

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380109549.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年3月18日

[11] 授权公告号 CN 100469885C

[22] 申请日 2003.12.3

[21] 申请号 200380109549.4

[30] 优先权

[32] 2002.12.5 [33] US [31] 60/431,153

[86] 国际申请 PCT/US2003/038268 2003.12.3

[87] 国际公布 WO2004/053062 英 2004.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.5

[73] 专利权人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

共同专利权人 斯科兹公司

[72] 发明人 郭小丽 R·W·哈里曼 L·李

E·K·纳尔逊

[56] 参考文献

US005948956A 1999.9.7

WO0214524A2 2002.2.21

审查员 王颖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 刘玥

权利要求书2页 说明书27页 附图5页

[54] 发明名称

翦股颖事件 ASR-368 和组合物及其检测方法

[57] 摘要

本发明提供翦股颖 ASR-368 植物和种子。还提供根据 DNA 序列用于检测翦股颖 ASR-368 的存在的方法,和在 DNA 检测方法中这些 DNA 序列作为分子标记物的用途。

1. 包含事件 ASR-368 的草甘膦耐受莠股颖植物细胞, 其中, 所述莠股颖植物细胞的基因组包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4。

2. 特异的用于在样品中检测莠股颖事件 ASR-368 或其子代基因组 DNA 的 DNA 检测试剂盒, 该试剂盒包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 中至少 11 个连续核苷酸构成的分离的 DNA 引物分子, 或其完全互补物, 其中, 所述 DNA 引物分子用于具有莠股颖植物 ASR-368 基因组 DNA 的 DNA 扩增方法中时, 产生包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的扩增子。

3. 权利要求 2 的 DNA 检测试剂盒, 该试剂盒包含选自 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 的经分离的 DNA 引物分子。

4. 检测样品中是否存在莠股颖 ASR-368 DNA 的方法, 该方法包含:

(a) 从莠股颖 ASR-368 植物或莠股颖 ASR-368 植物部分提取 DNA 样品; 和

(b) 使该 DNA 样品与 DNA 引物对接触; 和

(c) 进行核酸扩增反应, 从而产生扩增子; 和

(d) 检测该扩增子;

其中, 所述扩增子包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2。

5. 检测 DNA 样品中是否存在 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的方法, 该方法包含:

(a) 从莠股颖 ASR-368 植物或莠股颖 ASR-368 植物部分提取所述 DNA 样品; 和

(b) 使所述 DNA 的样品与探针接触, 所述探针在严紧杂交条件下, 与来自莠股颖事件 ASR-368 的基因组 DNA 杂交但不与对照莠股颖植物基因组 DNA 杂交, 所述探针与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 互补; 和

(c) 将样品和所述探针置于严紧杂交条件下; 和

(d) 检测所述探针与所述 DNA 的杂交。

6. 生产耐受施用的草甘膦除草剂的植物的方法, 该方法包含:

(a) 使草甘膦耐受的第一藨股颖植物与缺乏对草甘膦除草剂的耐受性的第二藨股颖植物有性杂交，从而生产大量子代植物，其中，所述第一藨股颖植物包含权利要求 1 所述草甘膦耐受植物细胞；和

(b) 挑选耐受施用的草甘膦的子代植物，其中所述的子代植物包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。

7. 草甘膦耐受藨股颖植物细胞，其中所述细胞的基因组包含编码草甘膦耐受的 EPSPS 的 DNA 插入物，并且其中所述 DNA 插入物具有与所述藨股颖基因组 DNA 的 5' 和 3' 连接，其分别包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。

8. 一种 DNA 分子，所述 DNA 分子选自 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4，其中所述 DNA 分子存在于权利要求 1 所述的植物细胞中。

蒭股颖事件 ASR-368 和组合物及其检测方法

发明领域

本发明涉及植物分子生物学领域。更具体地说，本发明涉及草甘膦耐受的蒭股颖植物事件 ASR-368，并涉及鉴定和用于在植物样品中检测蒭股颖植物事件 ASR-368 DNA 的存在的方法和组合物。

发明背景

蒭股颖 (*Agrostis stolonifera*) 在世界很多地区是重要的草皮物种。

已有把生物技术的方法应用于蒭股颖以改善其农学性状。一种这样的农学性状是除草剂耐受性，特别是对草甘膦除草剂的耐受性。在蒭股颖中控制杂草是特别成问题的。在高尔夫球绿地上使用的蒭股颖对许多在其他的草皮草上或在高尔夫球场的其他区域上通常使用的除草剂特别敏感。一年生草本，例如，马唐属 (crabgrass)、狐尾草 (foxtail)、毛花雀稗 (dallisgrass) 和牛筋草 (goosegrass) 必须通过使用各种除草剂包括砒草磷 (bensulide)、氟硫草定 (dithiopyr)、噁草酮 (oxadiazon)、噁唑禾草灵 (fenoxaprop) 和氨基丙氟灵 (prodiamine)，以特定的比例、环境条件和季节通过专门的撒药机施用来进行有效的控制。一年生的和多年生阔叶杂草可以在蒭股颖草皮上通过施用包括 2, 4-D、MCPP、麦草畏 (dicamba) 及其混合物来控制。许多草类和阔叶除草剂不能在蒭股颖高尔夫球绿地上使用，因为其对蒭股颖的损伤，或因为它们没有被注册为在蒭股颖上使用。需要一种草甘膦耐受的蒭股颖来恢复这些除草剂的使用，并需要提供一种当施用的草甘膦除草剂时在蒭股颖草皮中有效的控制草类和阔叶杂草的方法。

N-磷酸甲基甘氨酸，也称为草甘膦，是一种在广谱的植物品种上具有活性的公知除草剂。草甘膦是 Roundup® (Monsanto Co.) 的活性成分，是在环境中具有理想的短半衰期的安全的除草剂。当施用到植物表面时，草甘膦通过植物系统性地移动。由于对莽草酸途径的抑制，草甘膦是植物毒性的，莽草酸途径提供用于合成芳香族氨基酸的

前体。草甘膦抑制在植物中发现的 5-烯醇丙酮-3-磷酸莽草酸合酶 (EPSPS)。草甘膦耐受性也可以通过表达细菌 EPSPS 变体和植物 EPSPS 变体来实现, 所述变体具有对草甘膦的低亲合性, 因此在草甘膦存在的情况下保持了它们的催化活性 (美国专利 No. 5, 633, 435、5, 094, 945、4, 535, 060 和 6, 040, 497)。

已知在植物中表达外源基因受到它们的染色体位置的影响, 也许是由于染色质结构 (例如, 异染色质) 或转录调控元件 (例如, 增强子) 靠近整合位点 (Weising 等, *Ann. Rev. Genet* 22: 421-477, 1988) 造成的。为此, 常常必须筛选大量的事件来鉴别以导入的感兴趣的基因的最优表达为特征的事件。例如, 已经在植物和其他生物中观察到, 在事件之中可能存在着在导入基因的表达水平上的大范围变化。在表达的空间或时间模式上也可能存在差异, 例如, 在各种植物组织中转基因的相对表达的差异, 其可能与根据存在于导入的基因结构中针对转录调控元件所期待的模式不相应。为此, 普遍的是生产数百到数千个不同的事件并从这些事件中筛选具有用于商业目的的期望的转基因表达水平和模式的单个事件。具有期望的转基因表达水平或模式的事件对于利用传统的育种方法通过有性杂交将转基因渗入到其他的遗传背景中是有用的。这种杂交的子代维持了原始转化体的转基因表达特征。这个策略被用于在许多变种中确保可靠的基因表达, 这些品种很好地适应了当地的生长条件和市场需求。

能够检测特定事件的存在以确定有性杂交的子代是否包含感兴趣的转基因是有用的。此外, 检测特定事件的方法, 比方说, 对于遵守需要上市前批准的法规和对来源于重组农作物的食物进行标记是有帮助的。通过任何已知的核酸检测方法例如聚合酶链式反应 (PCR) 或利用核酸探针的 DNA 杂交, 有可以检测转基因的存在。这些检测方法通常关注经常使用的遗传元件, 例如启动子、终止子、标记基因等等。结果, 除非邻近于插入的 DNA 的染色体 DNA (“侧翼 DNA”) 的序列是已知的, 这种方法对于辨别不同的事件, 特别是那些利用相同的 DNA 构建体产生的事件可能是没有用的。已经讨论了事件特异性的 PCR 分析, 例如, Windels 等 (*Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent* 64/5b: 459-462, 1999), 利用跨越了插入物和侧翼 DNA 之间的连接的引物组, 具体地说是一个包括来自插入物的序列的引物和包括来自侧翼 DNA 的

序列的第二引物，通过PCR鉴别了草甘膦耐受的大豆事件40-3-2。也已经描述了用于草甘膦耐受的玉米事件的事件特异性的DNA检测方法（US 20020013960 A1，此处将其全部引用作为参考）。

本发明涉及草甘膦除草剂耐受的藜股颖植物ASR-368，和包含被包括在ASR-368的基因组中的转基因/基因组连接区的DNA组合物，以及用于在藜股颖植物ASR-368和其子代中检测转基因/基因组连接区的方法。

发明概述

本发明是命名为ASR-368的藜股颖转基因事件，其种子保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏号为No. PTA-4816。本发明的另一方面是藜股颖植物ASR-368的子代植物、或种子、或植物和种子的可再生部分。本发明还包括藜股颖植物ASR-368的一部分，包括但不限于，花粉、胚珠、花、芽、根和叶子。

本发明的一个方面提供用于检测来自藜股颖植物事件ASR-368的转基因/基因组连接区的存在的组合物和方法。提供DNA分子，其包含选自于SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2和其互补物的至少一个转基因/基因组连接DNA分子，其中连接分子跨越包含插入到藜股颖基因组中的异源DNA的插入位点和来自藜股颖细胞在藜股颖事件ASR-368中位于插入位点侧翼的基因组DNA。包含这些分子的藜股颖植物ASR-368和种子是本发明的一个方面。

提供新的DNA分子，其是转基因/基因组区域SEQ ID NO: 3或其互补物，其中这个DNA分子在藜股颖事件ASR-368中是新的。在基因组中包含SEQ ID NO: 3的藜股颖植物和种子是本发明的一个方面。

根据本发明的另一个方面，提供DNA分子，其是转基因/基因组区域SEQ ID NO: 4或其互补物，其中这个DNA分子在藜股颖事件ASR-368中是新的。在基因组中包含SEQ ID NO: 4的藜股颖植物和种子是本发明的一个方面。

根据本发明的另一个方面，提供两个DNA分子用于DNA检测方法，其中第一个DNA分子包含SEQ ID NO: 3的DNA分子转基因区域的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸和SEQ ID NO: 3的5'侧翼藜股颖基因组DNA区域的任何部分的类似长度的DNA分子，其中当共同

使用这些 DNA 分子时它们作为 DNA 引物应用于生产扩增子的 DNA 扩增方法。利用这些 DNA 引物在 DNA 扩增方法中生产的扩增子可检测藜股颖事件 ASR-368。通过与 SEQ ID NO: 3 的任何部分同源或互补的 DNA 引物生产的包含 SEQ ID NO: 1 的任何扩增子是本发明的一个方面。

根据本发明的另一个方面，提供两个 DNA 分子用于 DNA 检测方法，其中第一个 DNA 分子包含 SEQ ID NO: 4 的 DNA 分子转基因区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸和 SEQ ID NO: 4 的 5' 侧翼藜股颖基因组 DNA 区域的任何部分的类似长度的 DNA 分子，其中当共同使用这些 DNA 分子时它们作为 DNA 引物应用于生产扩增子的 DNA 扩增方法。利用这些 DNA 引物在 DNA 扩增方法中生产的扩增子可检测藜股颖事件 ASR-368。通过与 SEQ ID NO: 4 的任何部分同源或互补的 DNA 引物生产的包含 SEQ ID NO: 2 的任何扩增子是本发明的一个方面。

根据本发明的另一个方面，提供检测样品中存在特定的相应于藜股颖事件 ASR-368 DNA 的 DNA 的检测方法。这种方法包含：(a) 使包含 DNA 的样品与引物组接触，所述引物组在用于与藜股颖事件 ASR-368 的基因组 DNA 进行核酸扩增反应时产生可检测藜股颖事件 ASR-368 的扩增子；(b) 进行核酸扩增反应，从而生产扩增子；和 (c) 检测该扩增子。

根据本发明的另一个方面，提供检测样品中存在特定的相应于藜股颖事件 ASR-368 DNA 的检测方法。这种方法包含：(a) 使包含 DNA 的样品与探针接触，该探针在严紧杂交条件下与来自藜股颖事件 ASR-368 的基因组 DNA 杂交并且在严紧杂交条件下不与对照藜股颖植物 DNA 杂交；(b) 将样品和探针置于严紧杂交条件中；和 (c) 检测探针与 ASR-368 DNA 的杂交。

根据本发明的另一个方面，提供生产能耐受施用的草甘膦的藜股颖植物的方法，包含步骤：(a) 使对施用的草甘膦耐受的包含本发明表达盒的第一亲本藜股颖事件 ASR-368，与缺乏草甘膦耐受性的第二亲本藜股颖植物进行有性杂交，从而生产大量子代植物；和 (b) 挑选耐受草甘膦的子代植物。这种方法可选择性地包含进一步的步骤，该步骤使子代植物与第二亲本藜股颖植物回交并挑选草甘膦耐受的子代来生产耐受施用的草甘膦的纯育藜股颖种类。

提供包含藜股颖事件 ASR-368 的草类的草皮草植被 (turfgrass

stand)。草甘膦耐受的蒭股颖 ASR-368 的草皮草植被在高尔夫球场上是特别有用的，这些草皮草植被是本发明的一个方面。

本发明的另一个方面是用于在蒭股颖 ASR-368 的草皮草植被上控制杂草的方法，包含向该草皮草植被施用含草甘膦的除草剂配方的步骤。

本发明的上述及其他方面将根据以下的详细说明和附随的图变得更为显而易见。

图的简要说明

图 1. pMON25496 的质粒图

图 2. 插入在蒭股颖事件 ASR-368 中的基因组构成

图 3. ASR-368 5'转基因/基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO: 3)

图 4. ASR-368 5'转基因/基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO: 4)

图 5. ASR-368 5'转基因/基因组连接区 (SEQ ID NO: 1) 和 3'转基因/基因组连接区 (SEQ ID NO: 2)

优选实施方式的详细说明

提供以下定义和方法来更好的定义本发明和指导本领域的普通技术人员实施本发明。除非另作说明，根据本领域普通技术人员的常规的用法来理解术语。在分子生物学中通用术语的定义也可在 Rieger 等, Glossary of Genetics: Classical and molecular, 第五版, Springer-Verlag: New York, 1991; 和 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994 中找到。使用如 37 CFR §1.822 中阐明的 DNA 碱基命名法。

如在此处使用的，术语“蒭股颖”是指 *Agrostis stolonifera*，并包括所有可以用蒭股颖 ASR-368 繁殖的植物变种。

如在此处使用的，术语“包含”是指“包括但不限于”。

“草甘膦”指 N-磷酸甲基甘氨酸和它的盐，草甘膦是 Roundup® 除草剂 (Monsanto Co.) 的活性成分。用“草甘膦除草剂”处理是指用 Roundup®、Roundup Ultra®、Roundup Pro® 除草剂或任何其他包含草甘膦的除草剂配方处理。草甘膦的商用配方的实例包括但不限于，那些 Monsanto Company 出售的如 ROUNDUP®、ROUNDUP® ULTRA、

ROUNDUP® ULTRAMAX、ROUNDUP® CT、ROUNDUP® EXTRA、ROUNDUP® BIACTIVE、ROUNDUP® BIOFORCE、RODEO®、POLARIS®、SPARK®和 ACCORD®除草剂，所有这些都包含草甘膦作为其异丙基铵盐；那些 Monsanto Company 出售的如 ROUNDUP® DRY 和 RIVAL®除草剂，其包含草甘膦作为其铵盐；Monsanto Company 出售的如 ROUNDUP® GEOFORCE，其包含草甘膦作为其钠盐；和 Zeneca Limited 出售的如 TOUCHDOWN®除草剂，其包含草甘膦作为其三甲基铊盐。

转基因“事件”是通过异源 DNA，即，包括感兴趣的转基因的核酸构建体对植物细胞进行转化，由转基因插入到植物基因组中再生的植物群体，和选择插入特定基因组位置的为特征的特定的植物产生的。术语“事件”指包括异源 DNA 的原始转化体和该转化体的子代。术语“事件”还指通过在转化体和另一个包括异源 DNA 的事件之间进行有性的异型杂交生产的子代。甚至在重复的对回归亲本的回交之后，来自转化的亲本的插入 DNA 和侧翼基因组 DNA 存在于杂交子代的相同染色体位置。术语“事件”还指可望将来自包含插入的 DNA 和紧邻插入 DNA 的侧翼基因组序列的原始转化体的 DNA 转移到包括感兴趣的转基因的插入 DNA 的子代中，所述子代是包括插入 DNA 的一个亲体株系（例如，原始转化体和自交产生的子代）与不包含插入的 DNA 的亲本株系进行有性杂交的结果。草甘膦耐受的藜股颖植物可以通过首先使第一亲本藜股颖植物与缺乏对草甘膦除草剂的耐受性的第二亲本藜股颖植物进行有性杂交，从而生产出大量的第一子代植物，其中第一亲本藜股颖植物由转基因的藜股颖植物生长出的、耐受施用的草甘膦除草剂的藜股颖植物组成，该转基因的藜股颖植物是由包含在 pMON25496（图 1）中的植物表达盒转化的；然后挑选对施用的草甘膦除草剂耐受的第一子代植物；然后对第一子代植物进行自交，从而生产出大量第二子代植物；然后从第二子代植物中挑选出草甘膦除草剂耐受植物。这些步骤可进一步包括使第一草甘膦耐受的子代植物或第二草甘膦耐受的子代植物与第二亲本藜股颖植物或第三亲本藜股颖植物回交，从而生产出耐受施用的草甘膦除草剂的藜股颖植物。在本发明中，转基因藜股颖事件也被定义为藜股颖事件 ASR-368，在此也可称为 ASR-368 或事件 ASR-368。

还应理解的是，两个不同的转基因的植物也可以被配对来生产包

含两个独立地分别添加的外源基因的后代。适当子代的自交能产生对于两个添加的外源基因都是纯合的植物。还包括对亲本植物进行回交和用非转基因植物进行异型杂交以及营养繁殖。通常被用于不同性状和作物的其他繁育方法的说明可参见下述任一参考文献例如, Fehr, *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987)。

“探针”是分离的核酸, 在上面附有常规的可检测的标记或报告分子, 例如, 放射性同位素、配体、化学发光剂或酶。这种探针与目标核酸的链互补, 就本发明来说, 与来自葛股颖事件 ASR-368 的基因组 DNA 的链互补, 不论该基因组 DNA 是来自葛股颖事件 ASR-368 植物还是来自包括来自该事件的 DNA 的样品。根据本发明的探针不仅包括脱氧核糖核酸或核糖核酸, 还包括与目标 DNA 序列特异结合并可用于检测目标 DNA 序列存在的聚酰胺及其他探针材料。

“引物”是分离的核酸, 其通过核酸杂交与互补的目标 DNA 链退火形成引物和目标 DNA 链的杂合体, 然后通过聚合酶, 例如 DNA 聚合酶沿目标 DNA 链延伸。本发明的引物对涉及它们用于目标核酸序列的扩增的用途, 例如, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 或其他常规的核酸扩增方法。

探针和引物的长度通常是 11 个多核苷酸或以上, 常常是 18 个多核苷酸或以上、24 个多核苷酸或以上、或 30 个多核苷酸或以上。选择这种探针和引物使其具有足够的长度来在高度严紧杂交条件下特异地与目标序列杂交。尽管可以通过常规方法设计保持对目标序列的杂交能力的、与目标序列不同的探针, 优选的, 根据本发明的探针和引物具有与目标序列类似的全部的序列。

制备和使用探针和引物的方法已有描述, 例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (在下文中, “Sambrook 等, 1989”); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel 等, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (定期更新) (在下文中, “Ausubel 等, 1992”); 和 Innis 等, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990。

PCR 引物对可源自已知序列，例如，通过使用为此目的设计的计算机程序，例如 Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)。

在此公开的根据侧翼基因组 DNA 和插入序列的引物和探针可用于通过常规方法确认（和，如有必要，纠正）公开的 DNA 序列，例如，对这种分离自蕈股颖 ASR-368 的 DNA 分子进行重克隆和测序，蕈股颖 ASR-368 的种子保藏在 ATCC，保藏号为 PTA-4816。

本发明的核酸探针和引物在严紧条件下与目标 DNA 分子杂交。可使用任何常规的核酸杂交或扩增方法来鉴别样品中来自转基因事件的 DNA 的存在。核酸分子或其片段能在某些环境下与其他的核酸分子特异性的杂交。如此处使用的，如果两个核酸分子能形成反义平行的双链核酸结构，则称为两个核酸分子能相互特异性的杂交。如果核酸分子显示出完全的互补性，则称为核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。如此处使用的，当一个分子的每一个核苷酸与另一个分子的核苷酸互补时，称为分子显示出“完全的互补性”。如果它们的相互杂交具有足够的稳定性以使它们在至少常规的“低严紧”条件下保持相互的退火，称为两个分子是“最低度互补的”。类似地，如果它们的相互杂交具有足够的稳定性以使它们在至少常规的“高严紧”条件下保持相互的退火，称为分子是“互补的”。常规的严紧条件由 Sambrook 等, 1989 和 Haymes 等, 在 *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985) 中描述。因此对完全的互补性的偏离是可允许的，只要这种偏离不会完全地排除分子形成双链结构的能力。为了使核酸分子充当引物或探针，仅需在序列中充分的互补，以使得在所使用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

此处所用的，基本上同源的序列是在高度严紧条件下和与其相比较的核酸序列的互补物特异性的杂交的核酸序列。促进 DNA 杂交的适当严紧的条件，例如， $6.0 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 约 45°C ，之后是在 50°C 用 $2.0 \times$ SSC 洗涤，对本领域的技术人员是公知的，或可在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。例如，洗涤步骤中的盐浓度可以从低度严紧的约 $2.0 \times$ SSC、 50°C 到高度严紧的约 $0.2 \times$ SSC、 50°C 之中选

择。此外，洗涤步骤中的温度可以从低度严紧条件的室温下约 22℃，到高度严紧条件的约 65℃。温度和盐度可以都变化，或者温度或盐浓度保持不变而另一个变量发生改变。在优选的方案中，本发明的核酸与 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 中列出的一个或多个核酸分子，或其互补物或其中任何一个的片段，在中度严紧条件下，例如，在 $2.0 \times \text{SSC}$ 和约 65℃ 下杂交。在特别优选的方案中，本发明的核酸与 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 中列出的一个或多个核酸分子，或其互补物或其中任何一个的片段，在高度严紧条件下杂交。在本发明的一个方面中，本发明的优选的标记物核酸分子具有 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 中列出的，或其互补物或其中任何一个的片段的核酸序列。在本发明的另一个方面中，本发明的优选的标记物核酸分子与 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 中列出的，或其互补物或其中任何一个的片段的核酸序列享有 80% 到 100%，或 90% 到 100% 的序列同一性。在本发明的更进一步的方面中，本发明的优选的标记物核酸分子与 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 中列出的，或其互补物或其中任何一个的片段的核酸序列享有 95% 到 100% 的序列同一性。SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 可用作植物繁育方法中的标记物来鉴别遗传杂交的子代，与对单一序列重复 DNA 标记物分析描述的方法类似，如“DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997)173-185, Cregan, 等, eds., Wiley-Liss NY; 全部引入作为参考。探针与目标 DNA 分子的杂交可以通过许多本领域技术人员已知的方法进行检测，这些可包括但不限于，荧光标记、放射性标记、基于抗体的标记和化学发光标记。

关于使用特定的扩增引物对目标核酸序列的扩增（例如，通过 PCR），“严紧条件”是允许引物对仅与目标核酸序列杂交的条件，具有相应的野生型序列（或其互补物）的引物将与目标核酸序列结合，优选的在 DNA 热扩增反应中产生独特的扩增产物，扩增子。

术语“特异于（目标序列）”是指探针或引物在严紧杂交条件下仅与包含目标序列的样品中的目标序列杂交。

如此处使用的，“扩增的 DNA”或“扩增子”指目标多核苷酸分子的多核苷酸扩增产物，目标多核苷酸分子是多核苷酸模板的一部分。例如，为确定有性杂交产生的藜股颖植物是否包含来自本发明的藜股颖事件 ASR-368 植物的转基因事件基因组 DNA，可对从藜股颖植物组

织样品中提取的 DNA 利用引物对通过多核苷酸扩增法产生对 ASR-368 事件 DNA 的存在有检测价值的扩增子，其中引物对包括来源于在 ASR-368 植物的基因组中邻近插入的异源 DNA（转基因 DNA）的插入位点的侧翼 DNA 的引物，和来源于插入的异源 DNA 的第二引物。扩增子具有一定长度并具有多核苷酸序列，对事件的检测也是有价值的。扩增子的长度可在引物对加上一个核苷酸碱基对的组合长度范围发生变化，优选的加上约五十个核苷酸碱基对，更优选的加上约两百五十个核苷酸碱基对，和更进一步优选的加上约四百五十个核苷酸碱基对或以上。做为选择，引物对可以是源自插入的异源 DNA 两侧的多核苷酸侧翼基因组序列，以产生包含全部的插入多核苷酸序列的扩增子（例如，正向基因组引物来自 SIQ ID NO: 3，反向基因组引物来自 SEQ ID NO: 4，扩增插入的 DNA 分子，其包含转化到莴苣颖中的 pMON25496 DNA 片段的 HindIII 表达盒，约 6681 核苷酸碱基对，图 1）。源自 ASR-368 的植物基因组序列的引物对的成员可以被定位在距插入的 DNA 分子一定距离上，该距离可以在一个核苷酸碱基对到约两万核苷酸碱基对的范围变化。术语“扩增子”的使用要特定的排除可在 DNA 热扩增反应中形成的引物二聚物。

可以通过本领域已知的任何一种多核苷酸扩增方法，包括聚合酶链式反应（PCR）完成多核苷酸扩增。本领域已知一种扩增方法，特别地在美国专利 NO. 4,683,195 和 4,683,202 和 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis 等, Academic Press, San Diego, 1990 中描述。PCR 扩增方法已经发展到可扩增达到 22 kb 的基因组 DNA 和达到 42 kb 的噬菌体 DNA (Cheng 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994)。这些方法以及本领域的其他 DNA 扩增方法可用于实施本发明。来自莴苣颖事件 ASR-368 的异源 DNA 插入物或侧翼基因组 DNA 的序列可以利用来源于此处提供的序列的引物从事件中扩增这种 DNA 分子，然后对 PCR 扩增子或克隆的 DNA 进行标准的 DNA 测序，来核实（如果有必要，可被纠正）。根据 DNA 扩增方法的 DNA 检测试剂盒包含特异性扩增有检测价值的扩增子的 DNA 引物。该试剂盒可提供基于琼脂糖凝胶的检测方法或本领域已知的许多检测扩增子的方法。

可以提供大量的技术来检测这些方法生产的扩增子。其中一个方

法是 Genetic Bit Analysis (Nikiforov, 等 *Nucleic Acid Res.* 22: 4167-4175, 1994), 其中, 设计于迭盖邻近侧翼基因组 DNA 序列和插入的 DNA 序列的 DNA 寡聚核苷酸。将寡聚核苷酸固定在微量滴定板的孔中。在对感兴趣的区域进行 PCR 之后 (使用在插入的序列中的一个引物, 和在邻近侧翼基因组序列中的一个引物), 单链 PCR 产物可与固定的寡聚核苷酸杂交并充当模板, 用于利用 DNA 聚合酶和特异于期待的下一个碱基的标记脱氧核苷酸三磷酸盐 (ddNTP) 进行单碱基延伸反应。读出过程可以是基于荧光的或基于 ELISA 的。信号指示由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸导致的插入/侧翼序列的存在。

另一个方法是如 Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00: 18-24, 2000) 描述的 Pyrosequencing 技术。在这个方法中设计于迭盖邻近基因组 DNA 和插入 DNA 连接的寡聚核苷酸。使寡聚核苷酸与来自感兴趣区域的单链 PCR 产物 (一个引物在插入的序列中, 一个在侧翼基因组序列中) 杂交, 在存在 DNA 聚合酶、ATP、硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、腺苷酸 5'磷酸和荧光素的情况下孵育。分别地添加脱氧核糖核苷酸 (dNTP), 测量导致发光的掺入。发光指示由于成功的扩增、杂交和单碱基或多碱基延伸导致的转基因插入/侧翼序列的存在。

Chen 等描述的荧光偏振 (*Genome Res.* 9: 492-498, 1999) 是可用于检测本发明的扩增子的方法。利用这个方法设计于迭盖基因组侧翼和插入的 DNA 连接的寡聚核苷酸。使寡聚核苷酸与来自感兴趣区域的单链 PCR 产物 (一个引物在插入的 DNA 序列中, 一个在侧翼基因组 DNA 序列中) 杂交, 在存在 DNA 聚合酶和荧光标记的 ddNTP 的情况下孵育。单碱基延伸导致 ddNTP 的掺入。利用荧光计测量偏振的变化可以测量所述的掺入。偏振的变化指示由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸导致的转基因插入/侧翼序列的存在。

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 是一种对 DNA 序列的存在进行检测和定量的方法, 可以根据厂家提供的说明完全理解。简要地, 设计于迭盖基因组侧翼和插入 DNA 连接区的 FRET 寡聚核苷酸探针。在存在热稳定聚合酶和 dNTP 的情况下, FRET 探针和 PCR 引物 (一个引物在插入的 DNA 序列中和一个在侧翼基因组序列中) 进行循环。FRET 探针的杂交导致 FRET 探针上荧光部分从淬灭部分裂解和释放。荧光信号指示由于成功的扩增和杂交导致的侧翼/转基因

因插入序列的存在。

如 Tyangi 等所述 (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996), 已经描述了用于序列检测的 Molecular Beacons。简要地说, 设计于迭盖基因组侧翼和插入那些 DNA 连接的 FRET 寡聚核苷酸探针。该 FRET 探针的独特的结构造成其包含二级结构, 该二级结构使荧光和淬灭部分保持邻近。在存在热稳定聚合酶和 dNTP 的情况下, FRET 探针和 PCR 引物 (一个引物在插入的 DNA 序列中和一个在侧翼基因组序列中) 进行循环。在成功的 PCR 扩增之后, FRET 探针对目标序列的杂交导致探针二级结构的消除和荧光部分与淬灭部分的空间隔离, 产生荧光信号。荧光信号指示了由于成功的扩增和杂交导致的侧翼/转基因插入序列的存在。

翦股颖事件 ASR-368 是对草甘膦除草剂耐受的, 作为草皮草植被是有用的。可用于私人 and 公共场所培养草皮草植被。好的草皮草植被, 或绿地, 兼备美观和实用性; 对于高尔夫球、网球、棒球、足球及其他体育设施它的维护是一种昂贵的和专业化的程序。翦股颖 ASR-368 事件作为高尔夫球场上生长的草皮草植被是特别有用的。高尔夫球场有多种草皮草植被草皮草组分, 其形成球洞。这些组分包括开球区、球道、障碍区和绿地。当将事件 ASR-368 用作草皮草时可提供通过使用包含草甘膦的除草剂有效地控制杂草, 从而便于管理的草皮草植被。包含翦股颖事件 ASR-368 的草皮草植被是本发明的一个方面, 鉴于 ASR-368 草皮草植被是高尔夫球场的组分, 该组分也是本发明的一个方面。本发明的草皮草植被优选的包含 50% 或以上组分的翦股颖事件 ASR-368, 更优选的 75% 组分, 更进一步优选的大于 90% 组分。

以下实施例用于说明本发明的某些优选的方案。那些本领域的技术人员应当了解, 在实例中公开的技术代表发明人已验证的可在实践本发明中充分发挥其功能的方法, 因此可以被认为是实施本发明的优选实施例。然而, 本领域的技术人员根据当前公开的内容应当理解, 可以在公开的特定的方案中进行许多变化, 在不背离本发明的主旨和范围的情况下仍获得相象的或类似的结果。

实施例

实施例 1

通过利用来源于(图1)包含本发明的转基因插入物的 pMON25496 的线性 HindIII DNA 片段对藜股颖系 B99061R/990028 进行微弹轰击, 产生转基因的藜股颖事件 ASR-368。该 DNA 片段包含两个转基因表达盒, 共同赋予藜股颖 ASR-368 植物对草甘膦的耐受性。第一个表达盒由水稻肌动蛋白 1 启动子和内含子 (P-Os. Act1, 也被称为 P-ract, 和内含子 I-Os. Act1, 也被称为 ract 内含子, 美国专利 NO. 5,641,876) 组成, 可操作的连接到拟南芥 (*Arabidopsis*) EPSPS 叶绿体转运肽 (TS-At. EPSPS: CTP2, 也称为 ctp2, Klee 等, Mol. Gen. Genet. 210: 47-442, 1987), 可操作的连接到来自土壤杆菌菌株 CP4 (AGRTU. aroA: CP4 EPSPS, 也称 as cp4, 美国专利 NO. 5,633,435) 的草甘膦耐受的 5-烯醇-丙酮基莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS), 和可操作的连接到胭脂氨酸合酶转录终止子 (T-nos, 也称作 NOS 3', Fraley 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-4807, 1983)。第二转基因表达盒包含串联重复的增强子区域的花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (P-CaMV. 35S, 也被称为 P-e35S, Kay 等 Science 236: 1299-1302, 1987; 美国专利 NO. 5,164,316), 可操作的连接到玉米 (*Zea Mays*) Hsp70 内含子 (I-Zm. Hsp70, 也称为 ZmHSP70 内含子, 美国专利 No. 5,362,865), 可操作的连接到拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽 (TS-At. EPSPS: CTP2), 可操作的连接到来自土壤杆菌菌株 CP4 (AGRTU. aroA: CP4 EPSPS) 的草甘膦耐受的 5-烯醇-丙酮基莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS), 和可操作的连接到胭脂氨酸合酶转录终止子 (T-nos, Fraley 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-4807, 1983)。已经展示了 DNA 构建体 pMON25496 赋予转基因玉米草甘膦耐受性 (US 20020013960 A1)。在轰击后, 在包含 3 mM 草甘膦的培养基上选择草甘膦耐受的转基因愈合组织, 随后再生植物。生产出转基因事件, 根据特性的优势综合, 包括草甘膦耐受性、农学性能、和单转基因插入, 挑选出事件 ASR-368。在 ASR-368 中发生的转基因插入如图 2 所示。

实施例 2

测试草甘膦耐受的藜股颖事件 ASR-368 对草甘膦植物损伤的耐受性。草甘膦耐受的藜股颖事件 ASR-368 对于用手动喷雾器喷雾的

5%Roundup® Pro (包含草甘膦的除草剂配方)或相当于每英亩 128 盎司 Roundup® Pro 的数量没有显示受损。标准推荐的比率是 1.25 到 2.5%Roundup® Pro 或相当于每英亩 32 到 64 盎司 Roundup® Pro 的数量。在生长季节期间,初夏、仲夏和早秋,施用三次包含草甘膦的除草剂配方来检测经受事件 ASR-368 的草皮草植被的草甘膦耐受性。藜股颖事件 ASR-368 在三个检测点显示了对施用的全部草甘膦的耐受性。对事件 ASR-368 没有观察到植物损伤,而不包含 pMON25496 的藜股颖植物经过包含草甘膦的除草剂配方处理全部严重的损伤或被杀死。用包含草甘膦的除草剂处理作为草皮草植被的草皮草组分的藜股颖 ASR-368 是在草皮草植被中控制杂草及其他不需要的植物的有用的方法。

实施例 3

邻近转基因插入物的 5'和 3'基因组区域的 DNA 序列通过利用 Clontech 的 Universal Genome Walker™试剂盒和 RAGE 法(基因组 DNA 末端的快速扩增)分离 DNA 分子来确定。通过用 HindIII 在 37℃ 消化过夜从藜股颖 ASR-368 基因组 DNA 中分离出 5'转基因/基因组 DNA (图 3)、用 XbaI 在 37℃ 消化 pBluescript KS 质粒(Stratagene, La Jolla CA) 3 小时。将四个核苷酸碱基突出端用两个核苷酸补平以适合于连接。通过在适当条件下与 T4 DNA 连接酶一起孵育,使基因组 DNA 与用 XbaI 消化的、2 个核苷酸碱基补平的 pBluescript KS 质粒连接。在连接反应之后,将 5 μl 的连接混合物用于 DNA 扩增法,使用 2 μl 10 μM M13 正向引物 (SEQ ID NO: 5)、2 μl 10 μM ASR-368 转基因特异的寡聚核苷酸引物 (SEQ ID NO: 6), 1.75 μl 10mM 脱氧核糖核苷酸, Expand Long Template PCR System (Roche) 和水至 50 μl。首轮反应在热循环仪中以下循环条件进行: 94℃ 2 分钟 30 个循环; 每次 94℃ 10 秒; 56℃ 30 秒; 68℃ 3 分钟和最后 68℃ 10 分钟。在第二反应中扩增 1 μl 的首轮反应物, 包括 2 μl 10 μM T7 引物 (SEQ ID NO: 7), 2 μl ASR-368 特异性的引物 (SEQ ID NO: 8), 1.75 μl 10mM 脱氧核糖核苷酸, Expand Long Template PCR 系统 (Roche) 和加水至 50 μl, 热循环条件与初级反应使用的相同。

通过 PCR 证实藜股颖样品中转基因/基因组 DNA 的存在。利用一个

引物 (SEQ ID NO: 11) 配合第二引物 (SEQ ID NO: 12) 生产出 5' 转基因/基因组连接区扩增子, 前一引物被设计为相应于插入的转基因 DNA 5' 端的侧面的基因组 DNA 序列, 第二引物在插入的转基因 DNA 的水稻肌动蛋白 1 启动子中. 5' 连接扩增子通过以约 50ng 叶子基因组 DNA (1 μ l) 作为模板, 15pmol 每个引物 (各 1.5 μ l) 和 Expand High Fidelity PCR 系统在 50 μ l 反应体积中产生. 扩增反应在以下循环条件下进行: 94 $^{\circ}$ C 2 分钟进行 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟进行 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 每循环加额外的 5 秒进行 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 分钟进行 1 个循环.

在另一个方法中, 从莴苣颖事件 ASR-368 分离相应的转基因/基因组 DNA 分子也可以如 Genome Walker™ 试剂盒中描述的 (目录 # K1807-1, CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA) 利用连接的接头和嵌套 PCR 来完成. 首先, 用 CTAB 纯化法 (Rogers 等, Plant Mol. Biol. 5: 69-76, 1985) 从 ASR-368 事件分离基因组 DNA. 根据制造商的说明 (Genome Walker™, CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA) 制备用于扩增的基因组 DNA 库. 在独立的反应中, 基因组 DNA 用平头末端限制性核酸内切酶在 37 $^{\circ}$ C 消化过夜 (CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA). 用苯酚: 氯仿提取反应混合物, 向水相添加乙醇沉淀 DNA, 通过离心作用颗粒化, 然后重悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) 中. 根据制造商的说明将纯化的平头末端基因组 DNA 片段连接到 Genome Walker™ 接头上. 连接之后, 热处理 (70 $^{\circ}$ C 5 分钟) 每个反应来终止反应, 然后在 Tris-EDTA 缓冲液中稀释 10 倍. 1 μ l 各连接物在 50 μ l 反应中进行扩增, 包括 1 μ l 各接头-连接的库、1 μ l 10 μ M Genome Walker™ 接头引物 AP1 (SEQ ID NO: 9, 制造商提供)、1 μ l 10 μ M 事件 ASR-368 转基因特异性的寡聚核苷酸 (SEQ ID NO: 12)、1 μ l 10mM 脱氧核糖核苷酸、2.5 μ l 二甲基亚砜、5 μ l 10X 包含 MgCl₂ 的 PCR 缓冲液、0.5 μ l (2.5 单位) Amplitaq 热稳定 DNA 聚合酶 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 加 H₂O 至 50 μ l. 在热循环仪中利用计算的温度控制和下列循环条件进行反应: 95 $^{\circ}$ C 9 分钟 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 2 秒, 70 $^{\circ}$ C 3 分钟进行 7 个循环; 94 $^{\circ}$ C 2 秒, 65 $^{\circ}$ C 3 分钟进行 36 个循环; 65 $^{\circ}$ C 4 分钟进行 1 个循环. 1 μ l 的每个首轮反应物用 50

倍水稀释，在第二反应中扩增（ $1\mu\text{l}$ 各稀释的首轮反应物， $1\mu\text{l}$ $10\mu\text{M}$ Genome Walker™嵌套接头引物 AP2，（SEQ ID NO: 10，由制造商提供）， $1\mu\text{l}$ $10\mu\text{M}$ 事件 ASR-368 转基因特异性的嵌合寡聚核苷酸（SEQ ID NO: 12）， $1\mu\text{l}$ 10mM 脱氧核糖核苷酸， $2.5\mu\text{l}$ 二甲基亚砜， $5\mu\text{l}$ 包含 MgCl_2 的 10X PCR 缓冲液， $0.5\mu\text{l}$ （2.5 单位）Amplitaq 热稳定的 DNA 聚合酶（PE Applied Biosystems, Foster City, CA）加 H_2O 到 $50\mu\text{l}$ ），使用以下循环条件： 95°C 9 分钟 1 个循环； 94°C 2 秒， 70°C 3 分钟 5 个循环； 94°C 2 秒， 65°C 3 分钟 24 个循环； 65°C 4 分钟 1 个循环。

PCR 产物，代表跨越了在藜股颖事件 ASR-368 转基因插入物和邻近的侧翼藜股颖基因组 DNA 序列之间的连接的 5' 区域，通过琼脂糖凝胶电泳纯化，然后利用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒（目录 #28704, Qiagen Inc., Valencia, CA）从琼脂糖基块上分离，直接克隆到 pGEM-T Easy 载体（目录 #A1360, Promega, Madison, WI）中。通过 DNA 序列分析（ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA 和 DNASTAR 序列分析软件, DNASTAR Inc., Madison, WI）确认克隆的 PCR 产物与用来生产藜股颖 ASR-368 的 pMON25496 的 HindIII 片段的同一性和关系。5' 基因组/转基因区域 DNA 分子的 DNA 序列如图 3 所示。通过用下划线的 DNA 序列在图 3 中进一步确认了藜股颖基因组 DNA 部分，双下划线的 DNA 序列是与 PCR 引物分子同源或互补的 DNA 序列，对包含 SEQ ID NO: 3 的藜股颖基因组的确认是有用的。

类似地，利用第一引物（SEQ ID NO: 14）和第二引物（SEQ ID NO: 13）扩增了藜股颖事件 ASR-368 3' 侧翼基因组 DNA 序列（图 4），前一引物被设计为位于转基因插入物 3' 端侧面的基因组 DNA 序列，第二引物位于 pMON25496 中包含的 T-nos 3' 转录终止区域。利用约 211ng 叶子基因组 DNA（ $1\mu\text{l}$ ）作为模板， 15pmol 每个引物（各 $1.5\mu\text{l}$ ）和 Expand Long Template PCR 系统（Roche）在 $50\mu\text{l}$ 反应体积中进行 PCR。在以下循环条件下进行反应的扩增： 94°C 2 分钟 1 个循环； 94°C 10 秒， 60°C 30 秒， 68°C 30 秒 35 个循环； 68°C 10 分钟 1 个循环。

通过对 GenomeWalker™衍生的扩增产物进行测序并与已知的转基因序列比对，位于转基因插入物的两侧的藜股颖基因组 DNA 序列被确

定为事件 ASR-368。对转基因插入位点的 5'区域测序, 该区域包含插入连接周围的 896 核苷酸碱基对(bps)的转基因/基因组 DNA 序列(SEQ ID NO: 3)。该 DNA 序列由 637 bps 的侧翼蕞股颖基因组序列 (SEQ ID NO: 3 的 1-637 位核苷酸) 和 259bps 的来自 P-0s.Act1 5'端的序列 (SEQ ID NO: 3 的 638-896 位核苷酸) 组成, 如图 3 所示。

DNA 序列被确定为 3'插入连接周围的 474 bps 片段 (SEQ ID NO: 4), 其来自具有 T-nos 转录终止子的 248 bps 的 5'端 (SEQ ID NO: 4 的 1-248 位核苷酸), 剩余序列由位于整合位点侧面的蕞股颖基因组 DNA 序列 (相应于 SEQ ID NO: 4 的 249-474 位碱基) 组成, 如图 4 所示。双下划线的 DNA 序列是与 PCR 引物分子同源或互补的 DNA 序列, 对包含 SEQ ID NO: 4 的蕞股颖基因组的鉴别是有用的。

连接序列, SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 (图 5) 是来自事件 ASR-368 的新的 DNA 序列, 对于检测蕞股颖植物事件 ASR-368 和它的子代是有价值的。在 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中的连接序列包含转基因序列片段的插入位点的两侧的多核苷酸和蕞股颖基因组 DNA。连接序列 SEQ ID NO: 1 在 SEQ ID NO: 3 的 626-649 位的核苷酸、转基因插入位点的 5'区域。连接序列 SEQ ID NO: 2 位于 SEQ ID NO: 4 置 236-259 位的核苷酸、转基因插入位点的 3'区域。每个连接序列都可用作 DNA 探针和引物, 来特异地鉴定事件 ASR-368 的基因组 DNA。

实施例 4

DNA 事件引物对用于生产对蕞股颖事件 ASR-368 有检测价值的扩增子。对 ASR-368 有检测价值的扩增子包含至少一个连接序列, SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2。将产生对蕞股颖 ASR-368 有检测价值的扩增子的 ASR-368 事件引物对, 包括但不限于, 包括事件引物 1 (SEQ ID NO: 11) 和事件引物 2 (SEQ ID NO: 12) 的引物对, 其提供 5'扩增子 DNA 分子, 和引物对 SEQ ID NO: 13 和 SEQ NO: 14, 其在表 1 列出的方案中代替引物 1 和引物 2 生产 3'扩增子 DNA 分子。除这些引物对之外, 来源于 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的、在 DNA 扩增反应产生对蕞股颖事件 ASR-368 有检测价值的扩增子的任何引物对都是本发明的一个方面。包含 SEQ ID NO: 3 的 11 个连续核苷酸或其互补物的任何单个分离的 DNA 多核苷酸引物分子, 都是对生产对蕞股颖事件 ASR-368

有检测价值的扩增子 DNA 的扩增方法有用的, 是本发明的一个方面。包含 SEQ ID NO: 4 的 11 个连续核苷酸或其互补物的任何单个分离的 DNA 多核苷酸引物分子, 其是对生产对藜股颖事件 ASR-468 有检测价值的扩增子的 DNA 扩增方法有用的, 是本发明的一个方面。用于这些分析的扩增条件在表 1 和表 2 中说明, 然而, 对这些利用 DNA 引物生产对藜股颖事件 ASR-368 有检测价值的方法的任何修改都在本领域普通技术人员的范围内。检测上有价值的扩增子包含至少一个转基因/基因组连接 DNA (SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2)。

对事件 ASR-368 植物组织样品的分析应包括来自事件 ASR-368 的阳性组织对照、来自非事件 ASR-368 的藜股颖植物的阴性对照, 和不包含藜股颖 DNA 的阴性对照。额外的引物序列可以由对 DNA 扩增方法熟练的技术人员从 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 中选择, 为生产扩增子选用的条件可以是表 1 和表 2 所示的条件或与之不同的条件, 只要可产生对事件 ASR-368 有检测价值的扩增子即可。对表 1 和表 2 的方法有修改的 DNA 引物序列的使用在本发明的范围之内。通过至少一个来源于 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的 DNA 引物序列生产的、对 ASR-368 有检测价值的扩增子是本发明的一个方面。

包含至少一个来源于 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 的引物、用于 DNA 扩增方法可产生对藜股颖 ASR-368 有检测价值的扩增子的 DNA 检测试剂盒, 是本发明的一个方面。通过至少一个来源于 pMON25496 的任何遗传元件的引物序列生产的、对 ASR-368 有检测价值的扩增子是本发明的一个方面。藜股颖植物或种子是本发明的一个方面, 其中当使用 DNA 扩增方法检测以从所述藜股颖植物或种子中扩增 DNA 分子时, 其基因组能产生对藜股颖事件 ASR-368 有检测价值的扩增子。对 ASR-368 扩增子的分析可通过利用如表 2 所示的 Stratagene Robocycler、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪, 或通过本领域技术人员所知的方法和设备来进行。

表 1. 用于鉴定莠股颖事件 ASR-368 5'转基因插入物/基因组连接区的 PCR 程序和反应混合物条件。

步骤	试剂	数量	备注
1	无核酸酶的水	添加至终体积 20 μ l	-
2	10X 反应缓冲液 (有 $MgCl_2$)	2.0 μ l	缓冲液终浓度 1X, $MgCl_2$ 的终浓度 1.5mM
3	10mM dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 溶液	0.4 μ l	每种 dNTP 的终浓度 200 μ M
4	事件引物 1 (SEQ ID NO:11) (悬浮于 1 \times TE 缓冲液或无核酸酶的水中, 浓度 10 μ M)	0.4 μ l	终浓度 0.2 μ M
5	事件引物 2 (SEQ ID NO:12) (悬浮于 1 \times TE 缓冲液或无核酸酶的水中, 浓度 10 μ M)	0.4 μ l	终浓度 0.2 μ M
6	无 RNase、DNase (500ng/ μ l)	0.1 μ l	50ng/反应
7	RED Taq DNA 聚合酶 (1 单位/ μ l)	1.0 μ l (推荐在下一步骤前更换移液管)	1 单位/反应
8	提取的 DNA (模板): <ul style="list-style-type: none"> • 需分析的样品 *单独的叶 *叶的集合 (最大 50 叶/集合) • 阴性对照 • 阴性对照 • 阳性对照 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-200ng 基因组 DNA • 200ng 基因组 DNA • 50ng 莠股颖基因组 DNA (非 ASR-368) • 无模板 DNA • 50ng ASR - 368 基因组 DNA 	-

表 2. 对不同热循环仪建议的 PCR 参数

轻轻地混合，和如果必要（热循环仪上没有加热盖），在每个反应上添加 1-2 滴矿物油。利用以下循环参数在 Stratagene Robocycler、MJEngine、Perkin-Elmer 9700、或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪上进行 PCR。

注意：MJ Engine 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪应按计算的模式运行。将变温速度（ramp speed）设定在最大值运行 Perkin-Elmer 9700 热循环仪。

循环数	装置：Stratagene Robocycler
1	94℃ 3 分钟
38	94℃ 1 分钟 60℃ 1 分钟 72℃ 1 分钟和 30 秒
1	72℃ 10 分钟

循环数	装置：MJ Engine 或 Perkin-Elmer9700
1	94℃ 3 分钟
38	94℃ 10 秒 60℃ 30 秒 72℃ 1 分钟
1	72℃ 10 分钟

Monsanto 公司的保藏物，以上公开的和权利要求中所述的蕈股颖种子 ASR - 368 已经根据布达佩斯条约保藏在美国典型培养物保藏所（ATCC），10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. ATCC 保藏号是 PTA-4816，保藏日 2002 年 11 月 22 日。该保藏物将维持 30 年、或在最后一次请求后 5 年、或在本专利的有效期内，取其中期限较长的，根据需要就在该时期内进行替换。

已经说明和描述了本发明的原理，对本领域的技术人员显而易见的是，可以在安排和细节上对本发明进行修改而不背离这种原理。我们要求所有的修改都处于附加的权利要求的精神和范围内。

在本说明书中引用的所有出版物和公开的专利文件在此通过引证来引入，其程度如同特定的或单独的指示通过引证来引入各单独的出版物或专利申请。

- <110> Guo, Xiaoli
Harriman, Robert
Lee, Lisa
Nelson, Erick
- <120> 剪股颖事件 ASR-368 和组合物及其检测方法
- <130> 11899.0236.PCUS00
- <150> 60/431153
<151> 2002-12-05
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> 5' 转基因/基因组连接 DNA, 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA
- <400> 1
gacatatgct taagaagaga gtcg 24
- <210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> 3' 转基因/基因组 DNA 连接, 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA

 <400> 2
 aattcggtag catgtaccac gaac 24

 <210> 3
 <211> 896
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(896)
 <223> 5' 转基因/基因组区, 剪股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA

 <400> 3
 aagcgagtat cctgataaga aaggaagaag acgatcgctc tgtctatggg cggggctcag 60
 ggcgacgaca gaaccagagc tttcgtcgtg aacaaaacag ggaaggacca aagcagagga 120
 agaggagagg aaacagagag aaagaggggg ttggtagta cttggtggtc cctgctaact 180
 ctccaacagc agcagaaagg aaagaagaac gaaccaagge acaagtaagc tccaaccgag 240
 ccatcccttt cttcccttta tcattgactt taatcatgag aaatctaatt aattaattaa 300
 actctacgca aaaggcatat aaaattgtca attatgcaag gcagttgccc tgtttctggt 360
 agccggttac aacacaggaa gacaacaaaa agcgtcggaa aagtgagttt agtogaatct 420
 gaattcaatg tgaagatgtt ttgtaaagaa tgaataaat cccgataaaa aaagaatgaa 480
 caaaaggaaa ctaaaaaact gtggatgtga gtccaacggt taagcatatc gatgcaaacg 540
 tgatgaagaa ccaaacgcgc cggcggaaga cggattcccg gaagacaaa ttaaagaaga 600

tagttgtoga gcaaacgacc aaaagaagaa gatccgacat atgettaaga agagagtcgg 660
gatagtccaa aataaaacaa aggtaagatt acctggtaa aagtgaaaac atcagttaa 720
agggtgtata aagtaaaata toggtaataa aagggtggccc aaagtgaaat ttactctttt 780
ctactattat aaaaattgag gatgtttttg tcggtacttt gatacgtcat ttttztatga 840
attggttttt aagtttattc gcttttggaa atgcatactt gtatttgagt egggtt 896

<210> 4

<211> 474

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 藜股颖基因组 DNA 和转基因插入 DNA 的嵌合 DNA

<400> 4

agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt gaattacgtt 60
aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt 120
agagtccegc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aatatagcg cgcaaactag 180
gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg ttactagatc ggggatatcc ccggggaatt 240
cggfaccatg taccacggaa cagaaaaaag aaaggcccac ggttgtgcag gaaacggcca 300
ccgcgcgagc cagcgcctca cgcctcatcc gccattccgt cgagcaccce gcacgcgcgcg 360
ccgtgctat gctcctccgg ccgcgccct tctcctcca ggtcctcag ccgcttccgt 420
ctcccgcgc ccccctcgcg gtccgcgcga cgtctcage gcacgcgcgc gcag 474

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 噬菌体 M13

<400> 5

cgccagggtt ttcccagtea cga

23

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 DNA 引物分子

<400> 6

tgacgtatca aagtaccgac aaaaacatcc

30

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 噬菌体 T7

<400> 7

taatacgact cactataggg cga

23

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 葡萄剪股颖

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> ASR-368 基因组 DNA 引物分子

<400> 8

cctttgtttt attttgact atcccgaetc

30

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

- <220>
 <223> 合成的引物分子 AP1
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> 来自 Genome Walker 的人工引物分子 AP1
- <400> 9
 agattgaatc ctggtgcgg tcttgc 26
- <210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成的引物分子 AP2
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> 来自 Genome Walker 的人工引物分子 AP2
- <400> 10
 gcggtgcat ctatgttact agatcggg 28
- <210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 葡萄剪股颖
- <400> 11
 aagcgagtat cctgataaga aaggaagaa 29
- <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 籼稻

<400> 12	
aaccggactc aaatacagat atgcatttcc	30
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 根癌农杆菌	
<400> 13	
agattgaate ctggtgaggt ctgca	25
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 匍匐剪股颖	
<400> 14	
ctgcggggc gtgcgctgag a	21

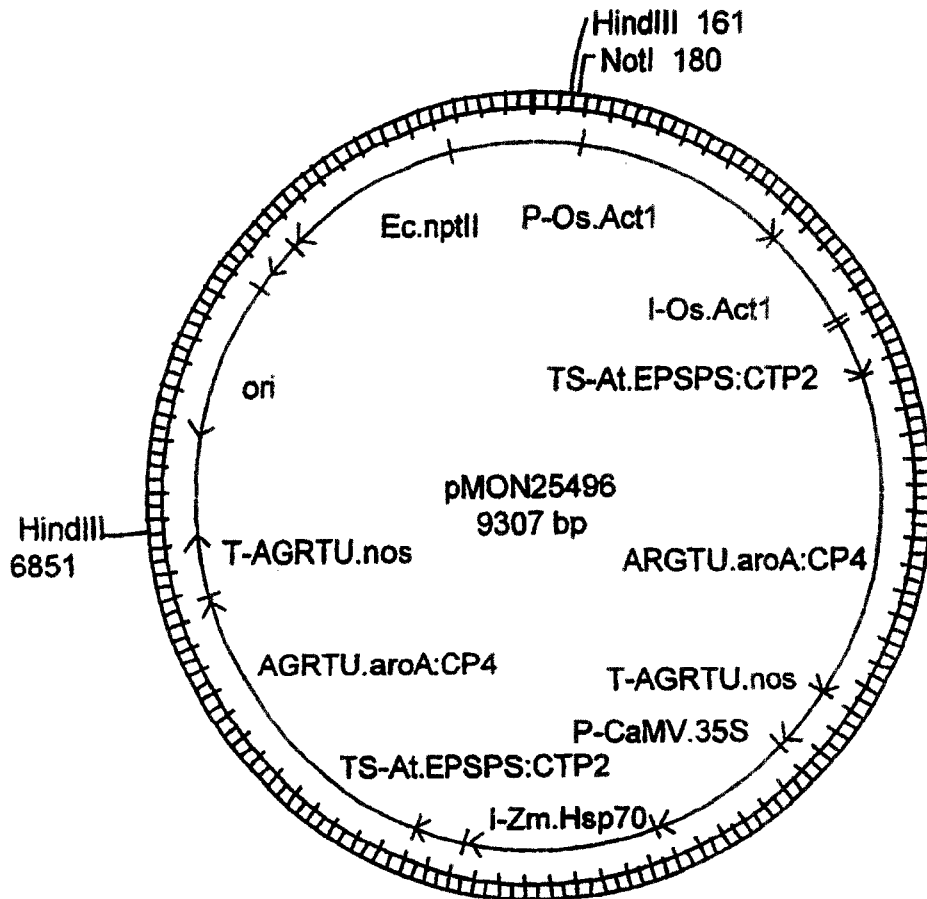


图 1

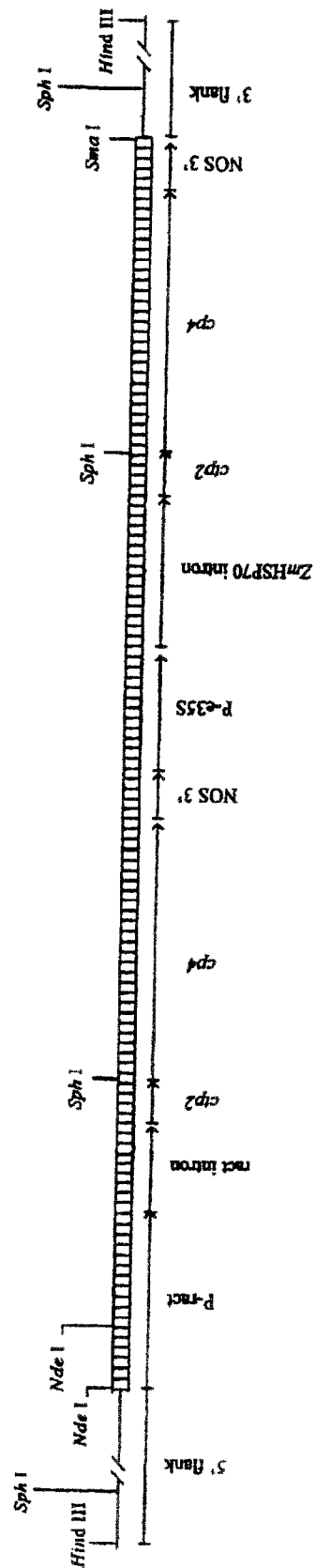


图 2

1 aagcgaat cctgATAAGA AAGGAAGAAG ACGATCGCTC TGTCTATGGG
51 CGGGGCTCAG GGCGACGACA GAACCAGAGC FTTCGTCGTG AACAAAACAG
101 GGAAGGACCA AAGCAGAGGA AGAGGAGAGG AAACAGAGAG AAAGAGGGGG
151 TTGGTAGGTA CTTGGTGGTC CCTGCTACTT CTCCAACAGC AGCAGAAAGG
201 AAAGAAGAAC GAACCAAGGC ACAAGTACGC TCCAACCGAG CCATCCCTTT
251 CTTCCCTTTA TCATTGACTT TAATCATGAG AAATCTAATT AATTAATTAA
301 ACTCTACGCA AAAGGCATAT AAAATTGTCA ATTATGCAAG GCAGTTGCCC
351 TGTTTCTGGT AGCCGGTTAC AACACAGGAA GACAACCAA AGCGTCGGAA
401 AAGTGAGTTT AGTCGAATCT GAATTC AATG TGAAAGATTT TTGTAAAGAA
451 TGAAATAAAT CCCGATAAAA AAAGAATGAA CAAAAGGAAA CTAAAAAACT
501 GTGGATGTGA GTCCAACGTT TAAGCATATC GATGCAAACG TGATGAAGAA
551 CCAACGCGC CGGCGGAAGA CGGATCCCG GAAGACCAA TTAAAGACGA
601 TAGTTGTCGA GCAAACGACC AAAAGAAGAA GATCCGACAT ATGCTTAAGA
651 AGAGAGTCGG GATAGTCCAA AATAAAACAA AGGTAAGATT ACCTGGTCAA
701 AAGTGAAAAC ATCAGTTAAA AGGTGGTATA AAGTAAAATA TCGGTAATAA
751 AAGGTGGCCC AAAGTGA AAT TTACTCTTTT CTACTATTAT AAAATTGAG
801 GATGTTTTTG TCGGTACTTT GATACGTCAT TTTTGTATGA ATTGGTTTTT
851 AAGTTTATTC GCTTTTGGAA ATGCATATCT GTATTTGagt caaat

图 3

1 agattgaatc ctGTTGCCGG TCTTGGGATG ATTATCATAT AATTTCTGTT
51 GAATTACGTT AAGCATGTAA TAAFTAACAT GTAATGCATG ACGTTATTTA
101 TGAGATGGGT TTTTATGATT AGAGTCCCGC AATTATACAT TTAATACGCG
151 ATAGAAAACA AAATATAGCG CGCAAACACTAG GATAAATTAT CGCGCGCGGT
201 GTCATCTATG TTAGTAGATC GGGGATATCC CCGGGGAATT CGGTACCATG
251 TACCACGGAA CAGAAAAAAG AAAGGCCAC GGTGTGCAG GAAACGGCCA
301 CCGCGGAGC CAGCGCCTCA CGCCTCATCC GCCATTCCGT CGAGCACCCC
351 GCACGCGCCG CCGCTGCTAT GCTCCTCCGG CCGCGCCCCT TCCTCTCCA
401 GGTCTCAGC CCGCTTCGCT CCTCCCGCGC CCCCTCGCG GTCCGCGCA
451 CGCTCTCAGC gcacgcccgc gcag

图 4

5' GACATATGCTTAAGAAGAGAGTCG 3' (SEQ ID NO:1)
5' AATTCGGTACCATGTACCACGAAC 3' (SEQ ID NO:2)

图 5