个引物识别EE-GM1的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.11的核苷酸序列或其互补序列,其中所述第一聚合酶和第二聚合酶反应可以是相继的或同时的。

[0709] 3.实施方案2所述的方法,其中识别EE-GM3的5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No.3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No.3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No.1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸,并且其中识别EE-GM1的5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No.12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No.13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM1的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No.13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列或SEQ ID No.11的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸。

[0710] 4.实施方案2所述的方法,其中识别EE-GM3的5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No.3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No.3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No.1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸,并且其中识别EE-GM1的5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No.12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM1的3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No.13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM1的外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No.13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列或SEQ ID No.11的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸。

[0711] 5.实施方案4所述的方法,其中所述EE-GM3特异性引物分别包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.4的序列,或分别包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.7的序列,以及所述EE-GM1特异性引物分别包含SEQ ID No.16和SEQ ID No.17的序列。

[0712] 6.实施方案5所述的方法,所述方法包括使用EE-GM3 PCR鉴定方案扩增约263或约706bp的EE-GM3特异性片段和扩增约183bp的EE-GM1特异性片段。

[0713] 7.一种用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1在生物样品中的同时存在的试剂盒,所述试剂盒包括一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域的引物,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,或一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域的引物,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,和一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的引物,所述外源DNA包含SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列,并且其中所述试剂盒还包括一种识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域的引物,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列,或一种识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域的引物,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列,和一种识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的引物,所述外源DNA包含SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列。

[0714] 8.实施方案7所述的试剂盒,其中识别EE-GM3的所述5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸,并且其中识别EE-GM1的所述5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM1的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM1的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸。

[0715] 9.实施方案7所述的试剂盒,其中识别EE-GM3的所述5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM3的所述3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的所述外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸,并且其中,识别EE-GM1的所述5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM1的

所述3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM1的所述外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.12的核苷酸210至核苷酸720的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 13的核苷酸1至核苷酸568的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸。

[0716] 10.实施方案7所述的试剂盒,其包括包含SEQ ID No.4的序列的引物和包含SEQ ID No.5的序列的引物或包括包含SEQ ID No.5的序列的引物和包含SEQ ID No.7的序列的引物以及还包括包含SEQ ID No.16的序列的引物和包含SEQ ID No.17的序列的引物。

[0717] 11.一对引物,所述第一引物包含在最优化的检测条件下特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域内的序列的序列,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,并且所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸的1408的互补序列的核苷酸序列,并且所述第二引物包含在最优化的检测条件下特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域内的序列的序列,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列,并且所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列。

[0718] 12.实施方案11所述的引物对,其中所述第一引物包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且其中所述第二引物包含选自SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列。

[0719] 13.实施方案11所述的引物对,其中所述第一引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且其中所述第二引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 12的核苷酸1至核苷酸209的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列。

[0720] 14.一对引物,其中所述第一引物在其最3'末端包含SEQ ID No.5的序列并且其中所述第二引物在其最3'末端包含SEQ ID No.16的序列。

[0721] 15.一种包含4种引物的装置,

[0722] 第一引物在其最3'末端包含SEQ ID No.5的序列;

[0723] 第二引物在其最3'末端包含SEQ ID No.4的序列;

[0724] 第三引物在其最3'末端包含SEQ ID No.16的序列;和

[0725] 第四引物在其最3'末端包含SEQ ID No.17的序列。

[0726] 16.实施方案1所述的方法,所述方法包括将生物样品的核酸与针对EE-GM3的第一特异性探针和与针对EE-GM1的第二特异性探针杂交。

[0727] 17.实施方案16所述的方法,其中所述第一特异性探针的序列与包含EE-GM3的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性,并且其中所述第二特异性探针的序列与包含EE-GM1的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部

分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性。

[0728] 18. 实施方案17所述的方法, 其中所述第一特异性探针的序列与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472或SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二特异性探针的序列与SEQ ID No.12的核苷酸199至220或SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0729] 19. 一种用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1在生物样品中的同时存在的试剂盒, 所述试剂盒包括能够与EE-GM3的特异性区域特异性杂交的第一特异性探针和能够与EE-GM1的特异性区域特异性杂交的第二特异性探针。

[0730] 20. 实施方案19所述的试剂盒, 其中所述第一特异性探针的序列与包含EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二特异性探针的序列与包含EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性。

[0731] 21. 实施方案20所述的试剂盒, 其中所述第一特异性探针的序列包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性的序列, 并且其中所述第二特异性探针的序列与SEQ ID No.12的核苷酸199至220或SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0732] 22. 一对用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1在生物样品中的同时存在的特异性探针。

[0733] 23. 实施方案22所述的探针对, 其包括第一探针和第二探针, 所述第一探针包含核苷酸序列, 所述核苷酸序列与包含EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列或其互补序列具有至少80%的序列同一性, 所述第二探针包含核苷酸序列, 所述核苷酸与包含EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列或其互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0734] 24. 实施方案23所述的引物对, 其中所述第一探针与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二探针与SEQ ID No.12的核苷酸199至220或SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0735] 25. 一组用于鉴定原种事件EE-GM3和EE-GM1在生物样品中的同时存在的特异性探针, 包括第一探针和第二探针, 所述第一探针具有包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列的序列, 所述第二探针具有与SEQ ID No.12的核苷酸199至220或SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0736] 26. 一种用于确认种子样品中的种子纯度的方法, 所述方法包括用特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域, 和用特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM1特异性区域。

[0737] 27.一种用于在种子批的样品中筛选种子的原种事件EE-GM3和EE-GM1的存在的方法,所述方法包括用特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域,和用特异性识别EE-GM1的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM1特异性区域。

[0738] 28.一种通过与大体上互补的标记核酸探针杂交来检测原种事件EE-GM3和EE-GM1在生物样品中的存在的方法,其中通过再循环靶核酸序列来放大探针:靶核酸比率,所述方法包括:

[0739] a) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1469的核苷酸序列或其互补序列的第一核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸223至核苷酸240的核苷酸序列或其互补序列的所述第一核酸核苷酸杂交;

[0740] b) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 2的核苷酸1434至核苷酸1451的核苷酸序列或其互补序列的第二核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸258的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交,其中所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸重叠至少一个核苷酸,并且其中将所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸标记为所述标记核酸探针;

[0741] c) 用产生选择性探针切割从而导致双链体离解的酶仅切割探针:靶核酸序列双链体内的标记探针,从而使所述靶序列保持完整;

[0742] d) 通过重复步骤(a)至(c)再循环所述靶核酸序列;和

[0743] e) 检测切割的标记探针,从而确定所述靶核酸序列的存在;和

[0744] f) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 12的核苷酸210至核苷酸227的核苷酸序列或其互补序列的第三核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 13的核苷酸561至核苷酸568的核苷酸序列或其互补序列的所述第三核酸寡核苷酸杂交;

[0745] g) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 12的核苷酸192至核苷酸209的核苷酸序列或其互补序列的第四核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸586的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交,其中所述第三寡核苷酸和第四寡核苷酸重叠至少一个核苷酸,并且其中将所述第三寡核苷酸或所述第四寡核苷酸标记为所述标记核酸探针;

[0746] h) 用产生选择性探针切割从而导致双链体离解的酶仅切割探针:靶核酸序列双链体内的标记探针,从而使所述靶序列保持完整;

[0747] i) 通过重复步骤(f)至(h)再循环所述靶核酸序列;和

[0748] j) 检测切割的标记探针,从而确定所述靶核酸序列的存在。

[0749] 29.一种各自在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1的转基因大豆植物或其细胞、部分、组织、种子或后代,已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的包含所述事件EE-GM3的参照种子和已于保藏号NCIMB 41658下保藏在NCIMB的包含所述事件EE-GM1的参照种子,或已于保藏号PTA-11041下保藏在ATCC的在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1的参照种子。

[0750] 30.实施方案29所述的转基因大豆植物、种子、细胞、组织、部分或后代,其基因组DNA,当使用针对EE-GM3的原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID 4和SEQ ID 5的核苷酸序列的引物进行分析时,产生约263bp的DNA片段,并且其基因组DNA,当使用针对EE-

GM1的原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID 16和SEQ ID 17的核苷酸序列进行分析时,产生约183bp的DNA片段。

[0751] 31.一种各自在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM1的大豆植物、其植物部分或种子、细胞或组织,所述大豆植物可通过将包含原种事件EE-GM3的大豆植物与在其基因组中包含原种事件EE-GM1的大豆植物杂交来获得,所述包含原种事件EE-GM3的大豆植物可通过从已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得,所述包含原种事件EE-GM1的大豆植物可通过从于保藏号NCIMB 41658下保藏在NCIMB的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得,或所述大豆植物可通过从已于登录号PTA-11041下保藏在ATCC的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得。

[0752] 32.一种包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的大豆种子、已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的包含事件EE-GM3的参照种子、已于保藏号NCIMB 41658下保藏在NCIMB的包含事件EE-GM1的参照种子和已于保藏号PTA-11041下保藏在ATCC的包含事件EE-GM3和EE-GM1的参照种子。

[0753] 33.一种可从实施方案32所述的种子获得的包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的转基因大豆植物、植物部分、细胞或组织。

[0754] 34.一种用于产生包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的大豆植物或种子的方法,包括将根据实施方案29至33中任一项所述的植物与另一种大豆植物杂交,和种植获自所述杂交的种子。

[0755] 35.一种包含原种事件EE-GM3和EE-GM1的大豆基因组DNA。

[0756] 36.一对分离的核酸分子,所述第一核酸分子包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至核苷酸1452或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列,并且所述第二核酸分子包含与SEQ ID No.12的核苷酸199至核苷酸220或SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0757] 37.实施方案36所述的分离的核酸分子对,所述第一核酸分子包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至核苷酸1462或SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列,并且所述第二核酸分子包含与SEQ ID No.12的核苷酸189至核苷酸230或SEQ ID No.13的核苷酸548至589或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0758] 38.一种大豆植物,其在其基因组中按顺序包含下列核苷酸序列:

[0759] a) SEQ ID No 2的核苷酸1至1451的核苷酸序列;

[0760] b) SEQ ID 1的核苷酸6760至核苷酸6958的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;

[0761] c) SEQ ID 1的核苷酸6874至核苷酸7298的核苷酸序列;

[0762] d) SEQ ID 1的核苷酸7至核苷酸7291的核苷酸序列;

[0763] e) SEQ ID 1的核苷酸12至核苷酸7265的核苷酸序列;

[0764] f) SEQ ID 3的核苷酸217至核苷酸240的核苷酸序列;和

[0765] g) SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的核苷酸序列:并且还按顺序包含下列序列:

[0766] h) SEQ ID No 12的核苷酸1至209的核苷酸序列;

[0767] i) SEQ ID 11的核苷酸340至核苷酸3461的核苷酸序列;



- [0768] j) SEQ ID 11的核苷酸1至核苷酸336的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0769] k) SEQ ID 11的核苷酸3462至核苷酸4076的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0770] l) SEQ ID 11的核苷酸337至核苷酸3043的核苷酸序列;
- [0771] m) SEQ ID 13的核苷酸559至核苷酸568的核苷酸序列;和
- [0772] n) SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的核苷酸序列。
- [0773] 39.一种按顺序包含下列核苷酸序列的DNA分子:
- [0774] a) SEQ ID No 2的核苷酸1至1451的核苷酸序列;
- [0775] b) SEQ ID 1的核苷酸6760至核苷酸6958的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0776] c) SEQ ID 1的核苷酸6874至核苷酸7298的核苷酸序列;
- [0777] d) SEQ ID 1的核苷酸7至核苷酸7291的核苷酸序列;
- [0778] e) SEQ ID 1的核苷酸12至核苷酸7265的核苷酸序列;
- [0779] f) SEQ ID 3的核苷酸217至核苷酸240的核苷酸序列;
- [0780] g) SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的核苷酸序列;以及还按顺序包含下列序列:
- [0781] h) SEQ ID No 12的核苷酸1至209的核苷酸序列;
- [0782] i) SEQ ID 11的核苷酸340至核苷酸3461的核苷酸序列;
- [0783] j) SEQ ID 11的核苷酸1至核苷酸336的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0784] k) SEQ ID 11的核苷酸3462至核苷酸4076的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0785] l) SEQ ID 11的核苷酸337至核苷酸3043的核苷酸序列;
- [0786] m) SEQ ID 13的核苷酸559至核苷酸568的核苷酸序列;和
- [0787] n) SEQ ID No 13的核苷酸569至核苷酸1000的核苷酸序列。
- [0788] 40.一种用于鉴定原种事件EE-GM3和EE-GM2在生物样品中的同时存在的方法,所述方法包括用特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域,和用特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM2特异性区域。
- [0789] 41.实施方案40所述的方法,所述方法包括使用利用至少两个引物的第一聚合酶链式反应,和使用利用至少两个引物的第二聚合酶链式反应,从存在于所述生物样品中的核酸扩增两个50至1000bp的DNA片段,在所述第一聚合酶链式反应中,所述引物之一识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域或EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别EE-GM3的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列,或所述引物的另一个引物识别EE-GM3的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.1的核苷酸序列或其互补序列,或包含SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列,并且在所述第二聚合酶链式反应中,所述引物之一识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域或EE-GM2的包含耐除草剂

基因的外源DNA的3'侧翼区域,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列,所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列,所述引物的另一个引物识别EE-GM2的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列,或所述引物的另一个引物识别EE-GM2的外源DNA内的序列,所述外源DNA包含SEQ ID No.11的核苷酸序列或其互补序列,其中所述第一聚合酶和第二聚合酶反应可以是相继的或同时的。

[0790] 42.实施方案41所述的方法,其中识别EE-GM3的5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No.1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸,并且其中识别EE-GM2的5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM2的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No.14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列或SEQ ID No.11的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸。

[0791] 43.实施方案41所述的方法,其中识别EE-GM3的5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸,并且其中识别EE-GM2的5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM2的3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM2的外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸。

[0792] 44.实施方案43所述的方法,其中所述EE-GM3特异性引物分别包含SEQ ID No.5和SEQ ID No.4的序列,或分别包含SEQ ID No 5和SEQ ID No.7的序列,并且所述EE-GM2特异性引物分别包含SEQ ID No.18和SEQ ID No.19的序列。

[0793] 45. 实施方案44所述的方法, 所述方法包括使用EE-GM3PCR鉴定方案扩增约263或约706bp的EE-GM3特异性片段和扩增约151bp的EE-GM2特异性片段。

[0794] 46. 一种用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2在生物样品中的同时存在的试剂盒, 所述试剂盒包括一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域的引物, 所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列, 或一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域的引物, 所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列, 和一种识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的引物, 所述外源DNA包含SEQ ID No. 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No. 20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列, 并且其中所述试剂盒还包括一种识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域的引物, 所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列, 或一种识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域的引物, 所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列, 和一种识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA内的序列的引物, 所述外源DNA包含SEQ ID No. 14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列。

[0795] 47. 实施方案46所述的试剂盒, 其中识别EE-GM3的所述5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列, 或识别EE-GM3的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列, 并且识别EE-GM3的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No. 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列或SEQ ID No. 20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸, 并且其中识别EE-GM2的所述5'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列, 或识别EE-GM2的3'侧翼区域的所述引物包含选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列, 并且识别EE-GM2的外源DNA内的序列的所述引物包含选自SEQ ID No. 14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列的17至200个连续核苷酸。

[0796] 48. 实施方案46所述的试剂盒, 其中识别EE-GM3的所述5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或识别EE-GM3的所述3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列, 并且识别EE-GM3的所述外源DNA的内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No. 2的核苷酸1452至核苷酸1843的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 3的核苷酸1至核苷酸240的核苷酸序列或SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列、或SEQ ID No. 20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续

核苷酸,并且其中,识别EE-GM2的所述5'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,或识别EE-GM2的所述3'侧翼区域的所述引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且识别EE-GM2的所述外源DNA内的序列的所述引物在其3'末端包含选自SEQ ID No.14的核苷酸312至核苷酸810的互补序列的核苷酸序列或SEQ ID No 15的核苷酸1至核苷酸507的核苷酸序列或SEQ ID No 11的核苷酸序列或其互补序列的至少17个连续核苷酸。

[0797] 49.实施方案46所述的试剂盒,其包括包含SEQ ID No.4的序列的引物和包含SEQ ID No.5的序列的引物或包括包含SEQ ID No.5的序列的引物和包含SEQ ID No.7的序列的引物以及还包括包含SEQ ID No.18的序列的引物和包含SEQ ID No.19的序列的引物。

[0798] 50.一对适用于EE-GM3和EE-GM2的特异性检测的引物,所述第一引物包含在最优化的检测条件下特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域内的序列的序列,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列,并且所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸的1408的互补序列的核苷酸序列,并且所述第二引物包含在最优化的检测条件下特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'或3'侧翼区域内的序列的序列,所述5'侧翼区域包含SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列,并且所述3'侧翼区域包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列。

[0799] 51.实施方案50所述的引物对,其中所述第一引物包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列,并且其中所述第二引物包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的17至200个连续核苷酸的核苷酸序列。

[0800] 52.实施方案50所述的引物对,其中所述第一引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 2的核苷酸1至核苷酸1451的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列,并且其中所述第二引物在其最3'末端包含选自SEQ ID No 14的核苷酸1至核苷酸311的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列或选自SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸1880的互补序列的核苷酸序列的至少17个连续核苷酸的核苷酸序列。

[0801] 53.一对引物,其中所述第一引物在其最3'末端包含SEQ ID No.5的序列并且其中所述第二引物在其最3'末端包含SEQ ID No.18的序列。

[0802] 54.一种包含4种引物的装置,

[0803] 第一引物在其最3'末端包含SEQ ID No.5的序列;

[0804] 第二引物在其最3'末端包含SEQ ID No.4的序列;

[0805] 第三引物在其最3'末端包含SEQ ID No.18的序列;和

[0806] 第四引物在其最3'末端包含SEQ ID No.19的序列。

[0807] 55.实施方案40所述的方法,所述方法包括将生物样品的核酸与针对EE-GM3的第一特异性探针和与针对EE-GM2的第二特异性探针杂交。

[0808] 56. 实施方案55所述的方法, 其中所述第一特异性探针的序列与包含EE-GM3的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二特异性探针的序列与包含EE-GM2的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性。

[0809] 57. 实施方案56所述的方法, 其中所述第一特异性探针的序列与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472或SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二特异性探针的序列与SEQ ID No.14的核苷酸301至322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0810] 58. 一种用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2在生物样品中的同时存在的试剂盒, 所述试剂盒包括能够与EE-GM3的特异性区域特异性杂交的第一特异性探针和能够与EE-GM2的特异性区域特异性杂交的第二特异性探针。

[0811] 59. 实施方案58所述的试剂盒, 其中所述第一特异性探针的序列与包含EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二特异性探针的序列与包含EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列具有至少80%的序列同一性。

[0812] 60. 实施方案59所述的试剂盒, 其中所述第一特异性探针的序列包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性的序列, 并且其中所述第二特异性探针的序列与SEQ ID No.14的核苷酸301至322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0813] 61. 一对用于鉴定原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2在生物样品中的同时存在的特异性探针。

[0814] 62. 实施方案61所述的探针对, 其包括第一探针和第二探针, 所述第一探针包含核苷酸序列, 所述核苷酸序列与包含EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列或其互补序列具有至少80%的序列同一性, 并且所述第二探针包含核苷酸序列, 所述核苷酸序列与包含EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼序列或3'侧翼序列的部分和与其邻接的外源DNA的序列的序列或其互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0815] 63. 实施方案62所述的引物对, 其中所述第一探针与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性, 并且其中所述第二探针与SEQ ID No.14的核苷酸301至322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列具有至少80%的序列同一性。

[0816] 64. 一组用于鉴定原种事件EE-GM3和EE-GM2在生物样品中的同时存在的特异性探针, 包括第一探针和第二探针, 所述第一探针具有包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至1462或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列的序列, 所述第二探针具有与SEQ ID No.14的核苷酸301至322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0817] 65. 一种用于确认种子样品中的种子纯度的方法, 所述方法包括用特异性识别EE-

GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域,和用特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM2特异性区域。

[0818] 66.一种用于在种子批的样品中筛选种子的原种事件EE-GM3的存在的方法,所述方法包括用特异性识别EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM3特异性区域,和用特异性识别EE-GM2的包含耐除草剂基因的外源DNA的5' 或3' 侧翼区域的特异性引物或探针检测EE-GM2特异性区域。

[0819] 67.一种通过与大体上互补的标记核酸探针杂交来检测原种事件EE-GM3和EE-GM2在生物样品中的存在的方法,其中通过再循环靶核酸序列来放大探针:靶核酸比率,所述方法包括:

[0820] a) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 2的核苷酸1452至核苷酸1469的核苷酸序列或其互补序列的第一核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸223至核苷酸240的核苷酸序列或其互补序列的所述第一核酸核苷酸杂交;

[0821] b) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 2的核苷酸1434至核苷酸1451的核苷酸序列或其互补序列的第二核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸258的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交,其中所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸重叠至少一个核苷酸,并且其中将所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸标记为所述标记核酸探针;

[0822] c) 用产生选择性探针切割从而导致双链体离解的酶仅切割探针:靶核酸序列双链体内的标记探针,从而使所述靶序列保持完整;

[0823] d) 通过重复步骤(a)至(c)再循环所述靶核酸序列;和

[0824] e) 检测切割的标记探针,从而确定所述靶核酸序列的存在;和

[0825] f) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 14的核苷酸312至核苷酸329的核苷酸序列或其互补序列的第三核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 15的核苷酸490至核苷酸507的核苷酸序列或其互补序列的所述第三核酸寡核苷酸杂交;

[0826] g) 将所述靶核酸序列与包含SEQ ID No 14的核苷酸294至核苷酸311的核苷酸序列或其互补序列的第四核酸寡核苷酸或包含SEQ ID No 15的核苷酸508至核苷酸525的核苷酸序列或其互补序列的所述标记核酸探针杂交,其中所述第三寡核苷酸和第四寡核苷酸重叠至少一个核苷酸,并且其中将所述第三寡核苷酸或所述第四寡核苷酸标记为所述标记核酸探针;

[0827] h) 用产生选择性探针切割从而导致双链体离解的酶仅切割探针:靶核酸序列双链体内的标记探针,从而使所述靶序列保持完整;

[0828] i) 通过重复步骤(f)至(h)再循环所述靶核酸序列;和

[0829] j) 检测切割的标记探针,从而确定所述靶核酸序列的存在。

[0830] 68.一种各自在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2的转基因大豆植物或其细胞、部分、组织、种子或后代,已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的包含所述事件EE-GM3的参照种子和已于保藏号NCIMB 41660下保藏在NCIMB的包含所述事件EE-GM2的参照种子,或已于保藏号PTA-11042下保藏在ATCC的在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2的参照种子。

[0831] 69. 实施方案68所述的转基因大豆植物、种子、细胞、组织、部分或后代,其基因组DNA,当使用针对EE-GM3的原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID 4和SEQ ID 5的核苷酸序列的引物进行分析时,产生约263bp的DNA片段,并且其基因组DNA,当使用针对EE-GM2的原种事件鉴定方案,利用两个分别包含SEQ ID 18和SEQ ID 19的核苷酸序列进行分析时,产生约151bp的DNA片段。

[0832] 70. 一种各自在其基因组中包含原种事件EE-GM3和原种事件EE-GM2的大豆植物、其植物部分或种子、细胞或组织,所述大豆植物可通过将在其基因组中包含原种事件EE-GM3的大豆植物与在其基因组中包含原种事件EE-GM2的大豆植物杂交来获得,所述包含原种事件EE-GM3的大豆植物可通过从已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得,所述包含原种事件EE-GM2的大豆植物可通过从于保藏号NCIMB 41660下保藏在NCIMB的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得,或所述大豆植物可通过从已于登录号PTA-11042下保藏在ATCC的种子生长而来的大豆植物的繁殖和/或与其繁育来获得。

[0833] 71. 一种包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆种子、已于保藏号NCIMB 41659下保藏在NCIMB的包含事件EE-GM3的参照种子、已于保藏号NCIMB 41660下保藏在NCIMB的包含事件EE-GM2的参照种子和已于保藏号PTA-11042下保藏在ATCC的包含事件EE-GM3和EE-GM2的参照种子。

[0834] 72. 一种可从实施方案71所述的种子产生的包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的转基因大豆植物、细胞或组织。

[0835] 73. 一种用于产生包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆植物或种子的方法,包括将根据实施方案68至72中任一项所述的植物与另一种大豆植物杂交,和种植获自所述杂交的种子。

[0836] 74. 一种包含原种事件EE-GM3和EE-GM2的大豆基因组DNA。

[0837] 75. 一对分离的核酸分子,所述第一核酸分子包含与SEQ ID No.2的核苷酸1441至核苷酸1452或SEQ ID No.3的核苷酸230至251或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列,并且所述第二核酸分子包含与SEQ ID No.14的核苷酸301至核苷酸322或SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0838] 76. 实施方案75所述的分离的核酸分子对,所述第一核酸分子包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至核苷酸1462或SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列,并且所述第二核酸分子包含与SEQ ID No.14的核苷酸301至核苷酸322或SEQ ID No.15的核苷酸487至518或所述序列的互补序列基本上相似的核苷酸序列。

[0839] 77. 一种大豆植物,其在其基因组中按顺序包含下列核苷酸序列:

[0840] a) SEQ ID No 2的核苷酸1至1451的核苷酸序列;

[0841] b) SEQ ID 1的核苷酸6760至核苷酸6958的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;

[0842] c) SEQ ID 1的核苷酸6874至核苷酸7298的核苷酸序列;

[0843] d) SEQ ID 1的核苷酸7至核苷酸7291的核苷酸序列;

[0844] e) SEQ ID 1的核苷酸12至核苷酸7265的核苷酸序列;

[0845] f) SEQ ID 3的核苷酸217至核苷酸240的核苷酸序列;和

[0846] g) SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的核苷酸序列:并且还按顺序包含下列

序列:

- [0847] h) SEQ ID No 14的核苷酸1至311的核苷酸序列;
- [0848] i) SEQ ID 11的核苷酸3458至核苷酸3848的核苷酸序列;
- [0849] j) SEQ ID 11的核苷酸413至核苷酸3457的核苷酸序列;
- [0850] k) SEQ ID 15的核苷酸508至核苷酸1880的核苷酸序列。
- [0851] 78.一种按顺序包含下列核苷酸序列的DNA分子:
- [0852] a) SEQ ID No 2的核苷酸1至1451的核苷酸序列;
- [0853] b) SEQ ID 1的核苷酸6760至核苷酸6958的核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列;
- [0854] c) SEQ ID 1的核苷酸6874至核苷酸7298的核苷酸序列;
- [0855] d) SEQ ID 1的核苷酸7至核苷酸7291的核苷酸序列;
- [0856] e) SEQ ID 1的核苷酸12至核苷酸7265的核苷酸序列;
- [0857] f) SEQ ID 3的核苷酸217至核苷酸240的核苷酸序列;
- [0858] g) SEQ ID No 3的核苷酸241至核苷酸1408的核苷酸序列;并且还按顺序包含下列序列:

- [0859] h) SEQ ID No 14的核苷酸1至311的核苷酸序列;
- [0860] i) SEQ ID 11的核苷酸3458至核苷酸3848的核苷酸序列;
- [0861] j) SEQ ID 11的核苷酸413至核苷酸3457的核苷酸序列;
- [0862] k) SEQ ID 15的核苷酸508至核苷酸1880的核苷酸序列。
- [0863] 79.一种包含EE-GM3和EE-GM1的大豆植物、细胞、组织或种子,其在其细胞的基因组中包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列,以及还有与SEQ ID No.12的核苷酸199至220具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和SEQ ID No.13的核苷酸558至579或所述序列的互补序列具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列。

[0864] 80.一种包含EE-GM3和EE-GM2的大豆植物、细胞、组织或种子,其在其细胞的基因组中包含与SEQ ID No.2的核苷酸1431至1472具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.3的核苷酸220至261或所述序列的互补序列具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列,以及还有与SEQ ID No.14的核苷酸301至322具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列和与SEQ ID No.15的核苷酸497至518或所述序列的互补序列具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性的核酸序列。

[0865] 81.一种大豆植物、植物细胞、组织或种子,在它们的基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含与SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列具有至少97%、98%或至少99%的序列同一性的核苷酸序列,或与SEQ ID No.20或其互补序列具有至少97%、98%或至少99%的序列同一性的核苷酸序列,以及在它们的基因组中包含核酸分子,所述核酸分子包含与EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列具有至少97%、98%或至少99%的序列同一性的核苷酸序列,已于保藏号NCIMB 41658下保藏在NCIMB的包含所述事件EE-GM1的参照种子,和已于保藏号NCIMB 41660下保藏在NCIMB的



包含所述事件EE-GM2的参照种子,例如其中所述EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列分别包含或为SEQ ID No 12或13中的外源DNA序列或SEQ ID No 14或15中的外源DNA序列,分别包含或为植物基因组中的SEQ ID No 12的序列与SEQ ID No 13的序列之间的外源DNA序列或植物基因组中的SEQ ID No 14的序列与SEQ ID No 15的序列之间的外源DNA序列。

[0866] 82. 一种大豆植物、植物细胞、组织或种子,在它们的基因组中包含核酸分子,所述核酸分子与SEQ ID No 1的核苷酸序列或其互补序列杂交,或与SEQ ID No.20的核苷酸位置1452至核苷酸位置16638的核苷酸序列或其互补序列杂交,或与SEQ ID No.20的核苷酸序列或其互补序列杂交,以及在它们的基因组中包含与EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列或其互补序列杂交的核酸分子,已于保藏号NCIMB 41658下保藏的包含EE-GM1的参照种子,和已于保藏号NCIMB 41660下保藏的包含EE-GM2的参照种子,例如其中所述EE-GM1或EE-GM2的核苷酸序列包含或为SEQ ID No 12或13中的外源DNA序列,或SEQ ID No 14或15中的外源DNA序列,或植物基因组中的SEQ ID No 12的序列与SEQ ID No 13的序列之间的外源DNA序列,或植物基因组中的SEQ ID No 14的序列与SEQ ID No 15的序列之间的外源DNA序列。

## 序列表

- [0001]
- <110> Bayer Biosciences N.V.  
M. S Technologies LLP  
MASON Justin Thomas  
LETTOW Leslie James  
EBY Mark Alan  
EBY William H.  
WELZ Gunter  
VERHAEGHE Steven  
DE BEUCKELEER Marc  
HABEX Veerle  
FERRULO Jean-Marc
- <120> 耐除草剂大豆植物及鉴定其的方法
- <130> 58764.000194
- <140> PCTUS2010057886  
<141> 2010-11-23
- <150> EP09014565.7  
<151> 2009-11-23
- <150> 61/263707  
<151> 2009-11-23
- <150> 61/367251  
<151> 2010-07-23
- <160> 22
- <170> PatentIn 3.3版
- <210> 1  
<211> 7296  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 载体pSF10的SalI片段
- <220>  
<221> 终止子  
<222> (188)..(479)  
<223> 3' nos- 包括来自根癌土壤杆菌的pTiT37的T-DNA的胭脂碱合酶基因的3' 非翻译区的序列-互补
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (480)..(1556)  
<223> hppdPf W336- 过用色氨酸替代氨基酸甘氨酸336修饰的荧光假单胞菌株A32的4-羟基苯丙酮酸二氧合酶的编码序列-互补
- <220>  
<221> 运输\_肽  
<222> (1557)..(1928)  
<223> TPotp Y- 最优化的转运肽衍生物的编码序列(位置55被改变成酪氨酸), 包含玉蜀黍(玉米)和葵花(向日葵)的RuBisCO小亚基基因的序列-互补
- <220>  
<221> 5' UTR  
<222> (1929)..(2069)  
<223> 5' tev: 序列包括烟草蚀纹病毒的前导序列-互补
- <220>  
<221> 启动子  
<222> (2070)..(3359)  
<223> Ph4a748 ABBC-序列包括拟南芥的组蛋白H4基因的启动子区域, 包含内部复制-互补
- <220>  
<221> 启动子  
<222> (3360)..(4374)

<223> Ph4a748- 序列包括拟南芥的组蛋白H4基因的启动子区域  
 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (4375).. (4855)  
 <223> 内含子1 h3At- 拟南芥的组蛋白H3. III变体的基因II的第一个内含子  
 <220>  
 <221> 运输\_肽  
 <222> (4856).. (5227)  
 <223> TPotp C- 最优化的转运肽的编码序列, 包含玉蜀黍(玉米)和葵花(向日葵)的RuBisCO小亚基基因的序列  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5228).. (6565)  
 <223> 2mepsps- 玉蜀黍(玉米)的双突变5-烯醇-丙酮基莽草酸-3-磷酸合酶基因的编码序列(Lebrun等, 1997)  
 <220>  
 <221> 终止子  
 <222> (6566).. (7252)  
 <223> 3' 组蛋白At- 包括拟南芥的组蛋白H4基因的3' 非翻译区的序列(Chaboute等, 1987)  
 <400> 1  
 gtcgactcta gcagatctgg ccggcccacc ggtgggcat atgggccgc ggccgcgaat 60  
 tcgagctcgg tacctacctg gcgaaaggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 120  
 cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg cgccgcgaat 180  
 tcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt tatcctagtt tgcgcgtat 240  
 attttgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcggga ctctaatacat aaaaacccat 300  
 ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacat gcttaacgta attcaacaga 360  
 aattatata taatcatcgc aagaccggca acaggattca atcttaagaa actttattgc 420  
 caaatgtttg aacgacggg gaaattcgtc gagtaccctt cgccgggct ttttgacgct 480  
 taatcgccgg tcaatacacc acgacgcacc tggtcacgtt cgatggactc gaacagcgcc 540  
 ttgaagtcc actcgccaaa cccatcgtcg cccttgcgct ggatgaattc gaagaacacc 600  
 gggcccatca gggtttccga gaagatctgc agcagcaggc gtttgcgcc ttccacggaa 660  
 gatccgtcca gcagataacc gcgtgcctgc agttgatcca ccggctcgcc gtggtcaggc 720  
 aggcggcctt cgagcatttc gtaataagtg tctggcggcg cggtcagtaa gcgcatgccg 780  
 attttcttca acgcgtccca ggtcttgacc aggtcgtcgg tgaggaacgc cacgtgctgg 840  
 atgccttcgc cgttgaactg catcaggaac tcttcgatct gccccgcgcc cttggacgac 900  
 tcttcgttca gcgggatcgc gatcatgccg tccggcgcac tcatggcctt ggaagtcagg 960  
 ccggtgtact cgccttgat atcgaagtaa cgcgcttcac ggaagttgaa caatttctcg 1020  
 tagaagttgg cccagtagac catgcggccg cagtagacgt tgtgggtcag gtggtcagatg 1080  
 actttgagac ctgcaccgac cggattgcgc tccacacctt cgaggtacac gaagtcgatg 1140  
 tcgtagatcg agctgccttc gccgaaacgg tcgatcaggt acaacggcgc gccgccgatg 1200  
 cccttgatcg ccggcagggt caattccatc ggcccgggtg caatatggat cggctgggcg 1260  
 ccgagttcca ggccgcggtt gtaggccttt tgcgagtcct tcacgcggaa cgccatgccg 1320  
 cacaccgacg ggccgtgttc ggccgcaaag taggaggcga tgctgttggg ctcgttgttg 1380  
 aggatcaggt tgatctcgcc ctggcggtac aggtgcacgt tcttgaacg gtgggtcgcg 1440  
 actttgttga agcccatgat ctcaagatc ggctccaggg taccggcggt cggcgacgcg 1500  
 aattcgatga attcaaagc catcaggecc attgggtttt cgtatagatc tgccatgcac 1560  
 cggatccttc cgccgttgct gacgttgccg aggttcttg aggagcggcg ggcgacgggg 1620

[0002]

[0003]

```

aggctggcgg tggacttgag cccctggaac ggagcgacgg cgggtggccga cgaggccatc 1680
atcacggtgg gcgcataga cagcggcggc aggtacgaca gcgtctcgaa ctctctgttg 1740
ccgtaggccg gccacacctg catatattga actcttcac cggtctggg aagggtggag 1800
aagtcgttag cttcttgggt ggtggggaag gcggcggttg acttaaggcc ggtgaacgga 1860
gccaccatgt tggcctgagc agggcggtc cggtaacgg tcgcgactga ggaggagatc 1920
gaagccatgg ctatcgttcg taaatggtga aaattttcag aaaattgctt ttgctttaa 1980
agaaatgatt taaattgctg caatagaagt agaattgctt attgcttgag attcgtttgt 2040
tttgtatatg ttgtgtttcg aattctagag tcgagagaaa ttgatgtctg tagaagaaga 2100
agaacggtta agagtagatt tgggtgagaa agatgtgaaa ttgtttttat aggcaaagac 2160
ggagagicta ttttttgagc aatcagatcg catattaaat ctaacggctg agatatcgat 2220
ccgtgtgtac aataaaatga tgtataaacc gtcgatctgt tttaatcgac ggttcattat 2280
agtgatccgc gtgatggcag tgatagccac taagaatcgt cttttgtttt acatgtggcg 2340
ccacaaatta gggtaaatga gcggcaatat ttgggaactc ggaaaaataa attgcgccat 2400
cacattattt gaaaattttc acatgctttt attttaaaaa cccacgaatt acaagtta 2460
accgaaaaag atttataata tagtgattta tactaatttt gtagtagctt aatgtatat 2520
gatactggaa aaacaatgac aatcatacga tccgtgtgta caataaaatg atgtataaac 2580
cgtcgatctg ttttaatcga cggttcatat tagtgatccg cgtgatggca gtgatagcca 2640
ctaagaatcg tcttttgttt tacatgtggc gccacaaatt agggtaatga agcggcaata 2700
ttttggaact cggaataa aattgcgcca tcacattatt tgaaaatttt cacatgcttt 2760
tattttaaaa acccacgaat tacaagttac aaccgaaaaa gatttataat atagtatt 2820
atactaattt tgtagtagct taatgtatat tgatactgga aaaacaatga caatcatatg 2880
ttagtattat caagtatcg tattgatatt gatattggaa catacaatgg gtattgcctt 2940
cttcgacca taaatatcac caaatttaca aagtttgtgt ataccaagt atcaattgta 3000
aatgggatgt caacatttta atttccctt gagaaactat agaccacaag aacacacttc 3060
aatagataaa gtaactattt acataagagg ttttaaaatc acattaacaa aaataattac 3120
caaccggcac tcacaaatc aaacagagca cagcatgt caaagccaca agtaaatcg 3180
ttgagtgggt gtttcattac aattgtgca cttgcagcac aaactatctt gctctgggaa 3240
tcactcage atcaaatc atgctcactt cagggaact tagtgtatcc atgcctcgac 3300
tcattttct cctcgacctg caggcatgca agctctagag cggccgccac cgcggtggag 3360
gtactcgagt cgcgacgtac gttcgaacaa ttggttttaa aagcttgc atgcctgcaggt 3420
cgaggagaaa tatgagtcga ggcattgata cactaagttc ccctgaagt agcatgatct 3480
ttgatgtga gatgattccc agagcaagat agtttgtgt gcaagtga caattgta 3540
gaaaccacca ctcaacgaat ttacttgttg ctttgacatg tcgtgtgctc tgtttgtatt 3600
tgtgagtgcc ggttggtaat tattttgtt aatgtgattt taaaacctct tatgtaata 3660
gttactttat ctattgaagt gtgttctgt ggtctatagt ttctcaaagg gaaattaaaa 3720
tgttgacatc cattttacaa ttgataactt ggtatacaca aactttgtaa atttggtgat 3780
atttatggtc gaaagaagc aataccatt gtatgttcca atatcaatat caatacgata 3840
acttgataat actaacatat gattgtcatt gttttccag tatcaatata cattaagcta 3900

```

[0004]

```

ctacaaaatt agtataaatc actatattat aaatcttttt cggttgtaac ttgtaattcg 3960
tggtttttta aaataaaagc atgtgaaaat tttcaataaa tgtgatggcg caattttatt 4020
ttccgagttc caaaatattg ccgcttcatt accctaattt gtggcgccac atgtaaaaca 4080
aaagacgatt cttagtggct atcactgcc aacgcggat cactaatatg aaccgtcgat 4140
taaaacagat cgacggttta tacatcattt tattgtacac acggatcgat atctcagccg 4200
ttagatttaa tatcgatctt gattgctcaa aaaatagact ctccgtcttt gcctataaaa 4260
acaatttcac atcttttcta cccaaatcta ctcttaaccg ttctttctct tctacagaca 4320
tcaatttctc tcgactctag aggatccaag cttatcgatt tcgaaccctt caggcgaaga 4380
acaggtatga tttgtttgta attagatcag gggtttaggt ctttccatta ctttttaatg 4440
ttttttctgt tactgtctcc gcgatctgat ttacgacaa tagagtttcg ggttttgtcc 4500
cattccagtt tgaaaaataa ggtccgtctt ttaagtttgc tggatcgata aacctgtgaa 4560
gattgagttt agtcgattta ttggatgac cattcttcat cgtttttttc ttgcttcgaa 4620
gttctgtata accagatttg tctgtgtcgc attgtcatta cctagccgtg tatcgagaac 4680
tagggttttc gagtcaattt tgcccccttt ggttatatct ggttcgataa cgattcatct 4740
ggattagggg ttttaagtgt gacgtttagt attccaattt cttaaaaatt tagttatgga 4800
taatgaaaaa cccaattga ctgttcaatt tcttgtaaaa tgcgcagatc cccatggctt 4860
cgatctcttc ctacgtcgcg accgttagcc ggaccgcccc tgctcaggcc aacatgggtg 4920
ctccgttcac cggccttaag tccaacgcg ccttccccac caccaagaag gctaacgact 4980
tctccacctt tcccagcaac ggtggaagag ttcaatgtat gcaggtgtgg ccggcctacg 5040
gacaacaaga gttcgagacg ctgtcgtacc tgccgccgct gtctatggcg cccaccgtga 5100
tgatggcctc gtcggccacc gccgtcgtc cgttccaggg gctcaagtcc accgccagcc 5160
tccccgtcgc ccgccgtcc tccagaagcc tcggcaacgt cagcaacggc ggaaggatcc 5220
ggtgcatggc cggcgccgag gagatcgtgc tgcagcccat caaggagatc tccggcaccg 5280
tcaagctgcc ggggtccaag tcgctttcca accgatacct cctactcgcc gccctgtccg 5340
aggggacaac agtggttgat aacctgtga acagtgagga tgctcactac atgctcgggg 5400
ccttgaggac tcttggtctc tctgtcgaag cggacaaagc tgccaaaaga gctgtagtgt 5460
ttggctgtgg tggaagtgc ccagttgagg atgctaaaga ggaagtgcag ctcttcttgg 5520
ggaatgctgg aatcgcaatg cggctcttga cagcagctgt tactgctgct ggttgaaatg 5580
caacttacgt gcttgatgga gtaccaagaa tgaggagag acccattggc gacttggttg 5640
tcggattgaa gcagcttggg gcagatgttg attgtttcct tggcactgac tgcccacctg 5700
ttcgtgtcaa tggaatcgga gggctacctg gtggcaaggt caagctgtct ggctccatca 5760
gcagtcagta cttgagtgcc ttgctgatgg ctgctccttt ggctcttggg gatgtggaga 5820
ttgaaatcat tgataaatta atctccattc cgtacgtcga aatgacattg agattgatgg 5880
agcgttttgg tgtgaaagca gagcattctg atagctggga cagattctac attaaggag 5940
gtcaaaaata caagtcacct aaaaatgcct atgttgaagg tgatgcctca agcgcaagct 6000
atttcttggc tgggtgtgca attactggag ggactgtgac tgtggaaggt tgtggcacca 6060
ccagtttgca ggggtgagtg aagtttgctg aggtactgga gatgatggga gcgaagggtta 6120
catggaccga gactagcgt aactgttactg gccaccgcg ggagccattt gggaggaaac 6180

```

	acctcaaggc gattgatgtc aacatgaaca agatgcctga tgcgccatg actcttgctg	6240
	tggttgccct ctttgccgat ggcccacag ccatcagaga cgtggcttcc tggagagtaa	6300
	aggagaccga gaggatggtt gcgatccgga cggagctaac caagctggga gcatctgttg	6360
	aggaagggcc ggactactgc atcatcacgc cgccggagaa gctgaacgtg acggcgatcg	6420
	acacgtacga cgaccacagg atggcgatgg ctttctccct tgccgcctgt gccgaggtcc	6480
	ccgtcaccat ccgggaccct ggggtgcacc ggaagacctt ccccgactac ttcgatgtgc	6540
	tgagcacttt cgtcaagaat taagctctag aactagtga tccccgate cgcgtttgtg	6600
	ttttctgggt ttctcactta agcgtctcg ttttactttt gtattgggtt tggcgtttag	6660
	tagtttgagg tagcgttctt gttatgtgta attacgttt ttcttcttgc ttcagcagtt	6720
	tcggttgaaa tataaatcga atcaagtttc actttatcag cgttgtttta aattttggca	6780
	ttaaattggt gaaaattgct tcaattttgt atctaaatag aagagacaac atgaaattcg	6840
	acttttgacc tcaaatcttc gaacatttat ttcttgattt cacgatggat gaggataacg	6900
	aaagggcggt tcctatgtcc gggaaagttc ccgtagaaga caatgagcaa agctactgaa	6960
	acgcggacac gacgtcgcat tggtagcgat atgagttaaa ccgactcaat tcctttatta	7020
	agacataaac cgattttggt taaagtgtaa cagttagctg atataaaacc gaaacaaacc	7080
	ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga attttggtta ttgaatgaaa	7140
	atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta gacgagaaca aagattctat	7200
	attctggttc caatttatca tcgctttaac gtccctcaga ttgatcggg ctgcaggaat	7260
[0005]	taaacgcccc ggcacgtggg atcctctaga gtcgac	7296

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1843

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的5'侧翼区域

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(1451)

&lt;223&gt; 5'侧翼植物DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1452)..(1843)

&lt;223&gt; 插入片段或外源DNA

&lt;400&gt; 2

gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat

60

atatatatatc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatttt ctaatacatt

120

tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca

180

taacatccaa tgattttctc gtaattttta gactggacta aagaatatag tagtaacact

240

tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag

300

gaaagctgaa catcaattgg tactttgga tggttccac ggtttattat tgtctacatc

360

tggtcatcca agcagaggtt atatcttcta taactcgaca aatcttcgtt gtgcctatat

420

agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgta tacaatctat gattcacagt

480

[0006]

```

tatgatacgt gtatgaataaatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
tctaaaaatat atagaatata atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
atataattgc aatttttgcaa aaccaaatata agaataatac tcaaatatta ctagaaacaa 660
aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaatit atgaaaaata 780
atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcgttt caatgtctga tagtgatagg 840
aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
tttttatttt ttatccttaa aatactttaa ataataatttt ttctatttta aagcattttt 1020
tataatttaa agcgtatttt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
aaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaataactaa attacaggaa 1140
agaaaaatat attcaaactt ttatgtttaa aggtttttga atatttctct gattcgtttg 1200
aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaca 1320
ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
attatattta tgtagctttg ctcatgtctt tctacgggaa ctttcccga cataggaacc 1500
gccctttcgt tatcctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagatata aaattgaagc aattttcacc 1620
aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatgatg aggataacga 1680
aaggcgcggt cctatgtccg ggaaagtcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
cgcgacacg acgtcgcat ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
gacataaacc gattttgggt aaagtgtaac agtgagctga tat 1843

```

<210> 3  
 <211> 1408  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> EE-GM3的包含耐除草剂基因的外源DNA的3'侧翼区域

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(240)  
 <223> 插入片段或外源DNA

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (241)..(1408)  
 <223> 植物DNA

```

<400> 3
taacagtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga gcaacttgat 60
gacaaacttc agaattttgg ttattgaatg aaaatcatag tctaactgta aaaaatgtac 120
agaagaaaag ctagagcaga acaagattc tatattctgg ttccaattta tcatcgcttt 180
aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattaatgtg gttcatccgt ctttttgtaa 240
atcggtcat caatacgtgc ctcaaagatt gccaaataga ttaatgtggt tcatctccct 300

```

atatgttttg	cttgttggat	tttctatca	catgtttatt	gctccaaact	aattataata	360
aaatgacttt	caaatgattg	gtgttgacat	tcttttcaaa	ttgttcgctg	aagaaaagat	420
aatctcgagg	ccttgatttg	ttaatgcttt	cattaataaa	taaataaaat	aactctttcc	480
aaatttcaat	tcatgctttt	atattgtgtg	gttcatcctc	atcttatgtc	actattatca	540
tttcatgttt	gagactttac	ttggccatat	ttgagaagac	cttcttcatt	ataggcaatt	600
ttatctccac	aataatataa	gagaatatct	tgaattaata	attattgagg	atatattata	660
gggttctatg	tggaactaaa	gacatgggta	ccccattaag	agagagtata	gaggaattac	720
ttttatttgc	cacgaggcga	cgcgacttgt	atttattttg	gaattgtact	tttgcgtgag	780
cagtgtggct	ctatgttggg	gcctccactt	gttgggtgtt	tatatatgtg	aaaggaggat	840
gagggtgatg	gttcattttt	ttgcattatt	tttgttattc	gcgcgaatga	tatatgccct	900
gtttttgaag	attgataggg	aagtcctat	ataggaattg	aagtgtcaaa	agggtgtgag	960
tatgtgctat	gataatcacc	caattaatgt	acatctgggt	tggtgtttga	attttaggt	1020
cattaattaa	tattcctctt	ggtgaagttt	ggagtctttt	tgcaattaca	attctgtttt	1080
gtaagtgatt	atgatggact	tttagatgtt	tctcaaacag	taggtgtaaa	gaaaaatggg	1140
ccctggtatg	aaaatttgtt	ttcactcttt	ctcattcata	tctttaaaaa	aagaatgata	1200
attttgtaat	aaaaataaaa	aaatattaaa	tattttctca	aatcaaaca	ctttattttt	1260
ttatgccaac	aataattttg	ttaaagatgg	agatttcaat	tattatataa	gagttcatta	1320
tagttgaaaa	ttgaatgaat	gtatatgttt	acgttttttg	tctcaagtga	aactaagatc	1380
[0007]	aaatattcat	atctattgag	ctggtctt			1408

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物S0Y028

<400> 4  
 atcgctttaa cgteccctcag 20

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物S0Y029

<400> 5  
 caaggcctcg agattatc 18

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物SMP187

<400> 6  
 atatcaaccg gtagctcgac 20



	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物STV019	
	<400> 7	
	ggcattaaat tggtagaaat tgc	23
	<210> 8	
	<211> 263	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 使用引物SOY028-SOY029的PCR扩增子的核苷酸序列	
	<400> 8	
	atcgctttaa cgteccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt tcatccgtct	60
	ttttgttaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt aatgtggttc	120
	atctccctat atgttttgc tgttgattt tgctatcaca tgttttattgc tccaaactaa	180
	ttataataaa atgactttca aatgattggt gttgacattc ttttcaaatt gttcgtgaa	240
	gaaaagataa tctcgaggcc ttg	263
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 扩增对照片段的引物1 (SOY01)	
	<400> 9	
	gtcagccaca cagtcctat	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 扩增对照片段的引物2 (SOY02)	
	<400> 10	
	gttacgtac aggtctttcc	20
	<210> 11	
	<211> 4076	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> pB2/P35SAcK的核苷酸序列	
	<220>	
	<221> 启动子	
	<222> (461)..(1003)	
	<223> CamV35S启动子序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1004)..(1011)	
	<223> 膦基乙酰基转移酶的合成编码序列	
	<220>	

<221>	misc feature	
<222>	(1582)..(1784)	
<223>	CaMV 35S终止子	
<400>	11	
	tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
	ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatacaga gcagattgta ctgagagtgc	180
	accatatgca aacaacata cacagcgact tatgctcaaa ttacaacggt atatatcctg	240
	ccacatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc	300
	cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgcat cgggtcgggc ctcttcgcta	360
	ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgaat taagttgggt aacgccaggg	420
	ttttccagtc cagcagcttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc	480
	aaatagagga cctaacagaa ctgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct	540
	tacgactcaa tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac acgcttgtct	600
	actccaaaaa tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac	660
	aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tcattgccc agctatctgt cactttattg	720
	tgaagatagt ggaagaaagg ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg	780
	ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga	840
	gcacgttga aaaagaagac gtccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata	900
	cttccactga cgtgaaggat gacgcacaat cccactatcc ttgcgaagac ctttctctta	960
[0009]	tataaggaag ttcatattcat ttggagagga cagggtaccc ggggatccac catgtctccg	1020
	gagaggagac cagttgagat taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat	1080
	atcgttaacc attacattga gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca	1140
	caagagtgga ttgatgatct agagagggtg caagatagat acccttggtt ggttgctgag	1200
	gttgagggtg ttgtggctgg tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac	1260
	gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg tcacatagga atcaaaggtt gggcctagga	1320
	tccacattgt acacacattt gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt	1380
	gctgttatag gccttcaaaa cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca	1440
	gccccgggta cattgcgcgc agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt	1500
	tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc	1560
	tgagtcgacc tgcaggcatg cccgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa atctatctct	1620
	ctctataata atgtgtgagt agttcccaga taagggaatt agggttctta tagggtttcg	1680
	ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta gtatgtatgt gtatttgtaa aatacttcta	1740
	tcaataaaa ttctaattcc taaaacaaa atccaggcgc agctcgaatt cgagctcggg	1800
	acccggggat cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata	1860
	gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag	1920
	cataaagtgt aaagccitggg gtgcctaata agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg	1980
	ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca	2040
	acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gtttctctgc tcaactgactc	2100
	gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg	2160

[0010]

```

gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 2220
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 2280
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagica gaggtggcga aacccgacag gactataaag 2340
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct 2400
taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 2460
ctgtaggtag ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 2520
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggttaactat cgtcttgagt ccaacccggt 2580
aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 2640
tgtaggcgtt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac 2700
agtatttggc atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 2760
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt ttgttttgca agcagcagat 2820
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgata ttttctacgg ggtctgacgc 2880
tcagtggaac gaaaactcac gttaaggga ttgtgtcatg agattatcaa aaaggatctt 2940
cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta 3000
aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtggagca cctatctcag cgatctgtct 3060
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctcgttag ataactacga tacgggaggg 3120
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggtccaga 3180
tttatcgaca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 3240
atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt 3300
taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgcac gctcgtcgtt 3360
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat 3420
gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tcctccgata gttgtcagaa gtaagttggc 3480
cgcagtgtta tcaatcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 3540
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat 3600
ggcgcgaccg agttgtcttt gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag 3660
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt 3720
accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 3780
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa 3840
gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcttttttc aatattattg 3900
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgaaatgta tttagaaaaa 3960
taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt ccacctgacg tctaagaaac 4020
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtc 4076

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 包含在EE-GM1的外源DNA侧翼的5'区域的核苷酸序列

&lt;220&gt;

[0011]	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(209)	
	<223>	植物DNA	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(210)..(720)	
	<223>	外源DNA	
	<400>	12	
		gagaagaaaa aggaaggcat taagagacc tcttggcaca accctagaca ctctaagatc	60
		ctttttcaaa cctgctccca ccatttcgag tcaagagata gataaataga cacatctcat	120
		tgaccgcatc gggggcggtc gtagtgactg aggggggtcaa agaccaagaa gtgagttatt	180
		tatcagccaa gcattctatt ctctttatgt cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc	240
		tgcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt	300
		cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga	360
		cctaacagaa ctgcgctaa agactggcga acagttcata cagagtctct tacgactcaa	420
		tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac acgcttgtct actccaaaaa	480
		tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac aaagggtaat	540
		atccggaaac ctctcggat tcattgccc agctatctgt cactttattg tgaagatagt	600
		ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcc a tcattgcgat aaaggaaagg ccacgttga	660
		agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcacgttga	720
	<210>	13	
	<211>	1000	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	包含在EE-GM1的外源DNA侧翼的3' 区域的核苷酸序列	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(568)	
	<223>	外源DNA	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(569)..(1000)	
	<223>	植物DNA	
	<400>	13	
		ttcgggttag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga	60
		ccgtcgcgcc ttatccggt aactatctct tgagtccaac ccgtaagac acgacttate	120
		gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac	180
		agagtctctg aagtcagtta ctttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaca	240
		cgtctgctg aagccagtta ctttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaca	300
		aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa	360
		aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggtctt gacgtcagt ggaacgaaaa	420
		ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt	480
		aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta agtatatat gaggtaaaactt ggtctgacag	540
		ttaccaatgc ttaatcagtg aggcaccttt aatctagatg atctgtctca actttaccaa	600
		aagttttgag cacatgtttg gattcacctt aaataatcta aaatcacagc ttgtttgatc	660

```

ccaaaggagt taattctaag taaaattgat tgagttaaaa caattgtgtt agatagagaa 720
attttctttg aataaaaaaca tctagacaca aatcatttca cticaaata attttaaaca 780
aaataaatTT tgcaattcat tcatccaaac aaacatttga attaactata atcaattcaa 840
attgttacag tgtgttgcat tcatatcatt cctaataagt ctacattaaa gattaagagt 900
gagaatgaga ggaagagaga acggtttcag ggTTaaccct ttgtttggaa gaaccatcaa 960
acagtggcaa cggatcatcc ttgctgcaaa acatagcttt 1000

```

<210> 14  
 <211> 810  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 包含在EE-GM2的外源DNA侧翼的5'区域的核苷酸序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(311)  
 <223> 植物DNA

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (312)..(810)  
 <223> 外源DNA

[0012]

```

<400> 14
gtcatcgctg tcgcgctgga gttcttgttg tgccgctggt cgcactggag tttgggtgtt 60
gttgttcatg ettgcgctgc taatccccct ttgtatgca aaatcgggtt tgggtcgggt 120
cgggtcagcc caacacgacc taatttgtgt tacgaaaatt tcaacaaaaa aaaaaagtta 180
tcttcgcca ttatcgccat tccgccacga tcattaagc tatggcggcc gcaatggcgc 240
cgccatatga aaccgcaat gccatcgcta tttggtggca tttttccaaa aaccgcaat 300
gtcataccgt catcgttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 360
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg 420
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 480
cgtaaatagc ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa 540
aacgtttctc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt 600
aaccctactc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccage gtttctgggt 660
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aacgccaggg ttttcccagt 720
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga 780
cctaacagaa ctgcccgtaa agactggcga 810

```

<210> 15  
 <211> 1880  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 包含在EE-GM2的外源DNA侧翼的3'区域的核苷酸序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(507)  
 <223> 外源DNA

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(508)..(1880)	
<223>	植物DNA	
<400>	15	
	cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct	60
	gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	120
	tccatagttg cctgactccc cgctcgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct	180
	ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgtcac cggtccaga tttatcagca	240
	ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc	300
	atccagttct ttaattgttg ccggaagct agagtaagta gtgcgccagt taatagtttg	360
	cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgcac gctcgtcgtt tggtaggct	420
	tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccatt gttgtgcaaa	480
	aaagcggtta gtccttccgg tcctccgatg gcaccgcat aaccacaatt taacaacttt	540
	ataaatgact tagtatatta gcaatttacc ttgtcacatg cacatatatt ataactataa	600
	taggagtttg agtttaaatg atgtaatgaa ttttggattg catgttgttt tgtactatat	660
	tggtagcttt ttccaatgaa gtgttaaat tgtatttttc atattcaggg tcacgtttga	720
	ccttctctag tcaactgccct aattaagccc ttctcttgc actcttgatg cttacttaac	780
	ctgggcatca ggcatatgta atgttatcaa tcaactatc acgtttcatg catttattaa	840
	tcttcattga tgccttgc tcgctcttgc ccctttttcc aatttatgct tcaaatcttt	900
[0013]	gacatgttcc atgctcttat tccttttctc tgaactgtt cattttcgtt atgaaccatg	960
	aagataaact actattgtta aagtctcggg tcaaatttaa cttttctgct tttcccata	1020
	taattgaata agacttggtc gtggttgttc tcattgcata tacctttatt atatgcatag	1080
	aagtgatttt ttgcctaacc ttgtacattt ttttatggca gtgatganga ttagagagg	1140
	cttatcgagc ttgtgaaggg aatttcttgc aagattaatc taatctcatt caatccgcac	1200
	agtggatcat tcttcaaacc aaccaaatat gaaaggatga ttgaattccg aaatacattg	1260
	gctggggcag gattgatagt atttttaaga ctttagtagag gtgatgatca attggcttcc	1320
	tgtggtcaat tgggtaagcc tggcaccatt caagctccat ttcttcgtgt accagagcaa	1380
	ttccaaatgg caattggaag ttcaacttga ttctttgttg aggttctgtg gcaaatgat	1440
	cttacagtta ttaacgaaga attatatagg acacttgttg tgggggtagc tagggatgac	1500
	ttcatactga caatgcaaga ccaagagcta aattaggggg atgtctgtct gttttcatat	1560
	tgtacttttc cattttacag ttaattgata tatttttttt tattaatgtg acggatccag	1620
	attacttact ggctaagaaa taagaaataa aaatgattta aatatatttt tagtcgaagt	1680
	ctgtattttt tagtttccca aattaaaatt tgcatttttt aatctctcat ttataaaatg	1740
	cctttttaag ttcttcttag ctgatttttg gcaacttga tgcacaatgt gcaactatcg	1800
	taacaatatt ttcttgaaa tttaaagaga ctaaaatata tgttttacca taacactcat	1860
	gtagtaaaa ccattatttg	1880
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	引物SOY06	
	<400>	16	
		ggcgttcgta gtgactgagg	20
	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物SOY 07	
	<400>	17	
		gttttacaac gtcgtgactg g	21
	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物SOY 09	
	<400>	18	
		tgtggttatg gcggtgccat c	21
	<210>	19	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0014]	<220>		
	<223>	SOY 010	
	<400>	19	
		tgctacaggc atcgtggtgt c	21
	<210>	20	
	<211>	17806	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	外源DNA的核苷酸序列和EE-GM3的侧翼植物序列	
	<400>	20	
		gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat	60
		atatatatattc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgatattt ctaatacatt	120
		tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaatcat aaaattaagt aagtttcaca	180
		taacatccaa tgattttctc gtaattttaa gactggacta aagaatatag tagtaacact	240
		tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag	300
		gaaagctgaa catcaattgg tacacttgga tggttccac ggtttattat tgtctacatc	360
		tggtcaccca agcagagggt atatcttcta taactcgaca aatcttcgtt gtgcctatat	420
		agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgta tacaatctat gattcacagt	480
		tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat	540
		tctaaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc	600
		atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaatatta ctagaaacaa	660
		aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat	720

[0015]

```

atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata 780
atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcgttt caatgtctga tagtgatagg 840
aaactctact gtatitttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
tttttatttt ttatccttaa aatactttta ataataattt ttctatttta aagcattttt 1020
tataatttaa agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
aaaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa 1140
agaaaaatat attcaaactt ttatgtttaa aggtttttga atatttctct gatttcgtttg 1200
aaatatgtga agaaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaaaca 1320
ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcatcca aatgataata gatataataa 1380
ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
attatattta tgtagctttg ctcatgtctt tctacgggaa ctttcccga cataggaacc 1500
gccctttcgt tatcctcacc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc 1620
aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
aaggcggtt cctatgtccg ggaaagtcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
cgcgacacg acgtcgcat ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
gacataaacc gattttggtt aaagtgtaac agtgagctga tataaaaccg aaacaaaccg 1860
gtacaagttt gattgagcaa ctgatgaca aacttcagaa ttttggttat tgaatgaaaa 1920
tcatagtcta atcgtaaaaa atgtacagaa gaaaagctag agcagaacaa agattctata 1980
ttctggttcc aatttatcat cgctttaacg tccctcagat ttgatcgggc tgcaggaatt 2040
aaacgcccg gcacgtggga tcctctagag tcgactctag cagatctggc cgggccaccg 2100
gtgggccata tggggcccg gcccgcaatt cgagctcggc acctacctgg cgaaaggggg 2160
atgtgtgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa 2220
aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag taacatagat gacaccgcgc 2280
gcgataatt atcctagttt gcgcgtata ttttgtttc tatcgctat taaatgtata 2340
attgcgggac tctaatacata aaaacccatc tcataaataa cgtcatgcat tacatgttaa 2400
ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat aatcatcgca agaccggcaa 2460
caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga acgatcgggg aaattcgtcg 2520
agtcaccctc ggccgggctt ttgacgctt aatcggggt caataacca cgacgcacct 2580
ggtcacgttc gatggactcg aacagcgctt tgaagtcca ctgcctaaac ccatcgtcgc 2640
ccttcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag ggtttccgag aagatctgca 2700
gcagcaggcg tttgtcgct tccacggaag atccgtccag caggataccg cgtgcctgca 2760
gttgatccac cggctcgccg tggtcaggca ggccgccttc gagcatttcg taataagtgt 2820
ctggcggcgc ggtcatgaag cgcatgccga ttttcttcaa cgctctccag gtcttgacca 2880
ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc gttgaactgc atcaggaact 2940
cttcgatctg ccccgcccc ttggacgact cttcgttcag cgggatgcgg atcatgccgt 3000

```



[0016]

```

ccggcgccact catggccttg gaagtcaggc cgggtgtactc gcccttgata tcgaagtaac 3060
gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc ccagtagacc atgcggccgc 3120
gatagacgtt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc tgcaccgacc ggattgcgct 3180
ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga gctgccttcg ccgaaacggt 3240
cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc cggcaggttc aattccatcg 3300
gcccgggtgc aatatggatc ggctgggcgc cgagttccag ggcgcggttg taggcctttt 3360
gcgagtcctt caccggaac gccatgccgc acaccgacgg gccgtgttcg gccgcaaagt 3420
aggaggcgat gctgttgggc tcgttgttga ggatcagggt gatctcgccc tggcggtaca 3480
ggtgcacgtt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa gccatgac tcgaagatcg 3540
gtccagggt acccgcgctc ggcgacgcga attcgatgaa ttcaaagccc atcaggccca 3600
ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc gccgttgctg acgttgccga 3660
ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg ggacttgagc ccctggaacg 3720
gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg cgccatagac agcgcgcgca 3780
ggtacgacag cgtctcgaac ttcttgttgc cgtaggccgg ccacacctgc atatatgaa 3840
ctcttcacc gttgctggga aggttgga agtcgttagc ctcttggtg gtggggaagg 3900
cgcggttga ctttaaggcgg gtgaacggag ccacatgtt ggctgagca gggcggtcc 3960
ggctaacggt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc tatcgttcgt aatggtgaa 4020
aattttcaga aaattgcttt tgctttaaaa gaaatgattt aaattgctgc aatagaagta 4080
gaatgcttga ttgcttgaga ttctttgtt ttgtatatgt tgtgttgaga attctagagt 4140
cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa gtagtagattt gggtagaaaa 4200
gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat tttttgagca atcagatcgc 4260
atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca ataaaatgat gtataaacgg 4320
tcgatctgtt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg tgatggcagt gatagccact 4380
aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaattag ggtaatgaag cggcaatatt 4440
ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg aaaattttca catgcttta 4500
ttttaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga ttataatat agtgatttat 4560
actaattttg tagtagctta atgtatatgt atactggaaa aacaatgaca atcataatcg 4620
atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct gttttaatcg acggttcata 4680
ttagtatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc gtcttttgtt ttacatgtgg 4740
cgccacaaat taggtaatg aagcggcaat attttgaac tcggaaaata aaattgcgcc 4800
atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa aaccacgaa ttacaagtta 4860
caaccgaaaa agattttataa tatagtgatt tatactaatt ttgtagtagc ttaatgtata 4920
ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagttatc gtattgatat 4980
tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca ccaaatttac 5040
aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg tcaacatttt aatttccctt 5100
tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa agtaactatt tacataagag 5160
gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca ctacaaaata caaacagagc 5220
acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtggg ggtttcatta caattgtgtc 5280

```

[0017]

```

acttcagca caaactatct tgctctggga atcatctcag catcaaagat catgctcact 5340
tcaggggaac ttagtgtatc catgcctcga ctcatatttc tcctcgacct gcaggcatgc 5400
aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag tcgcgacgta cgttcgaaca 5460
attggtttta aaagcttgca tgctgcagg tcgaggagaa atatgagtcg aggcatggat 5520
acactaagtt cccctgaagt gagcatgac ttigtatctg agatgattcc cagagcaaga 5580
tagtttgtgc tgcaagtgc acaattgtaa tgaaaccacc actcaacgaa ttacttgtg 5640
gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtc cggttggtta tttttttgt 5700
taatgtgatt ttaaacctc ttatgtaaat agttacttta tctattgaag tgtgttcttg 5760
tggtctatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat cccatttaca attgataact 5820
tggtatacac aaactttgta aatttggtga tatttatggt cgaaagaagg caatacccat 5880
tgtatgttcc aatatcaata tcaatacgat aacttgataa tactaacata tgattgtcat 5940
tgtttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat tagtataaat cactatatta 6000
taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt aaaataaaaag catgtgaaaa 6060
ttttcaaata atgtgatgac gcaattttat ttcccgagtt ccaaaatatt gccgcttcat 6120
taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat tcttagtggc tatcactgcc 6180
atcacgcgga tactaatat gaaccgtcga ttaaacaga tcgacggttt atacatcatt 6240
ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta atatcgatc tgattgtcga 6300
aaaaatagac tctccgtctt tgctataaaa aacaatttca catctttctc acccaaattc 6360
actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct ctgactcta gaggatccaa 6420
gcttatcgat ttccaacccc tcaggcgaag aacaggtagt atttgtttgt aattagatca 6480
gggttttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg ttactgtctc cgcgatctga 6540
ttttacgaca atagagtctc gggttttgtc ccattccagt ttgaaaataa aggtccgtct 6600
tttaagtttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc tagtcgattt attggatgat 6660
ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat aaccagattt gctgtgtgtc 6720
gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt cgagtcaatt ttgcccttt 6780
tggttatatc tggttcgata acgattcatc tggattaggg ttttaagtgg tgacgtttag 6840
tattccaatt tcttcaaaa ttagttatgg ataataaaaa tcccaattg actgttcaat 6900
ttctgttaa atgcgcagat ccccatggct tcgatctcct cctcagtcgc gaccgttagc 6960
cggaccgccc ctgctcagc caacatggtg gctccgttca ccggccttaa gtccaacgcc 7020
gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccaccc ttcccagcaa cggtggaaga 7080
gttcaatgta tgcagggtgt gccggcctac ggcaacaaga agttcgagac gctgtcgtac 7140
ctgccgcgcg tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct cgteggccac cgcgctcgt 7200
ccgttcagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg cccgccgctc ctccagaagc 7260
ctcggaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtcatgg ccggcgccga ggagatcgtg 7320
ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc cgggttccaa gtcgctttcc 7380
aaccggatcc tcctactcgc cgcctgticc gaggggacaa cagtggttga taacctgctg 7440
aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga ctcttggtct ctctgtcgaa 7500
gcggacaaaag ctgcaaaaag agctgtagtt gttggctgtg gtgaaagtt cccagttgag 7560

```

[0018]

```

gatgctaaag aggaagtgca gctcttcttg gggaatgctg gaatcgcaat gcggtccttg 7620
acagcagctg ttactgctgc tggtggaat gcaacttacg tgcttgatgg agtaccaaga 7680
atgagggaga gacccattgg cgacttggtt gtcggattga agcagcttgg tgcagatgtt 7740
gattgtttcc ttggcactga ctgcccacct gtctgtgtca atggaatcgg agggctacct 7800
ggttgcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt acttgagtgc cttgctgatg 7860
gctgctcctt tggtctcttg ggatgtggag attgaaatca ttgataaatt aatctccatt 7920
ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg gtgtgaaagc agagcattct 7980
gatagctggg acagattcta cattaaggga ggtcaaaaat acaagtcccc taaaaatgcc 8040
tatgttaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg ctggtgctgc aattactgga 8100
gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc agggatgatg gaagtttgct 8160
gaggtactgg agatgatggg agcgaagggt acatggaccg agactagcgt aactgttact 8220
ggccccccg gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg cgattgatgt caacatgaac 8280
aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc tctttgccga tggcccgaca 8340
gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg agaggatggt tgcgatccgg 8400
acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc cggactactg catcatcacg 8460
ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg acgaccacag gatggcgatg 8520
gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca tccgggaccc tgggtgcacc 8580
cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt tcgtcaagaa ttaagctcta 8640
gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg ttctcactt aagcgtctgc 8700
gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg gtagcgttct tgttatgtgt 8760
aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa atataaatcg aatcaagttt 8820
cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg tgaaaattgc ttcaattttg 8880
tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac ctcaaatctt cgaacattta 8940
tttctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaaggcgcg ttcctatgtc cgggaaagtt 9000
cccgtagaag acaatgatga aagctactga aacgcggaca cgacgtcgca ttggtacgga 9060
tatgagttaa accgactcaa ttcttttatt aagacataaa ccgatttttg ttaaagtgt 9120
acagtgaagt gatataaaac cgaaacaaac cgggtacaagt ttgattgagc aacttgatga 9180
caaacttcag aatttttggt attgaatgaa aatcatagtc taatcgtaaa aaatgtacag 9240
aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctggtt ccaatttatc atcgctttaa 9300
cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaaacgccc gggcacgtgg gatcctctag 9360
cagatctggc cggcccaccg gtgggccata tggggccg cgccgaatt cgagctcgg 9420
acctacctgg cgaaagggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt 9480
tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgc ggccgaatt cccgatctag 9540
taacatagat gacaccgcgc gcgataatt atcctagttt gcgcgtata tttgttttc 9600
tatcgctat taaatgtata attgcgggac tctaatacata aaaaccatc tcataaataa 9660
cgatcatgat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat 9720
aatcatcgca agaccggcaa caggattcaa tcttaagaaa ctttatggcc aaatgtttga 9780
acgatcgggg aaattcgtcg agtcaccctc ggccgggctt ttgacgctt aatcgcggt 9840

```

[0019]

caatacacca cgacgcacct ggtcacgttc gatggactcg aacagcgccct tgaagttcca 9900  
 ctcgccaaac ccacgtctgc ctttgcgtg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag 9960  
 ggtttccgag aagatctgca gcagcaggcg tttgtcgcct tccacggaag atccgtccag 10020  
 caggataccg cgtgcctgca gttgatecac cggctcgccg tggtcaggca ggcggccttc 10080  
 gagcatttcg taataagtgt ctggcggcgc ggtcatgaag cgcattgccga ttttcttcaa 10140  
 cgcgtcccag gtcttgacca ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc 10200  
 gttgaactgc atcaggaact cttcgatctg ccccgcgccc ttggacgact cttcgttcag 10260  
 cgggatgcgg atcatgccgt ccggcgccact catggccttg gaagtcaggc cgggtgtactc 10320  
 gcccttgata tcgaagtaac gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc 10380  
 ccagtagacc atgcggcgcg gatagacgtt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc 10440  
 tgcaccgacc ggattgcgct ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga 10500  
 gctgccttcg ccgaaacggt cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc ctttgatcgc 10560  
 cggcagggtc aattccatcg gcccgggtgc aatatggatc ggctgggcgc cgagttccag 10620  
 ggcgcggttg taggcctttt gcgagtcctt caccggaac gccatgccgc acaccgacgg 10680  
 gccgtgttcg gccgcaaagt aggaggcgat gctgttgggc tcgttgttga ggatcagggt 10740  
 gatctcgccc tggcgttaca ggtgcacgtt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa 10800  
 gcccatgatc tcgaagatcg gctccagggt acccgcgctc ggccgacgca attcgatgaa 10860  
 ttcaaagccc atcaggccca ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc 10920  
 gccgttgctg acgttgccga ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg 10980  
 ggacttgagc ccctggaacg gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg 11040  
 cgccatagac agcggcgcca ggtacgacag cgtctcgaac ttttgtttgc cgtaggccgg 11100  
 ccacacctgc atatatgaa ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgttagc 11160  
 cttcttggtg gtggggaagg cggcgttgga cttaaggccg gtgaacggag ccacatggt 11220  
 ggcttgagca gggcggttcc ggctaacggt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc 11280  
 tatcgttctg aaatggtgaa aattttcaga aaattgcttt tgctttaaaa gaaatgattt 11340  
 aaattgctgc aatagaagta gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttgtt ttgtatatgt 11400  
 tgtgttgaga attctagagt cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa 11460  
 gagtagattt gggtagaaaa gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat 11520  
 tttttgagca atcagatcgc atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca 11580  
 ataaaatgat gtataaaccc tcgatctgtt ttaatcgacg gtatcatatta gtgatccgcg 11640  
 tgatggcagt gatagccact aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag 11700  
 ggtaatgaag cggcaatatt ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg 11760  
 aaaattttca catgctttta ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga 11820  
 tttataatat agtgatttat actaattttg tagtagctta atgtatatgt atactggaaa 11880  
 aacaatgaca atcataatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct 11940  
 gttttaatcg acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc 12000  
 gtcttttgtt ttacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaac 12060  
 tcggaaaata aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa 12120

[0020]

```

aaccacgaa ttacaagtta caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tataactaatt 12180
ttgtagtagc ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta 12240
tcaagttatc gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc 12300
ataaatatca ccaaatttac aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg 12360
tcaacatttt aatttccctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa 12420
agtaactatt tacataagag gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca 12480
ctcacaata caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtgg 12540
ggtttcatta caattgtgtc acttgcagca caaactatct tgctctggga atcatctcag 12600
catcaaagat catgctcact tcaggggaac ttagtgtatc catgcctcga ctcataattc 12660
tctcgcacct gcaggcatgc aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag 12720
tcgcgacgta cgttcgaaca attggtttta aaagcttgca tgccctcgagg tcgaggagaa 12780
atatgagtcg aggcatggat acactaagtt cccctgaagt gagcatgac tttgatgctg 12840
agatgattcc cagagcaaga tagtttgtgc tgcaagtgc acaattgtaa tgaaaccacc 12900
actcaacgaa tttacttgtg gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc 12960
cggttggtaa ttatttttgt taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaaat agttacttta 13020
tctattgaag tgtgttcttg ttgtctatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat 13080
cccatttaca attgataact tggatacac aaactttgta aatttgggtga tatttatggt 13140
cgaagaagg caataccat tgatgttcc aatatcaata tcaatcagat aacttgataa 13200
tactaacata tgattgtcat tgtttttcca gtatcaatat acattagct actacaaaat 13260
tagtataaat cactatatta taaatctttt tcggttgtaa ctgttaattc gtgggttttt 13320
aaaaataaag catgtgaaaa ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt 13380
ccaaaatatt gcccttcat taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat 13440
tcttagtggc tatcactgcc atcacgcgga tcaactaat gaaccgtcga ttaaaacaga 13500
tcgacggttt atacatcatt ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta 13560
atatgcgac tgattgtcga aaaaatagac tctccgtctt tgcctataaa aacaatttca 13620
catctttctc acccaaactc actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct 13680
ctcgactcta gaggatccaa gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggtatg 13740
atttgtttgt aattagatca ggggtttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg 13800
ttactgtctc cgcatctga ttttacgaca atagagtctc gggttttgtc ccattccagt 13860
ttgaaaataa aggtccgtct ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc 13920
tagtcgattt attggatgat ccattcttca tcgttttttt ctgtcttcga agttctgtat 13980
aaccagattt gtctgtgtgc gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt 14040
cgagtcaatt ttgccccttt tggttatatac tggttcgata acgattcatt tggattaggg 14100
ttttaagttg tgacgtttag tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa 14160
tcccaattg actgttcaat ttcttgttaa atgcgcagat ccccatggct tcgatctcct 14220
ctcagtcgc gaccgttagc cggaccgccc ctgctcaggc caacatggtg gctccgttca 14280
cgggccttaa gtccaacgcc gccttcecca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccaccc 14340
ttcccagcaa cgggtgaaga gttcaatgta tgcagggtgt gccgcctac ggcaacaaga 14400

```

[0021]

```

agttcgagac gctgtcttac ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct 14460
cgtcggccac cgccgtcgtt ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg 14520
cccgccgctc ctccagaagc ctcggaacg tcagcaacgg cggaaggatc cggtgcatgg 14580
ccggcgccga ggagatcgtg ctgcagecca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc 14640
cggggtccaa gtcgctttcc aaccgatcc tcctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa 14700
cagtgttga taacctgtg aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga 14760
ctcttggtct ctctgtcgaa cggacaaaag ctgcaaaaag agctgtagt ttggctgtg 14820
gtggaagtt ccagttgag gatgctaaag aggaagtga gctcttctt gggaatgtg 14880
gaatcgcaat gcggtccttg acagcagctg ttactgtgc tgggtgaaat gcaacttac 14940
tgcttgatgg agtaccaga atgagggaga gaccattgg cgacttggt gtcggattga 15000
agcagcttgg tgcagatgtt gattgtttcc ttggcactga ctgccacct gtctgtgtca 15060
atggaatcgg agggctacct ggtggcaagg tcaagctgc tggctccatc agcagtcagt 15120
acttgagtgc cttgctgatg gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca 15180
ttgataaatt aatctccatt ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgat gagcgtttt 15240
gtgtgaaagc agagcattct gatagctggg acagattcta cattaaggga ggtcaaaaat 15300
acaagtcgcc taaaatgcc tatgtgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg 15360
ctggtgtgc aattactgga gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc 15420
aggggtgatg gaagtttctt gaggtactgg agatgatggg agcgaaggtt acatggaccg 15480
agactagcgt aactgttact ggeccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg 15540
cgattgatgt caacatgaac aagatgcctg atgtcgccat gactcttctt gtggttgccc 15600
tctttgccga tggcccgaca gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg 15660
agaggatggt tgcgatccgg acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc 15720
cggactactg catcatcacg ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg 15780
acgaccacag gatggcgatg gctttctccc ttgccgctg tggcgaggtc cccgtcacca 15840
tccgggaccc tgggtgcacc cggaagacct tcccgcacta cttcgatgtg ctgagcactt 15900
tcgtcaagaa ttaagctcta gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg 15960
tttctcactt aagcgtctgc gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg 16020
gtagcgttct tgttatgtg aattacgtt tttcttctt cttcagcagt ttcggttgaa 16080
atataaatcg aatcaagttt cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg 16140
tgaaaattgc ttcaattttg tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac 16200
ctcaaatctt cgaacattta tttctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaaggcgcg 16260
ttcttatgtc cgggaaagtt cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca 16320
cgacgtcgca ttggtacgga tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa 16380
ccgattttgg ttaaagtgtg acagtgaact gatataaac cgaaacaaac cgttacaagt 16440
ttgattgagc aacttgatga caaacttcag aattttggtt attgaatgaa aatcatagtc 16500
taatcgtaaa aaatgtacag aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctggtt 16560
ccaatttate atcgctttta cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt 16620
tcatccgtct ttttgtaaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt 16680

```

	aatgtggttc atctccctat atgttttgct tgttggattt tgctatcaca tgtttattgc	16740
	tccaaactaa ttataataaa atgactttca aatgatttgt gttgacattc tttcaaatt	16800
	gttcgctgaa gaaaagataa tctcgaggcc ttgatttggt aatgctttca ttaataaata	16860
	aataaaataa ctctttccaa atttcaattc atgcttttat attgtgttgt tcatcctcat	16920
	cttatgtcac tattatcatt tcatgtttga gactttactt ggccatattt gagaagacct	16980
	tcttcattat aggcaatttt atctccacaa taatataaga gaatatcttg aattaataat	17040
	tattgaggat atattatagg gttctatgtg gaactaaaga catggttacc ccattaagag	17100
	agagtataga ggaattactt ttatttgcca cgaggcgacg cgacttgtat ttattttgga	17160
	attgtacttt tgcgtgagca gtgtggctct atgttggggc ctccacttgt tgggtgttta	17220
	tatatgtgaa aggaggatga ggtgatgtgt tcatttcttt gcattatttt tgttattcgc	17280
	gcgaatgata tatgccctgt tttgaagat tgatagggaa gtccatatat aggaattgaa	17340
	gtgtcaaaag ggtgtgagta tgtgctatga taatcaccca attaatgtac atctggtgtg	17400
	gtgtttgaat ttgtaggta ttaattaata ttcctcttgg tgaagtttg agttcttttg	17460
	caattacaat tctgttttgt aagtattat gatggacttt tagatgttcc tcaaacagta	17520
	ggtgtaaaag aaaatgggcc ctggtatgaa aatttgtttt cactctttct cattcataac	17580
[0022]	tttaaaaaa gaatgataat ttgtataaa aaataaaaa atattaaata tttctcaaa	17640
	tcaaacaacc tttatttttt atgccaacaa taattttgtt aaagatggag atttcaatta	17700
	ttatataaga gtccattata gttgaaaatt gaatgaatgt atatgtttac gttttttgtc	17760
	tcaagtgaag ctaagatcaa atattcatat ctattgagct ggtctt	17806
	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物SHA130	
	<400> 21	
	ctatattctg gtccaattt atc	23
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物SMP178	
	<400> 22	
	tgaggcacgt attgatgacc	20

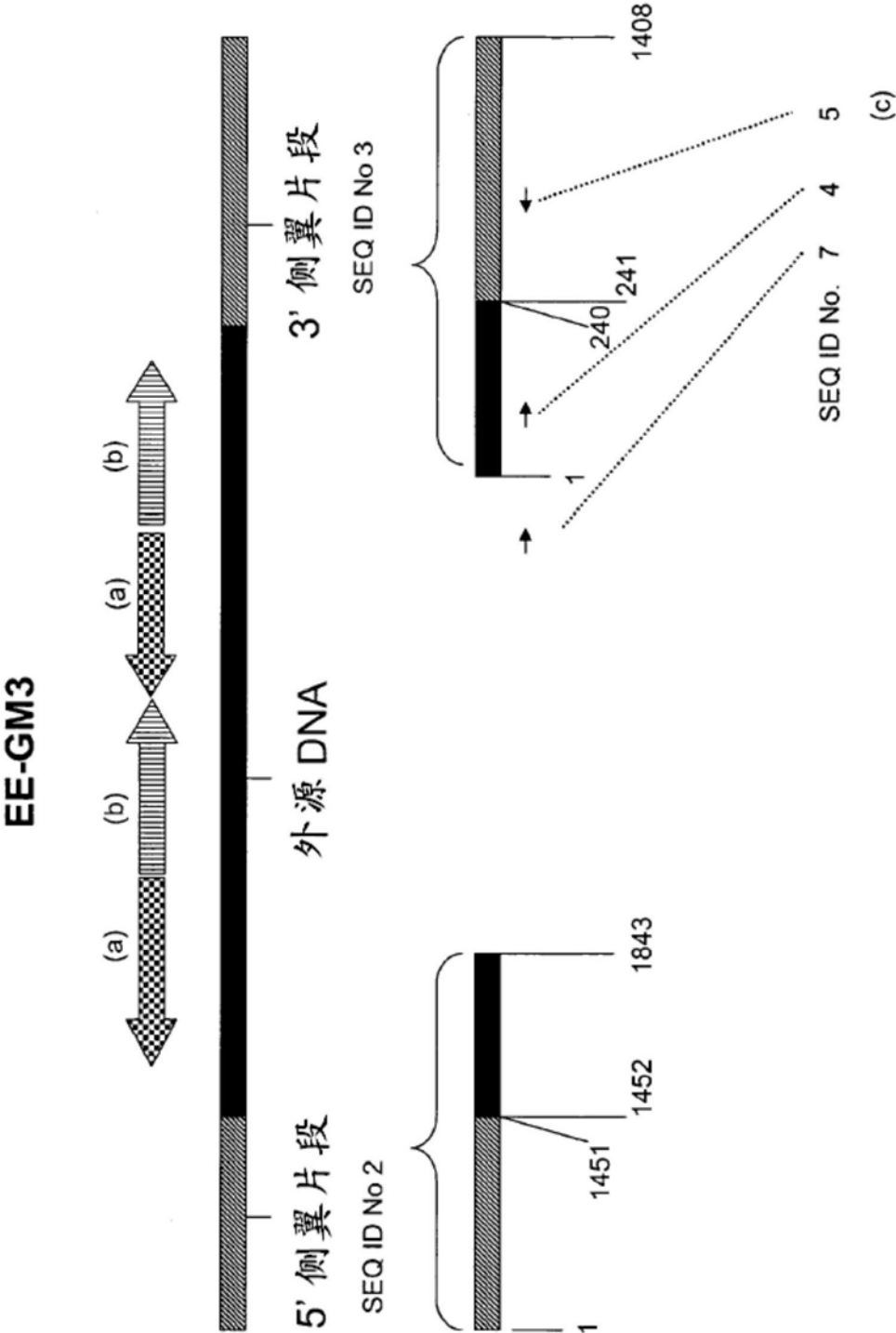


图1





图2

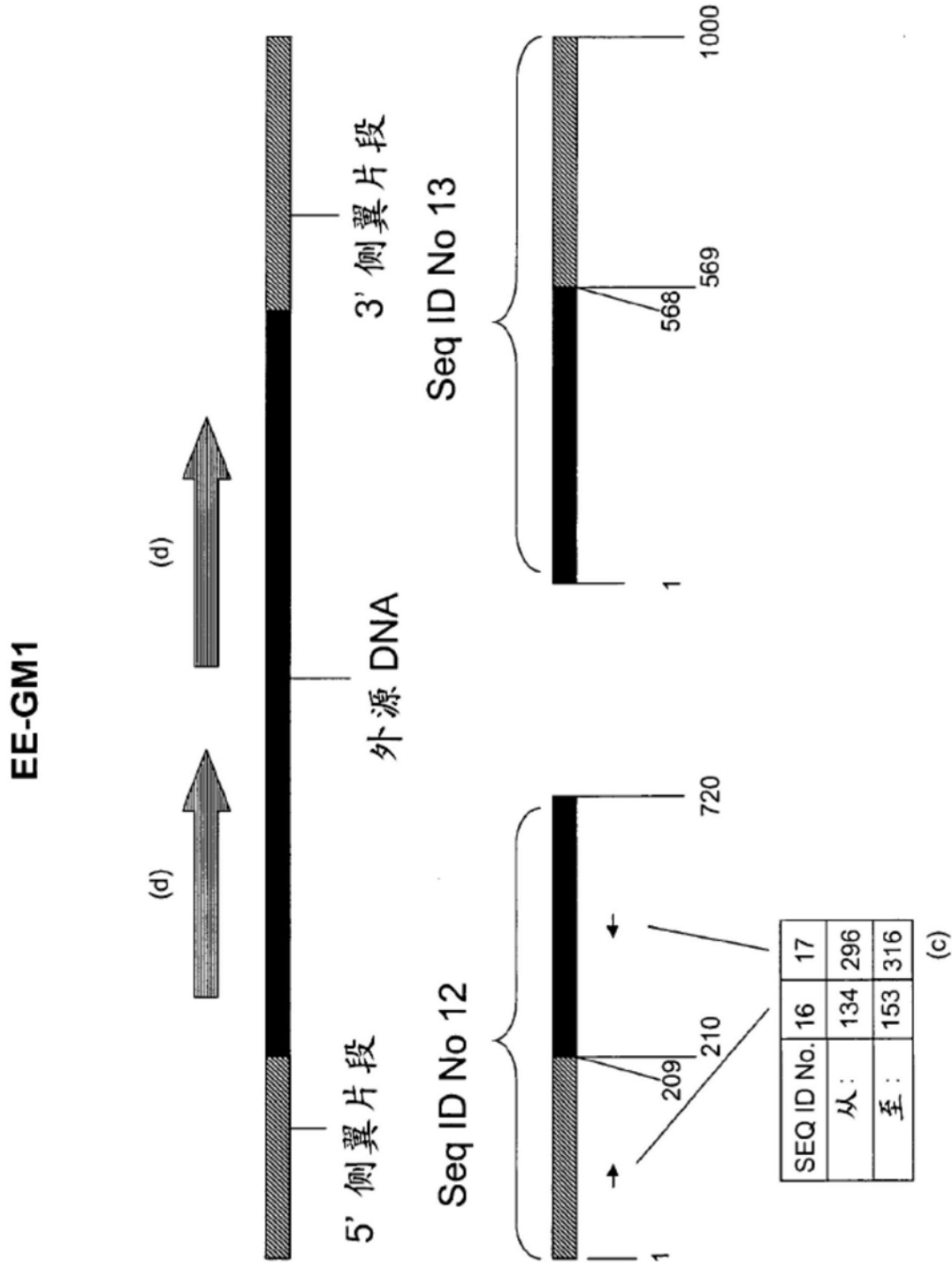


图3

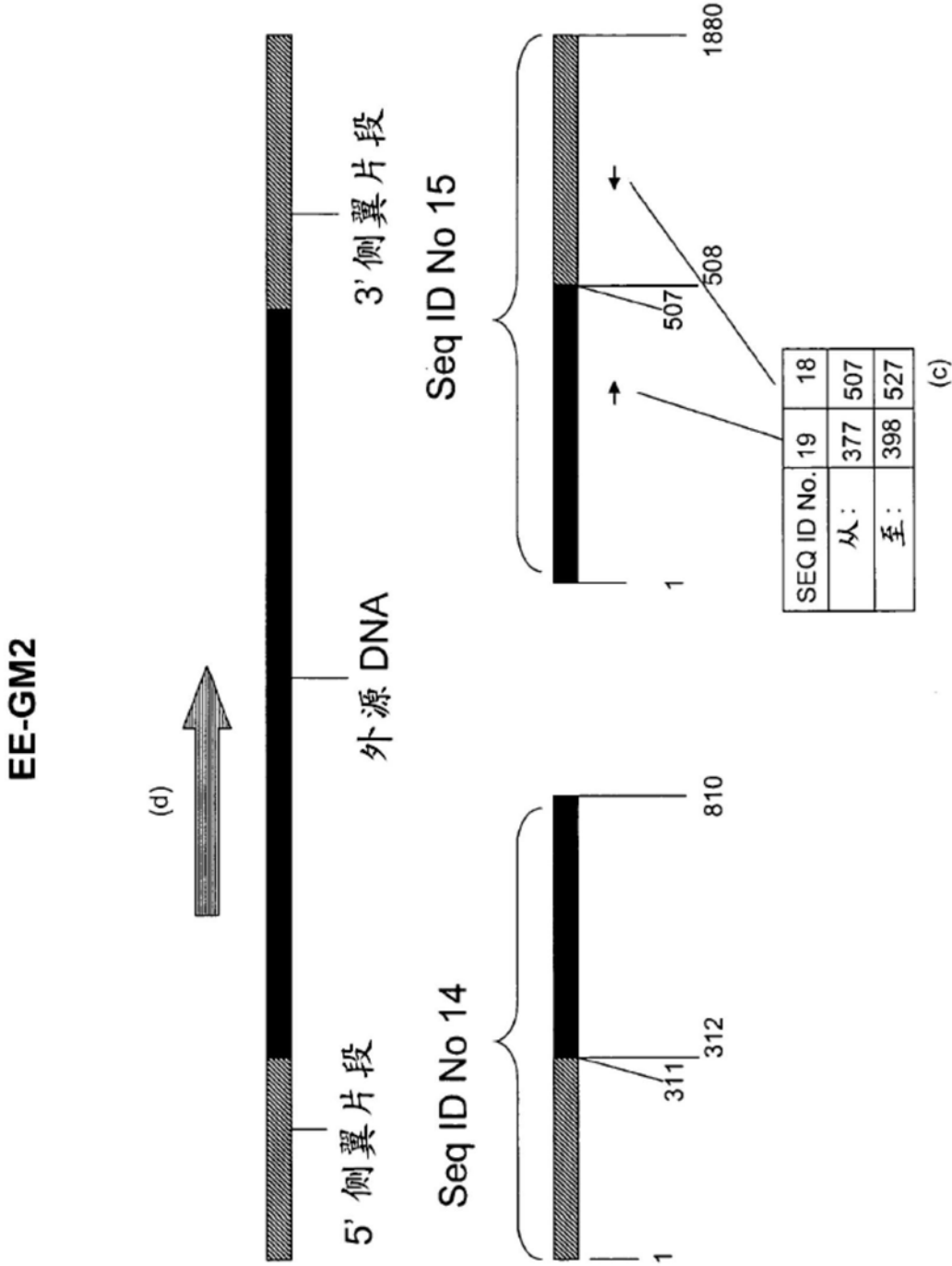


图4

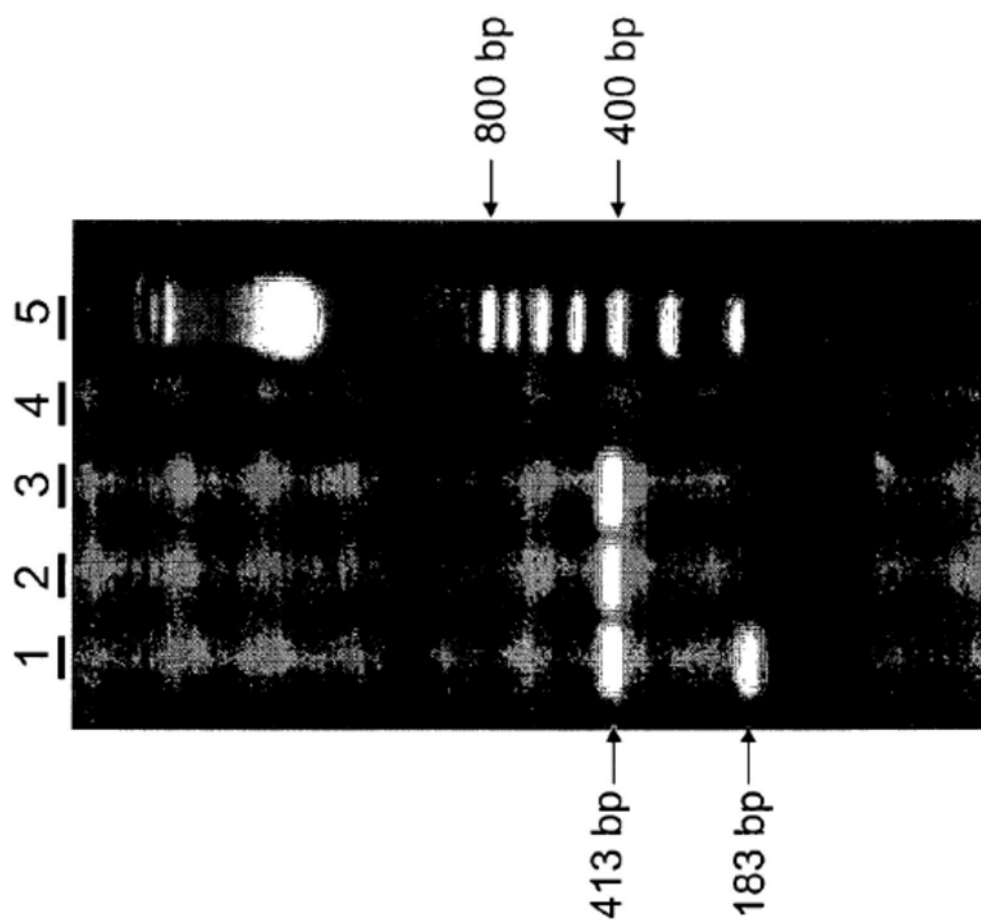


图5

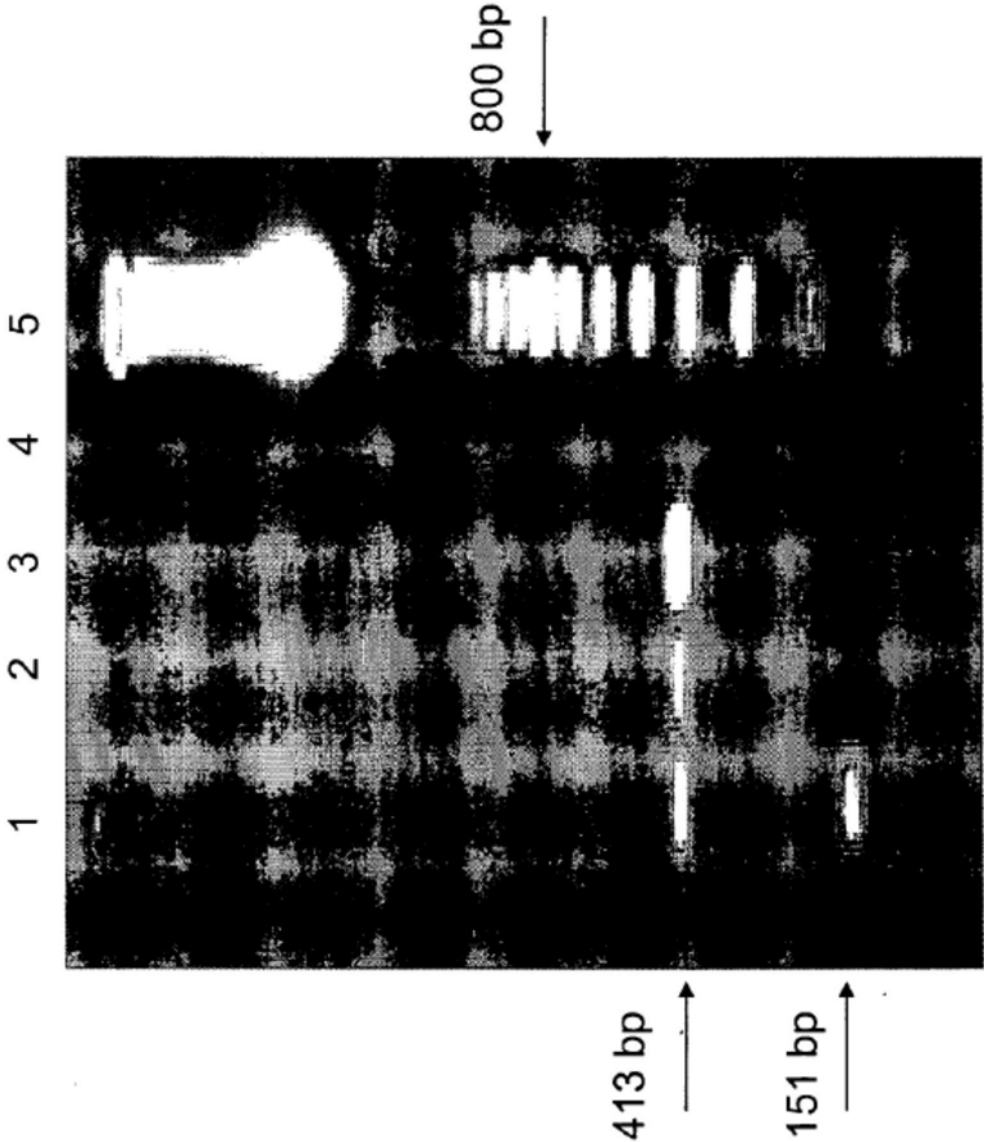


图6