



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012126088/10, 24.11.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.11.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.11.2009 US 61/263,950;
23.04.2010 US 61/327,369

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2013 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 27.01.2016 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US2008076177 A1, 27.03.2008.
US2006127889 A1, 15.06.2006. WO2007053482 A2, 10.05.2007. FRANKEL AE et al., Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor, Protein Eng, 2000, Vol.13, N.8, pp.575-581. RU 2270254 C2, 20.02.2006.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 25.06.2012

(86) Заявка РСТ:
US 2010/057967 (24.11.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/066360 (03.06.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(54) ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ААД-12-СОБЫТИЯ 416 У СОИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к способу определения зиготности растения сои, включающего арилоксиалканоатдиоксигеназу (AAD-12) с SEQ ID NO: 1, где указанное растение содержит трансгенную конструкцию, включающую ген AAD-12, состоящий из остатков 2731-9121 SEQ ID NO: 1, и указанная трансгенная конструкция фланкирована 5'-фланкирующей геномной ДНК

(72) Автор(ы):

НОВАК Стефан (US),
ЦУЙ Юнсинь Кори (US),
ГРИН Томас У. (US),
ЧЖОУ Нин (US)

(73) Патентообладатель(и):
ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЭлЭлСи (US)

C 2
8
9
3
7
3
2
U

R
U

2 5 7 3 8 9 8

C
2

сои и 3'-фланкирующей геномной ДНК сои, где указанная 5'-фланкирующая геномная ДНК содержит остатки 1-2730 SEQ ID NO: 1, указанная 3'-фланкирующая геномная ДНК содержит остатки 9122-10212 SEQ ID NO: 1, а также к комплексу для его выполнения. Изобретение позволяет эффективно определять зиготность растения сои, включающего арилоксиалканоатдиоксигеназу(AAD-12). 2 н. и

15 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл., 1 пр.

Р У 2 5 7 3 8 9 8 С 2

Р У 2 5 7 3 8 9 8 С 2



(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012126088/10, 24.11.2010

(24) Effective date for property rights:
24.11.2010

Priority:

(30) Convention priority:
24.11.2009 US 61/263,950;
23.04.2010 US 61/327,369

(43) Application published: 27.12.2013 Bull. № 36

(45) Date of publication: 27.01.2016 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 25.06.2012

(86) PCT application:
US 2010/057967 (24.11.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/066360 (03.06.2011)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

NOVAK Stefen (US),
TsUJ Junsin' Kori (US),
GRIN Tomas U. (US),
ChZhOU Nin (US)

(73) Proprietor(s):

DAU AGROSAJENSIZ EhlehlSi (US)

C 2

8

9

6

8

3

7

2

R U

R U

2 5 7 3 8 9 8

C 2

(54) DETECTING OF AAD-12-EVENT 416 AT SOY

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to the method of identification of zygosity of the plant soy containing aryloxy alkanoate dioxygenase (AAD-12) with SEQ ID NO: 1 where the named plant contains the transgene construction containing AAD-12 gene consisting of the residues of 2731-9121 SEQ ID NO: 1, and the named transgene construction is flanked by 5'-flanking genomic DNA of soy and 3'-flanking genomic DNA of soy

where the named 5'-flanking genomic DNA contains the residue of 1-2730 SEQ ID NO: 1, the named 3'-flanking genomic DNA contains the residue of 9122-10212 SEQ ID NO: 1, and also to the package for its implementation.

EFFECT: invention allows to identify in efficient way the zygosity of the plant soy containing aryloxy alkanoate dioxygenase.

17 cl, 4 dwg, 1 tbl, 1 ex

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ген *aad-12* (первоначально из *Delftia acidovorans*) кодирует белок

арилоксиалканоатдиоксигеназу (AAD-12). Этот признак придает устойчивость к 2,4-дихлорфеноксикусной кислоте, например, и к пиридилоксиацетатным гербицидам.

5 Сам по себе ген гербицидной устойчивости у растений *aad-12* был впервые раскрыт в WO 2007/053482.

Экспрессия гетерологичных или чужеродных генов в растениях зависит от того, где гетерологичный ген встроен в хромосому. Это может быть связано со структурой хроматина (например, гетерохроматина) или близостью элементов регуляции

10 транскрипции (например, энхансеры) рядом с участком интеграции (Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988), например. Один и тот же ген в одном и том же типе трансгенного растения (или другого организма) может демонстрировать большой разброс в уровне экспрессии среди различных трансгенных событий. В пространственной или временной структуре экспрессии также могут быть различия. Например, различия 15 в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растения могут не соответствовать профилям, ожидаемым от элементов регуляции транскрипции, присутствующих в конструкции введенного гена.

Таким образом, большое число событий зачастую создается и подвергается скринингу для того, чтобы идентифицировать событие, при котором представляющий интерес

20 введенный ген экспрессируется на уровне, удовлетворительном для поставленной задачи. Для коммерческих целей, общим является производство от сотен до тысяч различных событий и скрининг этих событий ради единственного события, которое обладает нужными уровнями и профилями экспрессии трансгена. Событие, которое обладает нужными уровнями и/или профилями трансгенной экспрессии, полезно для 25 интродукции трансгена в другие генетические окружения при помощи полового ауткрессинга, используя традиционные способы размножения. Потомство таких скрещиваний поддерживает характеристики экспрессии трансгена исходного трансформанта. Эта стратегия используется для обеспечения надежной экспрессии генов в ряде сортов, которые хорошо адаптированы к местным условиям выращивания.

30 Для детектирования наличия события в образце растительной ткани можно использовать различные прототипные способы. Одним из примеров является методика пиросеквенирования, как описано в Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00: 18-24, 2000). В этом способе создается олигонуклеотид, который перекрывает участок соединения прилегающей геномной ДНК и ДНК вставки. Олигонуклеотид гибридизуют с

35 одноцепочечным ПЦР-продуктом из представляющего интерес района (один праймер во встраиваемой последовательности и один во фланкирующей геномной последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденоzin-5'-фосфосульфата и люциферина. ДНТФ добавляют индивидуально, и включение приводит к световому сигналу, который можно

40 измерить. Световой сигнал указывает на наличие трансгенной вставки/фланкирующей последовательности в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно или несколько оснований. (Эта методика обычно используется для первоначального секвенирования, а не для детектирования специфического гена в случае, когда он известен.)

45 Флуоресцентная поляризация представляет собой еще один способ, который может быть использован для детектирования ампликонов. В соответствии с этим способом, создается олигонуклеотид для перекрытия участка соединения геномной фланкирующей ДНК и ДНК вставки. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным ПЦР-продуктом

из представляющего интерес района (один праймер во встаиваемой ДНК и один во фланкирующей геномной последовательности ДНК) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы и флуоресцентно-меченых дДНТФ. Удлинение на одно основание приводит к включению дДНТФ. Включение можно определить с помощью флуорометра как изменение в поляризации. Изменение в поляризации показывает наличие трансгенной вставки/фланкирующей последовательности в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно основание.

Были описаны молекулярные маяки для использования при детектировании последовательностей. Вкратце, создают олигонуклеотидный зонд FRET, который накладывается на участок соединения фланкирующей геномной ДНК и ДНК вставки. Уникальная структура зонда FRET приводит в результате к наличию вторичной структуры, которая поддерживает флуоресцентную и гасящую части в непосредственной близости. Зонд FRET и ПЦР-праймеры (один праймер в последовательности ДНК вставки и один во фланкирующей геномной последовательности) циркулируют в присутствии термостабильной полимеразы и дДНТФ. После успешной ПЦР-амплификации гибридизация зонда FRET с последовательностью-мишенью приводит к устраниению вторичной структуры зонда и пространственному разделению флуоресцентной и гасящих частей. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей геномной/трансгенной встроенной последовательности в результате успешных амплификаций и гибридизации.

Анализ с использованием гидролиза зонда, известный также как TAQMAN (Life Technologies, Фостер-Сити, Калифорния), представляет собой способ детектирования и количественного определения присутствия последовательности ДНК. Вкратце, олигонуклеотидный зонд FRET создают с одним олиго в трансгенной и одним во фланкирующей геномной последовательности для события-специфического детектирования. Зонд FRET и ПЦР-праймеры (один праймер в последовательности ДНК вставки и один во фланкирующей геномной последовательности) циркулируют в присутствии термостабильной полимеразы и дДНТФ. Гибридизация зонда FRET приводит к отщеплению и освобождению флуоресцентной части от гасящей части зонда FRET. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей/трансгенной встроенной последовательности в результате успешных амплификаций и гибридизации.

Еще одной проблемой, среди многих, является поиск соответствующего контрольного гена для данного теста. Например, как указано в резюме Czechowski *et al.*, «Исключительно большой набор данных от исследований Affymetrix ATH1 whole-genome GeneChip послужил средством для идентификации нового поколения референсных генов с очень стабильными уровнями экспрессии в видах модельного растения *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Были найдены сотни генов *Arabidopsis*, которые превосходят традиционные референсные гены в плане стабильности экспрессии в продолжение развития и при широком диапазоне условий окружающей среды». (Czechowski *et al.* (2005) Genome - wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5-17.)

Работа Brodmann *et al.* (2002 г.) относится к количественному ПЦР в реальном времени для детектирования содержания генетически модифицированной кукурузы в пищевых продуктах для четырех различных сортов кукурузы, одобренных в Европейском Союзе. Brodmann, P.D., P.D., Ilg E.C., Berthoud H., and Herrmann, A. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *J. of AOAC international* 2002 85 (3).

Работа Hernandez *et al.* (2004) приводит четыре возможных гена для использования

для ПЦР в реальном времени. Hernandez, M., Duplan, M.-N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M., and Bertheau, Y. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of Zea mays L. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4632-4637.

- 5 В работе Costa *et al.* (2007) рассмотрели эти четыре гена (также в контексте ПЦР в реальном времени) и пришли к выводу, что гены алкогольдегидрогеназы и зеина представляли собой лучшие референсные гены для определения образцового «события» (ген лектина) для выпусков трансгенных кормовых смесей. Costa, L. D., and Martinelli L. Development of a Real-Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining 10 an Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Components. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1264-1273.

В работе Huang *et al.* (2004) использовали плазмиду pMulM2 в качестве референсных молекул для детектирования трансгенов MON810 и NK603 в кукурузе. Huang and Pan, «Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time 15 Polymerase Chain Reaction Methods», *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (11), pp 3264-3268.

Работа Gasparic *et al.* (2008) предлагает LNA-технологию, из сравнения с технологией циклирования зондов, TaqMan, и различных химий ПЦР в реальном времени, для количественного анализа событий у кукурузы (таких, как MON810). Gasparic, Cankar, Zel, and Gruden, «Comparison of different realtime PCR chemistries and their suitability for 20 detection and quantification of genetically modified organisms», *BMC Biotechnol.* 2008; 8: 26.

US 20070148646 относится к способу удлинения праймера для количественного анализа, который требует контролируемого распределения отдельных нуклеотидов, которые могут быть выявлены, и количественно определены по количеству включенных нуклеотидов. Это отличается от способа TaqMan ПЦР, использующего внутренний 25 референсный ген.

Чтобы различить гомозиготный и гемизиготный генотипы TC1507, для этого события был успешно применен анализ Invader. Gupta, M., Nirunsuksiri, W., Schulenberg, G., Hartl, T., Novak, S., Bryan, J., Vanopdorp, N., Bing, J. and Thompson, S. A non-PCR-based Invader Assay Quantitatively Detects Single-Copy Genes in Complex Plant Genomes. *Mol. Breeding* 30 2008, 21, 173-181.

Работа Huabang (2009) относится к основанному на ПЦР тестированию зиготности трансгенной кукурузы. Однако, никакого референсного гена, по-видимому, не использовалось. Huabang, «An Accurate and Rapid PCR-Based Zygosity Testing Method for Genetically Modified Maize», *Molecular Plant Breeding*, 2009, Vol.7, No.3, 619-623.

35 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится, в частности, к способам детектирования события AAD-12 у сои (*Glycine max*), обозначенного DAS-68416-4, с семенами, депонированными в Американской коллекции типовых культур (ATCC) с номером доступа № PTA-10442.

Конкретнее, настоящее изобретение относится, в частности, к конечной точке TaqMan 40 ПЦР-анализу на событие AAD-12 у сои. Некоторые варианты осуществления направлены на тесты, которые пригодны для высокопроизводительного анализа на зиготность. Рассматриваемое изобретение также относится, в частности, к открытию предпочтительного референсного гена лектина для использования при определении зиготности. Эти и другие связанные с ними процедуры можно применять для 45 однозначной идентификации линий сои, содержащих событие по рассматриваемому изобретению.

Это изобретение также относится частично к селекции растений с применением любого из рассматриваемых способов. В некоторых вариантах осуществления указанное

событие/полинуклеотидная последовательность может «комплектоваться» с другими признаками, включая, например, другие ген(ы) устойчивости к гербицидам и/или белки, подавляющие насекомых. Тем не менее, рассматриваемое изобретение включает растения, имеющие одно событие, как описано в настоящем документе.

5 Кроме того, рассматриваемое изобретение предоставляет тесты для детектирования наличия рассматриваемого события в образце (сои, например). Также предоставляются комплекты и условия, пригодные при проведении тестов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1. Геномную ДНК события сои DAS-68416-4 обрабатывали EcoRV или по PvuII 10 и использовали для создания соответствующих библиотек GENOMEWALKERTM, которые были использованы в качестве матриц для амплификации последовательностей ДНК-мишеней.

Фиг.2. Схематическая диаграмма изображает положения праймеров и стратегию 15 клонирования для полноразмерного секвенирования события DAS-68416-4 у сои в направлении от 5'- к 3'-концу.

Фиг.3. Схематическая диаграмма изображает положения праймеров для подтверждения полноразмерной последовательности события DAS-68416-4 у сои в 20 направлении от 5'- к 3'-концу.

Фиг.4. Схематическая диаграмма изображает положения праймеров для 25 подтверждения последовательности участка вставки AAD-12-события DAS-68416-4 у сои.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 представляет последовательность 5' и 3'- геномных фланкирующих 25 последовательностей по обе стороны от вставки AAD-12, включая вставку.

Фланкирующие последовательности подчеркнуты.

SEQ ID NO:2-7 представляют последовательности для праймеров и зондов для 30 использования в соответствии с рассматриваемым изобретением.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Трансгенное событие AAD-12 (обеспечивающее устойчивость к гербициду) у сои 35 рDAB4468-416 генерировали путем трансформации *Agrobacterium*. Были клонированы как 5'-, так и 3'-концевые фланкирующие последовательности этой трансгенной вставки AAD-12, секвенированы и охарактеризованы, как подробно изложено в USSN 61/263950 (подано 24 ноября 2009 г.). В некоторых конкретных вариантах осуществления, AAD- 40 12 присутствует в соевых бобах как событие, обозначенное DAS-68416-4, с семенами, депонированными в Американской коллекции типовых культур (ATCC) с номером доступа №. РТА-10442, и потомстве, полученном от этого. 2500 семян было 45 депонировано в соответствии с Будапештским договором 22 октября 2009 года. Депозит был проверен 2 ноября 2009 г., и на эту дату семена были жизнеспособны.

Были созданы специфические TAQMAN-праймеры и зонды, как подробно изложено 40 в этом документе, в частности, в соответствии с последовательностями ДНК, находящимися в области соединения между трансгенной ДНК и геномной ДНК хозяина. Специфичность праймеров и зондов к событию была успешно тестирована в формате дуплекса с лектином сои в качестве референсного гена в ПЦР в реальном времени в 45 отношении различных AAD-12-событий у сои и нетрансгенного сорта сои Maverick. Процедуры TAQMAN-тестов, специфичных для конечных событий, для определения AAD-12-события у сои были получены, как подробно описано в настоящем документе.

Последовательность, охватывающая область интеграционного соединения ДНК 50 растения-хозяина и конструкции интегрированного гена в этом AAD-12-событии у сои,

представляет собой уникальную последовательность. Она была использована для разработки событие-специфического анализа (обычной ПЦР и ПЦР в реальном времени), чтобы обнаружить присутствие AAD-12-событий у сои pDAB4468-416 для ГМО-тестирования и определить состояние зиготности растений в выведенных 5 популяциях. Событие-специфический TAQMAN-тест, описанный в настоящем документе, можно использовать для обоих приложений.

Рассматриваемое изобретение предоставляет тесты для детектирования присутствия трансгенного события у сои DAS-68416-4 в образце. Аспекты рассматриваемого изобретения включают способы получения и/или продуцирования любых

10 диагностических молекул нуклеиновых кислот, приводящихся в качестве примеров или предлагающихся в настоящем документе. Линии растений, включающие это событие, можно детектировать с помощью последовательностей, раскрытых и предложенных в настоящем документе.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, это изобретение относится 15 к идентификации линий сои, устойчивых к гербицидам. Рассматриваемое изобретение относится, в частности, к детектированию присутствия рассматриваемого события для того, чтобы определить, содержит ли потомство от полового скрещивания представляющее интерес событие. Кроме того, способ детектирования события включен и является пригодным, например, для соблюдения нормативов, требующих 20 предварительного торгового утверждения и маркировки пищевых продуктов, полученных, например, из рекомбинантных сельскохозяйственных растений.

Конкретнее, событие представляет собой событие AAD-12, также называемое pDAB4468-0416. Это изобретение можно использовать для его селекции и характеристики на стабильность, и экспрессию на уровне растения в целом и на молекулярном уровне 25 от поколения к поколению.

Рассматриваемый синтетический ген (*aad-12*), используемый в соответствии с рассматриваемым изобретением, был получен из *Delftia acidovorans*, и кодирует фермент, способный дезактивировать некоторые гербициды с арилоксиалканоатной частью, включая феноксиауксин (например, 2,4-D, MCPA), а также пиридилоксиаукины 30 (например, фтороксипир, трихлопир). Ген *aad12*, контролируемый промотором *atUbi10*, был введен в линию сои Maverick посредством методологии *Agrobacterium tumefaciens*.

Рассматриваемое изобретение относится, в частности, к основанному на 35 флуоресценции конечной точки TaqMan-ПЦР тесту, использующему эндогенный ген в качестве референсного (количество копий) контроля при высокопродуктивном анализе зиготности события AAD-12 у сои. Рассматриваемое изобретение также относится, в частности, к открытию предпочтительного референсного гена, инвертазы. Несколько референсных генов были определены как возможные варианты.

Рассматриваемое изобретение также относится, в частности, к разработке 40 биплексного конечной точки TaqMan-ПЦР-анализа на зиготность, специфического для событий AAD-12 у сои. Далее, рассматриваемое изобретение относится, в частности, к разработке тест-комплекта для селекции AAD-12.

Тесты конечной точки TaqMan основаны на стратегии плюс/минус, по которой 45 «плюс» означает, что образец является положительным по анализируемому гену, а «минус» означает, что образец является отрицательным по анализируемому гену. Эти тесты, как правило, используют два комплекта олигонуклеотидов для определения трансгенной последовательности AAD-12 и последовательности генов дикого типа, соответственно, а также зонды с двойной меткой для определения содержания трансгенной последовательности и последовательности дикого типа.

Несмотря на то, что анализ Invader представляет собой мощный способ для характеристики событий, он является очень чувствительным к качеству ДНК. Кроме того, анализ требует большого количества ДНК. Invader также требует дополнительной стадии денатурации, которая в случае, если не проводится должным образом, может привести к отсутствию успеха при проведении анализа Invader. Кроме того, более длительное время тестирования при анализе Invader ограничивает гибкость его применения для того, чтобы эффективно обрабатывать большое количество образцов AAD-12-событий 416 для анализа в коммерческих задачах. Одним из главных преимуществ рассматриваемого изобретения является экономия времени и ликвидация стадии денатурации.

Рассматриваемый в конечной точке TaqMan-анализ для детектирования событий AAD-12 416 предлагает удивительные преимущества над Invader, в частности, при анализе большого числа образцов.

Определения и примеры приведены в данном документе для помощи в описании

настоящего изобретения и инструктирования специалистов в рассматриваемой области в практике изобретения. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии с общепринятым использованием теми, кто специализируется в близких областях. Для оснований ДНК используется номенклатура, как указано в Своде федеральных правил 37 CFR § 1.822.

Как используется в настоящем документе, термин «потомство» обозначает потомка любого поколения родительского плана, который содержит AAD-12-событие DAS-68416-4 у сои.

Трансгенное «событие» образуется путем трансформации растительных клеток гетерологичной ДНК, т.е., конструкцией нуклеиновых кислот, которая включает представляющий интерес трансген, восстановления популяции растений, образованных в результате встраивания трансгена в геном растений, и отбора конкретного растения, характеризующегося встройкой в определенное положение генома. Термин «событие» относится к исходному трансформанту и потомству трансформанта, которое включает гетерологичную ДНК. Термин «событие» относится также к потомству, произведенному путем полового ауткросса между трансформантом и другим сортом, которое включает геномную/трансгенную ДНК. Даже после повторного возвратного скрещивания с рекуррентным родителем, встроенная трансгенная ДНК и фланкирующая геномная ДНК (геномная/трансгенная ДНК) из трансформированного родителя присутствуют в потомстве от скрещивания в том же хромосомном положении. Термин «событие» также относится к ДНК исходного трансформанта и потомству этого, содержащему встроенную ДНК и фланкирующую геномную последовательность, непосредственно примыкающую к встроенной ДНК, которая, как ожидается, передается потомству, которое получает встроенную ДНК, в том числе представляющий интерес трансген, как результат полового скрещивания одной родительской линии, которая включает встроенную ДНК (например, исходный трансформант и потомство, полученное в результате самооплодотворения) и родительской линии, которая не содержит встроенной ДНК.

«Последовательность участка соединения» охватывает точку, в которой ДНК, встроенная в геном, соединена с ДНК нативного генома, фланкирующей точку вставки, идентификация и детектирование тех или иных последовательностей участков соединения генетического материала растения достаточна для того, чтобы диагностировать событие. Включаются последовательности ДНК, которые охватывают вставки описанных в настоящем документе событий у сои и аналогичные длины фланкирующей ДНК.

Конкретные примеры таких диагностических последовательностей представлены в настоящем документе, однако, другие последовательности, которые перекрывают точки соединения вставок, или точки соединения вставок и геномной последовательности, также являются диагностическими, и могут использоваться в соответствии с рассматриваемым изобретением.

Рассматриваемое изобретение относится к идентификации таких фланкирующих последовательностей, последовательностей участков соединения и встроенных последовательностей. Связанные ПЦР-праймеры и ампликоны включены в изобретение. В соответствии с рассматриваемым изобретением, способы ПЦР-анализа с использованием ампликонов, распространяющихся через встроенную ДНК и ее границы, могут быть использованы для детектирования или идентификации продуцируемых серийно трансгенных сортов сои или линий, полученных от рассматриваемых запатентованных трансгенных линий сои.

Полные последовательности каждой из этих вставок, вместе с частями

соответствующих фланкирующих последовательностей, представлены в настоящем документе, как SEQ ID NO:1. Координаты вставки и фланкирующих последовательностей для этого события в отношении SEQ ID NO: 1 (всего 10212 пар оснований) указаны ниже.

	5' фланкирующий	Вставка	3' фланкирующий
Номера остатков (SEQ: 1)	1-2730	2731-9121	9122-10212
Длина (пар нуклеотидов):	2730 пар нуклеотидов	6391 пар нуклеотидов	1091 пар нуклеотидов

Компоненты вставки и фланкирующих последовательностей также проиллюстрированы на Фигурах с 1 по 4.

Способы детектирования по настоящему изобретению особенно полезны в сочетании с селекцией растений, для определения того, какие растения-потомки включают определенное событие, после скрещивания родительского растения, содержащего представляющее интерес событие, с другой растительной линией в попытке передать один или несколько дополнительных представляющих интерес признаков потомству.

Эти способы анализа приносят пользу программам селекции сои, а также контролю качества, особенно для коммерциализированных трансгенных семян соевых бобов. Комплекты для детектирования этих трансгенных линий сои также теперь можно создавать, и использовать. Также можно извлечь пользу при регистрации продукта и контроле качества продукции. Это можно использовать для стратегий ускоренной селекции и установить данные по сцеплению.

Последовательности, представленные в настоящем документе, можно использовать для исследования и характеристики процессов интеграции трансгенов, характеристики сайтов геномной интеграции, сортировки событий, стабильности трансгенов и их фланкирующих последовательностей, и экспрессии генов (особенно связанных с сайленсингом генов, профилями трансгенного метилирования, эффектами положения и потенциальными связанными с экспрессией элементами, такими как MARS [области прикрепления матриц], и т.д.).

Далее, рассматриваемое изобретение включает селекцию растений-потомков, предпочтительно гербицид-устойчивого растения сои, где указанное растение имеет геном, включающий детектируемую вставку ДНК, как описано в настоящем документе. Как используется в настоящем документе, термин «соя» означает *Glycine max*, и включает все разновидности этого, которые можно вывести с растением сои.

Это изобретение также включает процессы получения скрещиваний, используя

растение по рассматриваемому изобретению в качестве, по крайней мере, одного из родителей. Это изобретение включает способ производства семян гибридов F₁ путем скрещивания типичного растения с другим растением (например, инбредным родителем) и сбора гибридных семян. Характеристики полученных в результате растений (или 5 женских особей) могут быть улучшены путем тщательного рассмотрения родительских растений.

Устойчивое к гербицидам растение сои можно вывести путем первого полового скрещивания первого родительского растения сои, состоящего из растения сои, выращенного из семян любой из линий, упомянутых в настоящем документе, и второго 10 родительского растения сои, производя, таким образом, множество растений первого поколения; и затем селекции растения первого поколения, устойчивого к гербициду (или обладающего, по крайней мере, одним из событий по рассматриваемому изобретению); и самоопыления растения первого поколения, производя, таким образом, множество растений второго поколения, а затем, селекции из растений второго 15 поколения растения, устойчивого к гербициду (или обладающего, по крайней мере, одним из событий по рассматриваемому изобретению). Эти стадии могут также включать обратное скрещивание растения первого поколения или растения второго поколения со вторым родительским растением сои или третьим родительским растением сои. Затем может быть посажена соевая культура, содержащая семена сои по рассматриваемому 20 изобретению, или потомство этого.

Следует также понимать, что можно также скрещивать два различных трансгенных растения, чтобы производить потомство, которое содержит два независимо сегрегирующих добавленных, экзогенных гена. Самоопыление соответствующего потомства могут производить растения, гомозиготные по обоим добавленным, 25 экзогенным генам. Возвратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением также предусматривается, поскольку является вегетативным размножением. В рассматриваемой области известны другие способы размножения, обычно используемые для различных признаков и культур. Размножение путем возвратного скрещивания было использовано для передачи генов для простых 30 наследственных, высоко наследуемых признаков у желательного гомозиготного сорта или инбредной линии, который является рекуррентным родителем. Источник признака для передачи называется родителем-донором. В результате растение, как ожидается, обладает атрибутами рекуррентного родителя (например, сорта) и желательного признака, переданного от родителя-донора. После первоначального скрещивания 35 особи, обладающие фенотипом родителя-донора, отбирают, и повторно скрещивают (возвратное скрещивание) с рекуррентным родителем. Полученный в результате родитель, как ожидается, должен иметь атрибуты рекуррентного родителя (например, сорта) и желательный признак, переданный от родителя-донора.

Настоящее изобретение может быть использовано с молекулярными маркерами в 40 способе маркера-помощника селекции (МАВ). Молекулы ДНК по настоящему изобретению можно использовать с другими способами (например, AFLP-маркеры, RFLP-маркеры, RAPD-маркеры, SNP и SSR), которые идентифицируют генетически связанные агрономически полезные признаки, как известно, в рассматриваемой области. Признаки устойчивости к гербицидам могут быть отслежены в потомстве от скрещивания с растением сои по рассматриваемому изобретению (или в потомстве этого, и любого другого культивара или сорта сои), используя МАВ-способы. Молекулы 45 ДНК являются маркерами для этого признака, и МАВ-способы, которые известны в рассматриваемой области, можно использовать для отслеживания признака(ов)

устойчивости к гербицидам у растений сои, где, по крайней мере, одна линия сои по рассматриваемому изобретению, или потомство этого, представляла собой родителя или предка. Способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации любого сорта сои, имеющего рассматриваемое событие.

- 5 Способы по рассматриваемому изобретению включают способ продуцирования устойчивого к гербицидам растения сои, где указанный способ включает размножение растения по рассматриваемому изобретению. Конкретнее, указанные способы могут включать скрещивание двух растений по рассматриваемому изобретению, или одного растения по рассматриваемому изобретению и любого другого растения.
- 10 Предпочтительные способы также включают селектирование потомства указанного скрещивания путем анализа указанного потомства на событие, детектируемое в соответствии с рассматриваемым изобретением. Например, рассматриваемое изобретение можно использовать для отслеживания рассматриваемого события в продолжение циклов селекции с растениями, обладающими другими желательными
- 15 признаками, такими как агрономические признаки, такими, как признаки, проверенные в настоящем документе в различных Примерах. Растения, содержащие рассматриваемое событие и желательный признак, могут быть выявлены, идентифицированы, отобраны и быстро использоваться в дальнейших раундах размножения, например. Рассматриваемое событие/признак также можно комбинировать путем селекции, и
- 20 отслеживать в соответствии с рассматриваемым изобретением, с признаком(ами) устойчивости к насекомым и/или с дополнительными признаками устойчивости к гербицидам. Одним предпочтительным вариантом осуществления последнего является растение, содержащее рассматриваемое событие в сочетании с геномом, кодирующим устойчивость к гербициду дикамба.
- 25 Рассматриваемое событие можно комбинировать, например, с признаками, кодирующими устойчивость к глифосату (например, определяющие устойчивость *EPSPS*, *GOX*, *GAT* растений или бактерий), устойчивость к глуфосинату (например, *Pat*, *bar*), ацетолактатсингазу(ALS)-ингибирующую гербицидную устойчивость (например, имидазолиноны [такие, как имазетапир], сульфонилмочевины, триазолопиримидин
- 30 сульфонанилид, соли пиримидинилтиобензойной кислоты и другие химические составы [*Csr1*, *SurA*, *et al.*]), устойчивость к бромоксилилу (например, *Bxl*), устойчивость к ингибиторам фермента HPPD (4-гидроксилфенилпируватдиоксигеназы), устойчивость к ингибиторам фитоенедесатуразы (PDS), устойчивость к гербицидам, ингибирующим фотосистему II (например, *psbA*), устойчивость к гербицидам, ингибирующим
- 35 фотосистему I, устойчивость к гербицидам, ингибирующим протопорфириноногеноксидазу IX(PPO) (например, *PPO-1*), устойчивость к фенилмочевиновым гербицидам (например, *CYP76B1*), ферменты, разлагающие дикамба (смотри, например, US 20030135879), и другие, могут быть скомплектованы по-отдельности или в различных комбинациях, чтобы обеспечить возможность эффективного контроля или предотвращения роста
- 40 сорняков и/или устойчивости к любому гербициду вышеупомянутых классов.

В отношении дополнительных гербицидов, некоторые дополнительные предпочтительные ALS-ингибиторы (также известные как AHAS-ингибиторы) включают триазолопиримидин сульфонанилиды (такие, как хлорансулам-метил, дихлосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам и пеноксулам), соли пиримидилтиобензойной кислоты (такие, как биспиробак и пиритиобак) и флукарбазон. Некоторые предпочтительные HPPD-ингибиторы включают мезотрион, изоксафлутол и сулкотрион. Некоторые предпочтительные PPO-ингибиторы включают флюмиклорак, флумиоксазин, флюфенпир, пирафлуфен, флутиацет, бутафенацил, карфентразон, сульфентразон, и

дифенилэфиры (такие, как ацифлюорfen, фомезаfen, лактоfen и оксифлюорfen).

Кроме того, AAD-12 сам по себе или в сочетании с одним или несколькими дополнительными НТС-признаками можно комбинировать с одним или несколькими дополнительными «входящими» (например, устойчивость к насекомым, устойчивость к грибкам или стресс-устойчивость, *et al.*) или признаками, характеризующими выход (например, повышенная урожайность, улучшенный профиль маслянистости, улучшенное качество волокна, *et al.*). Таким образом, рассматриваемое изобретение можно использовать для обеспечения полного агрономического пакета повышения качества урожая с возможностью гибкого и экономически эффективного контроля любого числа сельскохозяйственных вредителей.

Рассматриваемый фермент AAD-12 обеспечивает возможность трансгенной экспрессии, приводящей к устойчивости к комбинации гербицидов, что позволило бы контролировать почти все широколиственные сорняки и сорняки-травы. AAD-12 может служить прекрасным признаком устойчивости культуры к гербициду (НТС) в сочетании с другими НТС-признаками (например, устойчивость к глифосату, устойчивость к глюфосинату, устойчивость к имидазолинону, устойчивость к бромоксилину, *et al.*) и признаками устойчивости к насекомым (*Cry IF, Cry1Ab, Cry 34/45, et al.*), например. Кроме того, AAD-12 может служить в качестве селективного маркера для помощи при отборе первичных трансформантов растений, модифицированных при помощи способов генетической инженерии вторым геном или группой генов.

НТС-признаки по рассматриваемому изобретению можно использовать в новых комбинациях с другими НТС-признаками (включая, в качестве неограничивающего примера, устойчивость к глифосату). Эти сочетания признаков приводят к новым способам контроляирования видов сорняков (и подобных), благодаря только что приобретенной устойчивости или врожденной устойчивости к гербицидам (например, глифосату). Таким образом, в дополнение к НТС-признакам, новые способы для контроля сорняков с помощью гербицидов, для которых устойчивость к гербицидам была создана при помощи указанного фермента в трансгенных культурах, находятся в рамках изобретения.

Кроме того, преобладающими являются устойчивые к глифосату культуры, выращиваемые по всему миру. При многократном чередовании с другими устойчивыми к глифосату культурами контроль глифосат-устойчивых растений-самосевов для чередующихся культур может быть затруднен. Таким образом, использование рассматриваемых трансгенных признаков, комбинированных или трансформированных индивидуально в сельскохозяйственные культуры, предоставляет инструмент контролирования растений-самосевов других НТС-культур.

Если не указано иное, ссылка на фланкирующие последовательности относится к тем последовательностям, которые выявлены в отношении SEQ ID NO:1 (смотри таблицу выше). Опять же, SEQ ID NO:1 содержит гетерологичную ДНК, встроенную в исходный трансформант, и иллюстративные фланкирующие геномные последовательности, непосредственно примыкающие к встроенной ДНК. Все или часть этих фланкирующих последовательностей может, как ожидается, передаваться потомству, которое получает встроенную ДНК в результате полового скрещивания родительской линии, которая содержит событие.

Как используется в настоящем документе, «линия» представляет собой группу растений, которые обнаруживают немного или отсутствие генетических различий между особями, по крайней мере, по одному признаку. Такие линии можно создать путем нескольких поколений самоопыления и селекции, или вегетативного размножения из

одного родителя с помощью технологий тканевых или клеточных культур.

Как используется в настоящем документе, термины «культивар» и «сорт» являются синонимами, и относятся к линии, которая используется для коммерческого производства.

- 5 «Стабильность» или «стабильный» означает, что в отношении данного компонента, компонент поддерживается из поколения в поколение и, желательно, по крайней мере, три поколения, в основном, на том же уровне, например, предпочтительно $\pm 15\%$, более предпочтительно $\pm 10\%$, наиболее предпочтительно $\pm 5\%$. Устойчивость может быть под воздействием температуры, местоположения, стресса и время посадки. При
- 10 сравнении последующих поколений в полевых условиях компоненты должны продуцироваться аналогично.

«Коммерческая выгодность» определяется как получение хорошей мощности растения и высокой фертильности, таких, что урожай может быть произведен фермерами при помощи обычной сельскохозяйственной техники, и масло с описанными компонентами

15 можно экстрагировать из семян с использованием обычного оборудования для дробления и экстракции. Чтобы быть коммерчески выгодным, урожай, определяемый по семенной массе, содержанию масла и общему количеству масла, произведенного с акра, находится в пределах 15% от среднего выхода у иного сопоставимого коммерческого сорта сои без признаков увеличенного выхода, выращенных в этом же

20 регионе.

«Агрономически элитный» означает, что линия имеет желательные агрономические характеристики, такие как урожайность, зрелость, устойчивость к болезням и т.д., в дополнение к устойчивости к насекомым, вследствие рассматриваемого события(ий). Агротехнические признаки, взятые по отдельности или в любой комбинации, как указано

25 в Примерах, приведенных ниже, у растения, содержащего событие по рассматриваемому изобретению, находятся в границах рассматриваемого изобретения. Любые и все из этих агрономических характеристик и экспериментальных значений могут быть использованы для детектирования таких растений, либо в точке, либо на любой границе или обеих границах диапазона характеристик, используемых для определения таких

30 растений.

Как установит любой специалист в рассматриваемой области в свете настоящего раскрытия, предпочтительный вариант осуществления комплектов для детектирования, например, может включать в себя зонды и/или праймеры, в том числе полинуклеотидные зонды и/или ампликоны.

35 Праймер(ы), «приплавляющиеся» к фланкирующей последовательности, как правило, не предназначены для гибридизации вне примерно 200 пар или вне участка соединения. Таким образом, типичный фланкирующий праймер следует проектировать так, чтобы включить, по меньшей мере, 15 остатков любой цепи внутри 200 пар во фланкирующей последовательности от начала вставки. То есть, праймеры, включающие

40 последовательность соответствующего размера (или гибридизующейся с) в диапазоне остатков ~ 2530 - 2730 и/или ~ 9122 - 9322 из SEQ ID NO: 1, находятся в рамках рассматриваемого изобретения. Праймеры вставки также могут быть получены где-либо на вставке, но остатки ~ 2731 - 2931 и ~ 8921 - 9121 могут быть использованы, например, не исключительно для такого дизайна праймеров.

45 Любой специалист в рассматриваемой области также признает, что праймеры и зонды могут быть получены для гибридизации, в диапазоне стандартных условий гибридизации и/или ПЦР, с сегментом SEQ ID NO:1 (или комплементарным) и комплементарным этому, где праймер или зонд не является полностью

комплементарным представленной последовательности. То есть, может быть допустима некоторая степень несоответствия. Для праймера приблизительно в 20 нуклеотидов, например, как правило, один или два или несколько нуклеотидов не нужно связываться с противоположной цепью, если неспаренное основание является внутренним или

5 находится на конце праймера, который является противоположным у ампликона. Различные соответствующие условия гибридизации приводятся ниже. Синтетические нуклеотидные аналоги, такие как инозин, также могут использоваться в зондах. Могут быть использованы пептид-нуклеиновокислотные (PNA) зонды, а также ДНК- и РНК- зонды. Важно, что такие зонды и праймеры являются диагностическими (способными

10 однозначно идентифицировать и отличить) на наличие события по рассматриваемому изобретению.

Компоненты «вставки» проиллюстрированы на Фигурах. Полинуклеотидные последовательности ДНК этих компонентов или фрагменты этого, можно использовать в качестве ДНК-праймеров и зондов в способах по настоящему изобретению.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения предоставлены композиции и способы детектирования присутствия области трансгенной/геномной вставки, в растениях и семенах и т.п., в растениях сои. Предоставлены последовательности ДНК, а также их сегменты, и комплементарные типичным последовательностям и любым их сегментам.

20 Эти и другие связанные с ними процедуры можно использовать для однозначной идентификации этих линий сои.

В некоторых вариантах осуществления последовательности ДНК, которые содержат фрагмент, прилегающий к району новой трансгенной/геномной вставки, являются 25 аспектом этого изобретения. Включенными являются последовательности ДНК, которые содержат достаточной длины полинуклеотиды последовательности трансгенной вставки и полинуклеотиды достаточной длины геномной последовательности сои из одного или более из трех вышеупомянутых растений сои и/или последовательности, которые пригодны в качестве последовательностей праймеров для производства продукта ампликона, диагностического для одного или нескольких из этих растений сои.

30 Связанные варианты осуществления относятся к последовательностям ДНК, которые включают, по крайней мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более смежных нуклеотидов трансгенной части последовательности ДНК, идентифицированной в данном документе (таких как SEQ ID NO:1 и их сегменты), или комплементарной им, и сходной длины фланкирующая последовательность ДНК 35 сои из этих последовательностей, или комплементарные им. Такие последовательности полезны в качестве ДНК-праймеров в способах ДНК-амплификации. Ампликоны, производимые с использованием этих праймеров, являются диагностическими для любого из событий у сои, упомянутого в настоящем документе. Таким образом, изобретение также включает ампликоны, произведенные такими ДНК-праймерами и

40 гомологичными праймерами.

Это изобретение также включает способы детектирования присутствия ДНК в образце, который соответствует событию у сои, упомянутому в настоящем документе. Такие способы могут включать: (а) контактирование образца, содержащего ДНК, с набором праймеров, который, при использовании в реакции амплификации нуклеиновых 45 кислот с ДНК из, по крайней мере, одного из этих событий у сои, производит ампликон, который является диагностическим для указанного события(ий); (б) проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот, тем самым продуцируя ампликон; и (с) детектирование ампликона.

Кроме того, способы детектирования по рассматриваемому изобретению включают способ детектирования наличия ДНК в образце, соответствующего, по крайней мере, одному из указанных событий, где указанный способ включает: (а) контактирование образца, содержащего ДНК, с зондом, который гибридизуется при жестких условиях

5 гибридизации с ДНК, по крайней мере, одного из указанных событий у сои, и который не гибридизуется при жестких условиях гибридизации с контрольным растением сои (ДНК без представляющего интересов события); б) подвержение образца и зонда жестким условиям гибридизации; и (с) детектирование гибридизации зонда с ДНК.

В еще одном варианте осуществления, рассматриваемое изобретение включает

10 способы получения растения сои, содержащего событие *aad-12* по рассматриваемому изобретению, где указанный способ включает стадии: а) полового скрещивания первой родительской линии сои (включающей экспрессионную кассету по настоящему изобретению, которая предоставляет указанный признак устойчивости к гербициду растениям указанной линии) и второй родительской линии сои (у которой отсутствует

15 этот признак устойчивости к гербициду), производя, таким образом, множество

растений-потомков; и (б) селектирование растения-потомка при помощи рассматриваемого изобретения. Такие способы могут необязательно включать дополнительную стадию возвратного скрещивания растения-потомка со второй родительской линией сои для получения растения сои чистой линии, которое содержит

20 указанный признак устойчивости к гербициду.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рассматриваемого изобретения, предоставлены способы определения зиготности потомства скрещивания. Указанные способы могут включать контактирование образца, содержащего ДНК сои, с набором праймеров по рассматриваемому изобретению. Указанные праймеры,

25 при использовании в реакции амплификации нуклеиновых кислот с геномной ДНК из, по крайней мере, одного из указанного события у сои, продуцируют первый ампликон, который является диагностическим для, по крайней мере, одного из указанных событий у сои. Такие способы дополнительно включают проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот, продуцируя, таким образом, первый ампликон; детектирование

30 первого ампликона; и контактирование образца, содержащего ДНК сои, с указанным набором праймеров, при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из растений сои, продуцирование второго ампликона, содержащего нативную геномную ДНК сои, гомологичную геномной области сои; и проведение

35 реакции амплификации нуклеиновых кислот, продуцируя, таким образом, второй ампликон. Способы дополнительно включают детектирование второго ампликона и сравнение первого и второго ампликона в образце, где присутствие обоих ампликонов указывает на то, что образец является гетерозиготным по трансгенной вставке.

Комплекты для детектирования ДНК с помощью композиций, раскрытых в настоящем документе, и способы хорошо известны в области детектирования ДНК.

40 Комплекты являются полезными для идентификации рассматриваемого события ДНК сои в образце, и могут применяться к способам размножения растений сои, содержащих эту ДНК. Комплекты содержат последовательности ДНК, гомологичные или комплементарные ампликонам, например, раскрытым в настоящем документе, или последовательностям ДНК, гомологичным или комплементарным ДНК, содержащимся

45 в трансгенных генетических элементах рассматриваемых событий. Эти последовательности ДНК можно использовать в реакциях амплификации ДНК или в качестве зондов в способах ДНК-гибридизации. Комплекты также могут содержать реагенты и материалы, необходимые для выполнения способа детектирования.

«Зонд» представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая присоединяется к обычной детектируемой маркерной или репортерной молекуле (например, радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент). Такой зонд является комплементарным цепи нуклеиновой кислоты-мишени, в случае 5 настоящего изобретения, к цепи геномной ДНК из одного из указанных событий у сои, будь то ДНК из растения сои или из образца, который содержит ДНК из события. Зонды в соответствии с настоящим изобретением включают не только 10 дезоксирибонуклеиновые и рибонуклеиновые кислоты, но также и полиамиды и другие материалы зондов, которые связываются специфически с последовательностью ДНК-мишени, и могут быть использованы для детектирования наличия этой последовательности ДНК-мишени.

«Праймеры» представляют собой изолированные/синтезированные нуклеиновые кислоты, которые отжигаются с комплементарной цепью ДНК-мишени путем гибридизации нуклеиновых кислот в виде гибрида между праймером и цепью ДНК-мишени, а затем удлиняются по цепи ДНК-мишени при помощи полимеразы, например, 15 ДНК-полимеразы. Пара праймеров по настоящему изобретению относится к ее использованию для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, например, путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других обычных способов амплификации нуклеиновых кислот.

20 Зонды и праймеры, как правило, составляют 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 и более полинуклеотидов в длину. Такие зонды и праймеры 45 гибридизуются специфически с последовательностью мишени при условиях гибридизации высокой жесткости. Предпочтительно, зонды и праймеры в соответствии с настоящим изобретением имеют полное сходство последовательности с последовательностью

мишени, хотя зонды, отличающиеся от последовательности мишени, которые сохраняют возможность гибридизоваться с последовательностью мишени, можно спроектировать с помощью традиционных способов.

Способы подготовки и использования зондов и праймеров, описаны, например, в

- 5 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Пары ПЦР-праймеров можно получить из известной последовательности, например, с помощью компьютерных программ, предназначенных для этой цели.

Праймеры и зонды на основе фланкирующих ДНК и встроенных

- 10 последовательностей, раскрытые в настоящем документе, могут быть использованы для подтверждения (и, при необходимости, для исправления) раскрытых последовательностей, с помощью традиционных способов, например, путем переклонирования и секренирования таких последовательностей.

Нуклеиновые кислоты зондов и праймеров по настоящему изобретению

- 15 гибридизуются при жестких условиях с последовательностью ДНК-мишени. Любой обычный способ гибридизации нуклеиновых кислот или амплификации может быть использован для идентификации присутствия в образце ДНК трансгенного события. Молекулы нуклеиновых кислот или фрагменты этого способны специфически гибридизоваться с другими молекулами нуклеиновых кислот при определенных

- 20 обстоятельствах. Как используется в настоящем документе, две молекулы нуклеиновой кислоты считаются способными специфически гибридизоваться друг с другом, если эти две молекулы способны формировать анти-параллельную, двухцепочечную структуру нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты считается «комплементарной» другой молекуле нуклеиновой кислоты, если они демонстрируют полную

- 25 комплементарность. Как используется в настоящем документе, молекулы считаются проявляющими «полную комплементарность» в случае, когда каждый нуклеотид одной из молекул комплементарен нуклеотиду другой. Две молекулы считаются «минимально комплементарными», если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной устойчивостью, чтобы позволить им оставаться отожженным одна с другой при, по

- 30 крайней мере, обычных условиях «низкой жесткости». Аналогичным образом, молекулы считаются «комплементарными», если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной устойчивостью, чтобы позволить им оставаться отожженными друг с другом при обычных условиях «высокой жесткости». Условия обычной жесткости описаны в Sambrook *et al.*, 1989. Отклонения от полной комплементарности, таким

- 35 образом, допускаются при условии, что такие отклонения не полностью исключают способность молекул образовывать двухцепочечную структуру. Для того чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила в качестве праймера или зонда, необходимо, чтобы она являлась достаточно комплементарной по последовательности, чтобы иметь возможность образовывать стабильную двухцепочечную структуру при использовании

- 40 определенных концентраций растворителя и соли.

Как используется в настоящем документе, существенно гомологичная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновых кислот, которая будет специфически гибридизоваться с последовательностью, комплементарной последовательности нуклеиновых кислот, с которой происходит сравнение при высоких 45 жестких условиях. Термин «жесткие условия» функционально определяется с учетом гибридизации зонда нуклеиновых кислот с нуклеиновой кислотой-мишенью (т.е., с определенной, представляющей интерес последовательностью нуклеиновых кислот) при помощи определенной методики гибридизации, изложенной в Sambrook *et al.*, 1989

г., в 9.52-9.55. См. также, Sambrook *et al.*, 1989 году, в 9.47-9.52 и в 9.56-9.58.

Соответственно, нуклеотидные последовательности по изобретению можно использовать по их способности избирательно образовывать дуплексные молекулы с комплементарными участками фрагментов ДНК.

- 5 В зависимости от предусмотренного приложения, можно использовать различные условия гибридизации, чтобы добиться различной степени избирательности зонда к последовательности-мишени. Для приложений, требующих высокой избирательности, как правило, применяют довольно жесткие условия для образования гибридов, например, выбирают условия с относительно низким содержанием соли и/или высокой
- 10 температурой, такие, которые обеспечиваются при концентрации от примерно 0,02M до примерно 0,15M NaCl и при температуре от примерно 50°C до примерно 70°C. Жесткие условия, например, могут включать отмывку гибридизационного фильтра, по крайней мере, два раза промывочным буфером с высокой степенью жесткости (0,2x SSC, 0,1% SDS, 65°C). Соответствующие жесткие условия, которые способствуют ДНК-15 гибридизации, например, 6,0x хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при около 45°C, за которыми следует промывка 2,0x SSC при 50°C, известны специалистам в рассматриваемой области. Например, концентрация соли на стадии промывки может быть выбрана от низкой жесткости с примерно 2,0x при 50°C до высокой жесткости примерно 0,2x SSC при 50°C. Кроме того, температуру на стадии отмывки можно
- 20 увеличить с комнатной температуры, примерно 22°C при условиях низкой жесткости до примерно 65°C при условиях высокой жесткости. Как температуру, так и соль можно изменять, или либо температура, либо концентрация соли может быть постоянной, а другая переменная изменяться. Такие селективные условия допускают, если вообще допускают, небольшое несоответствие между зондом и матрицей или цепью-мишенью.
- 25 Детектирование последовательностей ДНК с помощью гибридизации хорошо известно специалистам в рассматриваемой области, и рекомендации патентов США №. 4965188 и 5176995 являются примерами способов анализов гибридизации.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению специфически гибридизуют с одним или более из праймеров (или ампликонов или других последовательностей), представленных или предлагаемых в настоящем документе, включая комплементарные последовательности и фрагменты этого, в условиях высокой жесткости. В одном аспекте настоящего изобретения, маркерная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению имеет последовательность нуклеиновых кислот, как указано в настоящем документе в одной из представленных последовательностей, или комплементарных последовательностей и/или фрагментах этого.

В другом аспекте настоящего изобретения, маркерная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению обладает от 80% до 100% или от 90% до 100% идентичности последовательности с такими последовательностями нуклеиновых кислот. Еще в одном аспекте настоящего изобретения, маркерная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению обладает от 95% до 100% идентичности последовательности с такой последовательностью. Такие последовательности могут быть использованы в качестве маркеров в способах селекции растений для идентификации потомства генетических скрещиваний. Гибридизацию зонда с молекулой ДНК-мишени можно обнаружить любым числом способов, известных специалистам в рассматриваемой области, они могут включать, в качестве неограничивающих примеров, флуоресцентные метки, радиоактивные метки, метки на основе антител и хемилюминесцентные метки.

В отношении амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени

(например, при помощи ПЦР) с использованием определенной пары праймеров для амплификации, «жесткие условия» представляют собой условия, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться только с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени, с которой праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или комплементарную ей), может связаться и, желательно, продуцировать уникальный продукт амплификации, ампликон.

5 Термин «специфический для (последовательности-мишени)» указывает, что зонд или праймер гибридизуется при жестких условиях гибридизации только с последовательностью-мишенью в образце, содержащем последовательность-мишень.

- 10 Как используется в настоящем документе, «амплифицированная ДНК» или «ампликон» относится к продукту нуклеинокислотной амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, которая является частью нуклеинокислотной матрицы. Например, для определения того, содержит ли растение сои, полученное в результате полового скрещивания, геномную ДНК трансгенного 15 события из растения сои по настоящему изобретению, ДНК, экстрагированные из образца ткани растения сои, могут быть подвергнуты способу амплификации нуклеиновых кислот с использованием пары праймеров, которая включает праймер, полученный из фланкирующей последовательности в геноме растения, прилегающей к участку встраивания встроенной гетерологичной ДНК, и второй праймер, полученный 20 из встроенной гетерологичной ДНК, для продуцирования ампликона, который является диагностическим на наличие ДНК события. Ампликон имеет длину и имеет последовательность, которая также является диагностической для события. Ампликон может варьировать в длину от общей длины пар праймеров плюс одна пара нуклеотидных оснований, и/или общая длина пар праймеров плюс, примерно 2, 3, 4, 5, 25 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 30 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 35 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 40 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 45 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487,

488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, или 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 или более пар нуклеотидных оснований (плюс или минус любые инкременты, перечисленные выше). Альтернативно, пара праймеров может быть получена из фланкирующей последовательности по обе стороны от встроенной ДНК, с тем, чтобы

- 5 продуцировать ампликон, который включает всю встроенную нуклеотидную последовательность. Член пары праймеров, полученный из геномной последовательности растения, может быть расположен на расстоянии от встроенной последовательности ДНК. Это расстояние может составлять от одной пары нуклеотидных оснований до, примерно, двадцать тысяч пар нуклеотидных оснований.
- 10 Использование термина «ампликон» специфически исключает димеры праймеров, которые могут образовываться при термической реакции амплификации ДНК.

Нуклеиновокислотную амплификацию можно достичь любым из различных способов нуклеиновокислотной амплификации, известных в рассматриваемой области, в том числе полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Различные способы амплификации

- 15 известны в рассматриваемой области, и описаны, в частности, в патенте США №. 4683195 и патенте США №. 4683202. Способы амплификации были разработаны для амплификации до 22 т.п.н. геномной ДНК. Эти способы, а также другие способы, известные в области амплификации ДНК, могут быть использованы в практике по настоящему изобретению. Последовательность встроенной гетерологичной трансгенной
- 20 ДНК или фланкирующую геномную последовательность из рассматриваемого события у сои можно проверить (и при необходимости скорректировать) путем амплификации таких последовательностей из события с использованием праймеров, полученных из последовательностей, представленных в настоящем документе, с последующим стандартным секвенированием ДНК ПЦР-ампликонов или клонированной ДНК.

- 25 Ампликон, производимый этими способами, можно детектировать при помощи различных способов. Электрофорез в агарозном геле и окрашивание бромистым этидием является общим хорошо известным способом детектирования ДНК-ампликонов. Другим таким способом является генетический бит-анализ, при котором проектируют ДНК-олигонуклеотид, который перекрывает как прилегающую фланкирующую геномную
- 30 последовательность ДНК, так и встроенную последовательность ДНК. Олигонуклеотид иммобилизуют в лунках микролуночного планшета. После ПЦР представляющего интерес района (с использованием одного праймера во встроенной последовательности и одного в прилегающей фланкирующей геномной последовательности), одноцепочечный ПЦР-продукт может гибридизоваться с иммобилизованным
- 35 олигонуклеотидом и служить в качестве матрицы для реакции удлинения на одно основание с помощью ДНК-полимеразы и меченых ддНТФ, специфических для ожидаемого следующего основания. Считывание может быть флуоресцентным или на основе ELISA. Сигнал указывает на наличие вставки/фланкирующей последовательности, вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения
- 40 на одно основание.

Все патенты, заявки на патенты, предварительные заявки и публикации, упомянутые или цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме в той мере, в какой они не противоречат ясной идеи данной спецификации.

- Следующие примеры включены для иллюстрации процедур для практикующих
- 45 изобретение и для демонстрации некоторых предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Эти примеры не следует истолковывать в качестве ограничивающих. Специалистам в рассматриваемой области следует принять во внимание, что способы, раскрытые в следующих примерах, представляют собой конкретные подходы, которые

используются для иллюстрации предпочтительных режимов их применения. Тем не менее, специалисты в рассматриваемой области должны принять во внимание, в свете настоящего раскрытия, что многие изменения могут быть внесены в эти конкретные варианты осуществления, по мере получения опять же подобных или аналогичных 5 результатов, без отступления от духа и границ изобретения. Если не указано иное, все проценты представляют собой проценты по массе, и все пропорции в смесях сольвентов представлены по объему, если не указано иное.

Используются следующие сокращения, если не указано иное.

AAD-12 - арилоксиалканоатдиоксигеназа-1

10 п.о. - пара оснований

°С - градусы Цельсия

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

DIG - дигоксигенин

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

15 т.п.о. - тысяча пар оснований

мкг - микрограмм

мкл - микролитр

мл - миллилитр

М - молярная масса

20 ОЛР - перекрывающий зонд

ПЦР - полимеразная цепная реакция

PTU - транскрипционная единица растения

SDS - додецилсульфат натрия

SOP - стандартная операционная процедура

25 SSC - буферный раствор, содержащий смесь хлорида натрия и цитрата натрия, рН 7,0

ТВЕ - буферный раствор, содержащий смесь Трис-основания, борной кислоты и

ЭДТА, рН 8,3

V - вольты

30 ПРИМЕРЫ

Пример 1. Событие-специфический Тақтман-анализ

Событие-специфический ТАQMAM-АНАЛИЗ® был разработан для детектирования присутствия события DAS-68416-4 у сои и определения состояния зиготности растений в выведенных популяциях. Для разработки событие-специфического теста, специфические 35 Тақтман-праймеры и зонды были получены в соответствии с последовательностями ДНК, расположенными в 5'-участке соединения ДНК вставки-растения. Для специфического детектирования события DAS-68416-4 у сои фрагмент ДНК в 128 п.о., который охватывает этот 5'-интеграционный участок соединения, был амплифицирован с использованием двух специфических праймеров. Амплификация этого ПЦР-продукта

40 была определена путем мишень-специфического MGB-зонда, синтезированного Applied Biosystems, содержащего FAM-репортер на его 5'-конце. Специфичность этого способа Тақтман-детектирования для события DAS-68416-4 у сои была испытана в отношении 15 различных событий *aad-12* у сои и нетрансгенного сорта сои (Maverick) в формате дуплекса с определенным эндогенным референсным геном сои - лектином.

Пример 1.1. Выделение геномной ДНК

В этом исследовании были протестированы образцы геномной ДНК 15 различных событий AAD-12 у сои и нетрансгенные сорта сои. Геномная ДНК была получена с помощью Qiagen DNeasy 96 Plant Kit. Диски свежих листов сои, восемь на образец, были

использованы для экстрагирования геномной ДНК с использованием модифицированного протокола Qiagen DNeasy 96 Plant Kit. Геномную ДНК количественно определяли способом с пико зеленым в соответствии с инструкцией поставщика (Molecular Probes, Eugene, OR). Образцы разбавляли водой, не содержащей ДНКаз, в результате чего для целей настоящего исследования концентрация составила 10 нг/мкл.

Пример 1.2. Тақман-анализ и результаты

Спецические Тақман-праймеры и зонды были получены для спецического Тақман-анализа события DAS-68416-4 у сои. Эти реагенты можно использовать при условиях, перечисленных ниже, для детектирования *aad-12* в события DAS-68416-4 у сои. В таблице 1 перечислены последовательности праймеров и зондов, которые были получены конкретно для детектирования события DAS-68416-4.

Таблица 1

ПЦР-праймеры и зонды

Реакция для события-мишени		
Название	Описание	последовательность в направлении 5' к 3'
Soy416-F	Прямой праймер	SEQ ID NO:2 GGGCCTAACCTTTGGTGTGATG
Soy416-R	Обратный праймер	SEQ ID NO:3 TACCTTGCTCTTGTGTAAGTCATAAAATT
Soy416-зонд	Зонд	SEQ ID NO:4 FAM- TTCAAGCACCAAGTCAGCAT -MGB

Реакция в референсной системе с лектином		
Название	Описание	последовательность в направлении 5' к 3'
ZN 007	Прямой праймер	SEQ ID NO:5 TCCCGAGTGGGTGAGGATAG
ZN 008	Обратный праймер	SEQ ID NO:6 TCATGCGATTCCCCAGGTAT
ZN LT 002	Зонд	SEQ ID NO:7 HEX-TTCTCTGCTGCCACGGGACTCGA-BHQ1

Мультиплексные ПЦР-условия для амплификации являются следующими: 1Х ПЦР-буфер, 0,5-2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 0,2 мкМ праймера Soy416-F, 0,2 мкМ праймера Soy416-R, 0,2 мкМ праймера ZN 007, 0,2 мкМ праймера ZN 008, 0,08 мкМ Soy416-Зонд, 0,08 мкм ZN LT 002, 40 ед/мл HotStart Taq, 30 нг геномной ДНК в общем реакционном объеме 25 мкл. Смесь амплифицировали с использованием следующих условий: i) 95°C в течение 15 мин., ii) 95°C в течение 20 сек, iii) 60°C в течение 60 сек, iv) повторение стадии ii-iii в течение 35 циклов, v) поддержание при 4°C. ПЦР в реальном времени проводили на термоциклях BIO-RAD ICYCLERTM и ABI Gene Amp PCR System 9700. Анализ данных был основан на определении порога цикла (СТ), который представляет собой число циклов ПЦР, когда определение флуоресценции достигает заданного значения. СТ-значение рассчитывали автоматически при помощи программного обеспечения iCycler.

Способ Тақман-детектирования для события DAS-68416-4 у сои был применен в отношении 16 различных *aad-12* событий у сои и нетрансгенных сортов сои в формате дуплекса со специфическим эндогенным лектином сои в качестве референсного гена. Этот тест специфически детектировал событие DAS-68416-4 у сои и не продуцировал или амплифицировал какие-либо ложно-положительные результаты из контролей (т.е. 15 различных *aad-12* событий у сои и нетрансгенных сортов сои). Праймеры и зонды,

специфические для события, могут быть использованы для детектирования события DAS-68416-4 у сои, и эти условия и реагенты применимы для тестов на зиготность.

Формула изобретения

- 5 1. Способ определения зиготности растения сои, включающего арилоксиалканоатдиоксигеназу (AAD-12) с SEQ ID NO: 1, где указанное растение содержит трансгенную конструкцию, включающую ген AAD-12, состоящий из остатков 2731-9121 SEQ ID NO: 1, и указанная трансгенная конструкция фланкирована 5'-фланкирующей геномной ДНК сои и 3'-фланкирующей геномной ДНК сои, где
 - 10 указанная 5'-фланкирующая геномная ДНК содержит остатки 1-2730 SEQ ID NO: 1, указанная 3'-фланкирующая геномная ДНК содержит остатки 9122-10212 SEQ ID NO: 1, где указанный способ включает:
 - 15 получение ДНК-образца геномной ДНК из указанного растения сои;
 - подвергание указанного образца ДНК основанному на флуоресценции конечной точки TaqMan-ПЦР тесту с
 - 20 а) первым праймером и вторым праймером, где указанный первый праймер содержит сегмент указанной трансгенной конструкции и указанный второй праймер содержит сегмент указанной 5'-фланкирующей геномной ДНК сои или сегмент указанной 3'-фланкирующей геномной ДНК сои и где указанный первый праймер и указанный второй праймер продуцируют ампликон в случае, когда подвергаются условиям проведения количественной ПЦР;
 - b) референсным прямым праймером и референсным обратным праймером, которые продуцируют референсный ампликон с эндогенного референсного гена сои - лектина - в случае, когда подвергаются условиям проведения количественной ПЦР;
 - 25 c) флуоресцентным зондом, который гибридизуется с указанным ампликоном;
 - d) флуоресцентным референсным зондом, который гибридизуется с указанным референсным ампликоном;
 - 25 проведение количественного анализа указанного флуоресцентного зонда, который гибридизуется с указанным ампликоном;
 - 30 проведение количественного анализа указанного флуоресцентного референсного зонда, который гибридизуется с указанным референсным ампликоном;
 - 35 сравнение количеств прогибридизовавшегося флуоресцентного зонда и прогибридизовавшегося флуоресцентного референсного зонда; и
 - 40 определение зиготности растения с SEQ ID NO: 1 путем сравнения соотношения флуоресценции прогибридизовавшегося флуоресцентного зонда и прогибридизовавшегося флуоресцентного референсного зонда.
 2. Способ по п. 1, где указанные ампликоны состоят из 50-150 остатков.
 3. Способ по п. 1, где указанный второй праймер связывается с остатками 2530-2730 SEQ ID NO: 1 или с комплементарной последовательностью.
 4. Способ по п. 1, где указанный второй праймер связывается с остатками 9122-9322 SEQ ID NO: 1.
 5. Способ по п. 1, где указанный способ используется при селекции интродрессией в другую линию сои.
 6. Способ по п. 5, где указанная другая линия сои не содержит AAD-12.
 - 45 7. Способ по п. 1, где указанные ампликоны состоят из 100-200 пар оснований.
 8. Способ по п. 1, где указанный референсный ген включает или гибридизуется с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7.

9. Способ по п. 1, где указанные референсные праймеры состоят из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и указанный референсный зонд состоит из SEQ ID NO: 7.

10. Способ по п. 1, где указанные зонды маркированы флуоресцентным красителем и гасителем.

⁵ 11. Способ по п. 10, где указанный зонд содержит FAM в качестве указанного флуоресцентного красителя на 5'-конце указанного зонда и MGB-гаситель на 3'-конце указанного зонда.

¹⁰ 12. Способ по п. 10, где указанный референсный зонд маркирован HEX на 5'-конце указанного референсного зонда и Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце указанного референсного зонда.

13. Способ по п. 1, где указанный зонд состоит из SEQ ID NO: 4.

14. Способ по п. 1, где указанные праймеры выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

¹⁵ 15. Способ по п. 1, где результаты указанного способа считаются непосредственно в планшет-ридере.

16. Способ по п. 1, где указанный образец ДНК получают из растения сои в поле.

¹⁷ 17. Комплект для выполнения способа по п. 1, где указанный комплект включает указанные праймеры, состоящие из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, указанные референсные праймеры, состоящие из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, указанный зонд, состоящий из ²⁰ SEQ ID NO: 4, и указанный референсный зонд, состоящий из SEQ ID NO: 7.

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Dow AgroSciences, LLC
 <120> ДЕТЕКТИРОВАНИЕ AAD-12-СОБЫТИЯ 416 У СОИ
 <130> DAS-P0170-01
 <150> 61/263,950
 <151> 2009-11-24
 <150> 61/327,369
 <151> 2010-04-23
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 10212
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательности вставки и фланкирующие последовательности
 события DAS-68416-4 у сои
 <400> 1
 ctgtcggtgg attcacagaa cattgacgccc agttttcaact tcgttatctt tgaattcatt 60
 aaaatcgaaat ctctcaccta taccccccata tttttctaat ccatcataat caaaattcat 120
 aaatgaatca gttaccattt ccataataacc tttttgaaaa tgagttgaa taatcagttat 180
 ctttagaaaa ctaattaaga aattaaataaa aaaatattta tcatgaagat gagtgtaaga 240
 aaaattatga aaagtataac ttatcacatt tctataaaat tatttttctt ttaatttct 300
 taattaatataat cctaagtaaa tgagttaata tttatcttc aaaaattctt atagtcgcca 360
 attaattttc ccatgcaatg acaacttgc cgtattctac gtggtaggtt aggctacctg 420
 ccgagacaaa ttgccttgag acaaattcaa tagagaaccc ttccaaggga ccattataaaa 480
 tagagaactt tcattaaccg ataagccaca cccttcaat caaacacaaa cacttgaagt 540
 actaagtttag tgtgtttgag caaattaact atggcttcgt tttgttctag attgacaatt 600
 tggggctc tggttgcct catatgggg agtgccatg cacaacttcc tacaactttt 660
 tactaccatt catgtccaaa cctcttc tctgtgaaat ccacagtgc atctgccata 720
 tctaaggaga cccgcatggg tgcttctctc cttcgcttgt tcttccacga ttgctttgtc 780
 aatgtaattt atttgcacct tctcccactt acatacaaat atgctaagct tacatatacg 840
 tcctcttctt accacttgca tgcacatct aatttgttt gaaacaacac ttgttccctt 900
 tattatacac atcatcttg ataaaaatttt gtgtgtgc a cttttttt agtgtgttaa 960
 tcagttctat gatgatacta ttagttaaga aattttaatg cacttaataa accattttaa 1020
 gtactttaac cgttcaatga tattatataat ttaaagataa taaatatttc tgctttgtt 1080

tctatattag ttagttaag aacccctta cttcttagct agctaaatataat	1140
acattaacaa atgcagggat gtgatggttc aattctattg gatgacacat caagcttcac	1200
cgagagaag aacgcaaacc ccaacaggaa ctctgctcggtt ggattcgagg ttattgacaa	1260
cattaaatca gcccgtggaga aagtgtgtcc aggagttgtt tcctgcgcag atatccttgc	1320
catcgctgcc agagactctg ttcagattgt aagtggtcaa acaaccaaca aaaacacatt	1380
aaactaaatc attaaattgt acatataaaa attaattacc aattttagtac cacacatgca	1440
attaaagaga acattttgtt gatTTTgatc aatatagtttt ggaggcccta catggaatgt	1500
taaacttgga agaagagacg ctagaactgc tagccatct gctgctaaca atggcatccc	1560
tgcacccact tcaaacctta accaactcat ctcaagattt agcgcttgc gactttccac	1620
caaggacttgc gtcgccttgtt ccggtacaaa acatataatca cataattttc caattaat	1680
catttcaatc atatagtaaa atttctcaat taatttaggaa catgagaaac ttatagtac	1740
acgttctttt gttgaggaat attgcatgtt ttaattttgc ttccattagg tggcacaca	1800
attggacaaag caaggtgcac aaacttcaga gcccgcacatc acaacgagac caacatagaa	1860
accgcatttgc caaggacttag gcagcaaagc tgccctagaa catcagggtc agggacaac	1920
aatctggcac cacttgcatttgc tcaaactcca accagcttgc acaactacta ctcaagaac	1980
ctcggttcaga agaagggtctt cctccactct gatcagcaac tttcaacgg tgggtccacc	2040
gactccatttgc tgcgtggcta cagcaccaac ccgggcaccc ttcctctga ttccggcc	2100
gccatgatca agatgggaga cattagtcct ctcactggct ccaatggaga aatcaggaag	2160
aattgttagaa ggatataacta atttgcattca gtcttgcata ttaagggtcc tacacatacg	2220
caagcaattt aattgtgttt aataagttgt taaaacatgt tttgggtgtt tttggattc	2280
ctagtgttagt ttccggatc aatgccgtct actttgtgtt gttctacttc cctttat	2340
tgtttctttt ttacttttc cttaactata ttgttaggaaa aaaaaatcc tttatcaagc	2400
atttatcaag aacggagttt gcttttaat ttcccttca taacattcca tcagaattca	2460
gttttgcttt tgcttctaaa ttacgttcaa atcaggatg ataatcggtt aggtatata	2520
tacagtaccc cttgcatagt cacgtttgaa aaatataatc atacttagtt cggttacaaat	2580
ttaaattatc attctcgtaa tcattagctt cttatgcact catatccgtt tccgtactt	2640
gctcttgcgtt taagtcaata aattatata aaaaaataact taaaacttgcgtt tacaactaaa	2700
ttaaaaattt atttttaat cattcaagca ccagtcagca tcacacacc aaaaatgttgg	2760
cccgaaatagt ttgaaattttt aagctcgca attgaggtctt acaggccaaa ttccgttca	2820
gccgtacaat attactcacc ggatcctaaac cgggtgtatc atggccgcg attaaaaatc	2880
tcaattatat ttgggtctaat ttgtttgtt attgagtaaa acaaattcga accaaaccaa	2940
aatataaaata tatagtttt atatataatgc cttaagact tttatagaa ttatctttaa	3000

aaaatatcta	gaaatatttg	cgactcttct	ggcatgtaat	attcgttaa	atatgaagt	3060
ctccatttt	attnacttta	aataatttgt	tgtacgatca	ctttcttata	aagtgttact	3120
aaaatgcgtc	aatctcttg	ttcttccata	ttcatatgtc	aaaacctatc	aaaattctta	3180
tataatcttt	tcgaatttga	agtgaaattt	cgataattt	aaattaaata	gaacatata	3240
ttattnatgt	atcatattga	tttttatact	taattactaa	attnggtaa	ctttgaaagt	3300
gtacatcaac	gaaaaattag	tcaaacgact	aaaataaata	aatatcatgt	gttattaaga	3360
aaattctcct	ataagaatat	tttaatagat	cataatgttg	taaaaaaaat	taattnntac	3420
taacacat	attnacttat	caaaaatttg	acaaagtaag	attnaaataa	tattcatcta	3480
acaaaaaaaaa	aaccagaaaa	tgctgaaaac	ccggcaaaac	cgaaccaatc	caaaccgata	3540
tagttggttt	ggtttgattt	tgtatataac	cgaaccaact	cggccattt	gcacccctaa	3600
tcataatagc	tttaatattt	caagatatta	ttaagttaac	gttgtcaata	tcctggaaat	3660
tttgcaaaat	gaatcaagcc	tatatggctg	taatatgaat	ttaaaagcag	ctcgatgtgg	3720
tggtaatatg	taattnactt	gattctaaaa	aaatatccca	agtattaata	attnctgcta	3780
ggaagaaggt	tagctacgt	ttacagcaaa	gccagaatac	aatgaaccat	aaagtgattt	3840
aagctcgaaa	tatacgaagg	aacaaatatt	ttttaaaaaa	tacgcaatga	cttggAACaa	3900
aagaaagtga	tatattttt	gttcttaaac	aagcatcccc	tctaaagaat	ggcagtttc	3960
ctttgcatt	aactattatg	ctcccttcgt	tacaaaaatt	ttggactact	attnnnact	4020
tcttctgaaa	atagtggcca	ccgcttaatt	aaggcgcgccc	atgcccgggc	aagcggccgc	4080
acaagttgt	acaaaaaagc	aggctccg	gtgactgact	gaaaagcttg	tcgacctgca	4140
ggtcaacgga	tcaggatatt	cttgcatttt	atgttgaact	ctatggaggt	ttgtatgaac	4200
tgtatgatca	ggaccggata	agttcccttc	ttcatagcga	acttattcaa	agaatgtttt	4260
gtgtatcatt	cttgcattat	tgttattat	gaaaaatat	tattggcat	tggactgaac	4320
acgagtgtt	aatatggacc	aggccccaaa	taagatccat	tgtatata	attnaaataac	4380
aagaataaaat	cgagtcacca	aaccacttgc	cttttttaac	gagacttgg	caccaacttg	4440
atacaatgt	cattatccta	tgcaaataa	taatcataca	aaaatatcca	ataacactaa	4500
aaaattaaaa	gaaatggata	attncacaat	atgttatacg	ataaagaagt	tactttcca	4560
agaaattcac	tgattnata	agcccacttg	cattagataa	atggcaaaaa	aaaacaaaaaa	4620
ggaaaaagaaa	taaagcacga	agaattctag	aaaatacgaa	atacgcttca	atgcagtg	4680
acccacggtt	caattattgc	caattttcag	ctccaccgt	tattttaaaa	attnaaacgt	4740
aatgctaaaa	aatatataat	cgtaacgatc	gtttaatctc	aacggcttgg	tcttata	4800
accgttagaa	attgtggttt	tcgacgagtc	agtaataaac	ggcgtcaaag	tggttgcagc	4860
cggcacacac	gagtcgtgtt	tatcaactca	aagcacaaat	actttcctc	aacctaaaaaa	4920

taaggcaatt agccaaaaac aactttgcgt gtaaacaacg ctcataacac gtgtcatttt	4980
attatttagct attgcttcac cgccttagct ttctcgtgac ctagtcgtcc tcgtctttc	5040
ttcttcttct tctataaaaac aataccaaa gcttcttctt cacaattcag atttcaattt	5100
ctcaaaatct taaaaacttt ctctcaattc tctctaccgt gatcaaggta aatttctgtg	5160
ttccttattc tctcaaaatc ttcgattttg tttcgttgc atcccaattt cgtatatgtt	5220
cttgggtta gattctgtta atcttagatc gaagacgatt ttctgggtt gatcggtttaga	5280
tatcatctta attctcgatt agggtttcat aaatatcatc cgatttggc aaataatttgc	5340
agttttgtcg aataattact ctgcatttg tgatttctat ctagatctgg tgtagtttc	5400
tagtttgtgc gatcgaaattt gtcgattaat ctgagttttt ctgattaaca gagatctcca	5460
tggctcagac cactctccaa atcacaccca ctggtgccac cttgggtgcc acagtcactg	5520
gtgttcaccc tgcacaccc tgcgtgtgc gttcgtgc cctccatgca gcctggcttc	5580
aacatgcact ctgtatcttc cttggcaac acctcagcaa tgaccaacag attacctttg	5640
ctaaacgctt tggagcaatt gagaggattt gcggaggtga cattgttgcc atatccaatg	5700
tcaaggcaga tggcacagtg cgccagcaact ctccgtgtga gtgggatgac atgatgaagg	5760
tcatttgtgg caacatggcc tggcacgccc actcaaccta catgccagtc atggctcaag	5820
gagctgtgtt cagcgcagaa gttgtccag cagttggggg cagaacctgc tttgctgaca	5880
tgagggcagc ctacgatgcc ctgtatgagg caacccgtgc tcttgcac caaaggctgc	5940
ctcgtcactc cttgtgtat tctcagagca agttggaca tgtccaacag gccgggtcag	6000
cctacatagg ttatggcatg gacaccactg caactccctt cagaccattt gtcaagggtgc	6060
atcctgagac tggaaaggccc agcctttga tcggccgcca tgcccatgca atccctggca	6120
tggatgcagc tgaatcagag cgcttccttga aaggacttgt tgactggcc tgccaggctc	6180
ccagagtcca tgctcaccaa tgggctgctg gagatgtgg tgtgtggac aaccgctgtt	6240
tgctccaccg tgctgagccc tgggatttca agttgccacg tgtgtatgtgg cactccagac	6300
tcgctggacg cccagaaact gagggtgctg cttgggtttt agtagttgc ttaatcacct	6360
agagctcggt caccagcata attttattt atgtactaaa ttactgtttt gttaaatgca	6420
attttgctt ctgggattt taatatcaaa atctatattttaa aatacacaaa tattttgttgc	6480
caggcttgct ggagaatcga tctgctatca taaaaatttac aaaaaaattt tatttgcctc	6540
aatttatttta ggattggat taaaggacgt taaatttattt gtcgggtcac tacgcacat	6600
tgtgatttgcg aagatcagcg atacgaaata ttctgtgtac tatcgataat ttatggaaa	6660
attcataaga aaagcaaaacg ttacatgaat tgatgaaaca atacaagac agataaaagcc	6720
acgcacatattt aggatattgg ccgagattac tgaatattga gtaagatcac ggaatttctg	6780
acaggagcat gtcttcaattt cagccaaat ggcagttgaa atactcaaac cgccccat	6840

gcaggagcgg atcattcatt gtttgttgg ttgccttgc caacatggga gtccaagggtt	6900
gcggccgcgc gccgacccag ctttcttgc caaagtgggt gcggccgcctt aatcaaattt	6960
aaatgcccgg gcgtttaaac gcggccgcctt aattaaggcc ggcctgcagc aaacccagaa	7020
ggttaattatc caagatgttag catcaagaat ccaatgttta cgggaaaaac tatggaagta	7080
ttatgttaagc tcagcaagaa gcagatcaat atgcggcaca tatgcaacct atgttcaaaa	7140
atgaagaatg tacagataca agatcctata ctgccagaat acgaagaaga atacgtagaa	7200
attgaaaaag aagaaccagg cgaagaaaag aatcttgaag acgtaagcac tgacgacaac	7260
aatgaaaaga agaagataag gtcggtgatt gtgaaagaga catagaggac acatgttaagg	7320
tggaaaatgt aaggcggaa agtaacctta tcacaaagga atcttatccc ccactactta	7380
tcctttata ttttccgtg tcattttgc ccttgagttt tcctatataa ggaaccaagt	7440
tcggcatttgc tgaaaacaag aaaaaatttgc tgtaagcta ttttcttga agtactgagg	7500
atacaacttc agagaaattt gtaagttgt agatctccat gtctccggag aggagaccag	7560
ttgagattag gccagctaca gcagctgata tggccgcgggt ttgtgatatc gttaaccatt	7620
acattgagac gtctacagtgc aacttttagga cagagccaca aacaccacaa gagtggatttgc	7680
atgatctaga gaggttgcaa gatagatacc ctgggttgggt tgctgaggtt gaggggtttgc	7740
tggctggat tgcttacgct gggccctggaa aggctaggaa cgcttacgat tggacagttgc	7800
agagtaactgt ttacgtgtca cataggcatc aaaggttggg cctaggatcc acattgtaca	7860
cacatttgc taagtctatg gaggcgcaag gtttaagtc tgtggttgct gttataggcc	7920
ttccaaacga tccatctgtt aggttgcatttggg atacacagcc cggggatcat	7980
tgcgcgcgc tggataacaag catggtgatggat ggcattatgtt tggttttggg caaagggttgc	8040
ttgagttgcc agctcctcca aggccaggta ggccagttac ccagatctga ggtaccctgat	8100
gtttgagctt atgagctttagt gagcttagag ctggatcca ctagtaacgg ccggcagtgt	8160
gctggaaatc gcccttgact agataggcgc ccagatcggc ggcaataagct tcttagcgcc	8220
atcccgggtt gatcctatct gtgttggaaat agttgcgggtt ggcaaggctc tctttcagaa	8280
agacaggcgg ccaaaggaac ccaaggtgag gtgggctatg gctctcagtt ctttgcggaa	8340
gcgcgttggc taaggtgcag aggtgttagc gggatgaagc aaaagtgtcc gattgtaaaca	8400
agatatgttgc atcctacgta aggatattaa agtatgtatt catcaactaat ataatcagtg	8460
tattccaata tgtactacga tttccaatgt ctgttgc ggcgtatgtt atcggcgtca	8520
caaaataatc cccgggtact ttcttttaat ccaggatgaa ataatatgtt attataattt	8580
ttgcgttgc gtcgggtata ggaattgaag tttgttgc gtcggccacca ctcccatatc	8640
ataattttac atgtatgttgc aaaataaaaaa tttatgttgc tcaatgttcaacgtataact	8700
tgtaaagaat gatatcttgc aagaaatata gttttaatatt ttattgtataa aataacaagt	8760

caggtattat agtccaagca	aaaacataaa	tttattgatg	caagttaaa	ttcagaaaata	8820	
tttcaataac tgattatatac	agctggtaca	ttgccgtaga	tgaaagactg	agtgcgatat	8880	
tatggtgtaa tacatagcgg	ccgggtttct	agtaccggt	taggatccgt	ttaaactcga	8940	
ggctagcga	tgcacataga	cacacacatc	atctcattga	tgcttggtaa	taattgtcat	9000
tagattgttt ttatgcata	atgcactcga	aatcagccaa	ttttagacaa	gtatcaaacg	9060	
gatgtgactt cagtagcatta	aaaacgtccg	caatgtgtt	ttaagttgtc	taagcgtcaa	9120	
tatTTtaatt cttaacaatc	aatatTTtaa	ttcttaaact	ttattaaatc	taacaataaa	9180	
ctgttaagaac taattcttaa	acttcaataa	acaatactgc	gttttagtaa	ttaaatttaat	9240	
aatatataga tatagatata	taatttgc	acatattctt	acctattttt	ccattgaaat	9300	
atgttagcaa gttcaaaaaa	agtttgaca	aaaaactcta	ctatctttg	tttcatttac	9360	
tttatgtgag ggatataata	gtaatataac	atttagttt	tttaaagaaaa	ataaaaaaagt	9420	
taatttctct ttctgccact	gatactctat	ggggagaga	tccgatgcag	tggtggagcc	9480	
tggcctcgac acataagtgt	gacgacgcag	ctgttgaaga	gatctgattc	gacgggtgggg	9540	
taatgcattgg tgggtgacag	gttgcgtgg	ggagaagacg	taattgc	cgccgtcaac	9600	
ggaggaagga gcaaagatgt	ctcgatgt	aaaattatgc	gttgcgtat	ccgtttcatt	9660	
ccctttaaaa aaatcccttg	atggttgcaa	tgcaaattaa	aaattgaaaa	aataattaat	9720	
tgttcaaatt aaagatttag	catgaaaaaa	aaaacactta	attgtgc	tgactccatg	9780	
acctgcgtaa ctgggaagg	aaaggaattt	tttgctaaa	ggaaggcatg	ggaagatgag	9840	
agaggagaga gaatcagtgg	aagtgcgaga	aattaacttt	ttgtttttt	aaaactaaat	9900	
attatattac tattatata	atataatata	atataaaaa	gatttttt	ctggattctt	9960	
gatataaaaa atttctcacc	atatttatta	ttatataattt	tttggagat	ctcaaaaaag	10020	
gaagttggat ttcttctcaa	taactctaaa	aaattattcc	tatttcaaaa	aatattttt	10080	
atgtcttct ctaattgtat	aataatatct	atthaagtat	attttattgt	gaaatccaca	10140	
aaagtgcactg ataaatctaa	tttaggatct	accattagag	aaaaataaaat	aaattcttat	10200	
attatatgtg at					10212	

<210> 2
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

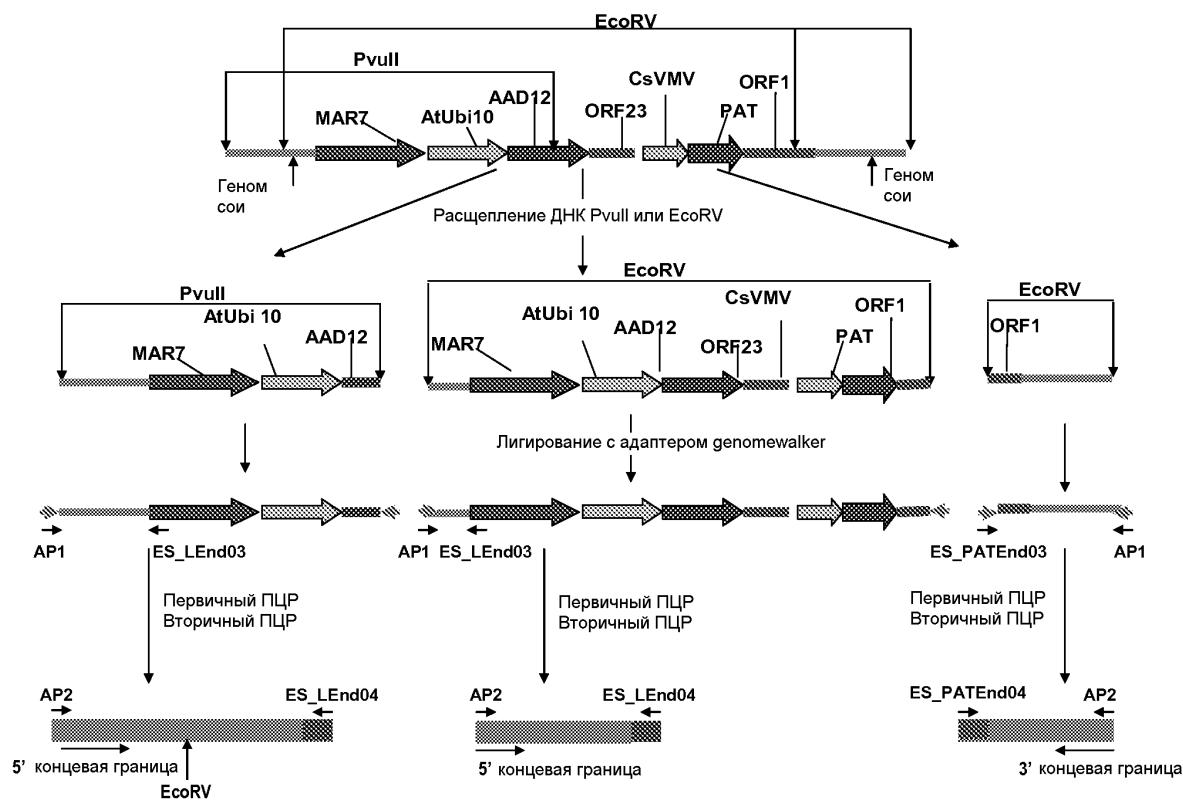
<220>
 <223> Зонд события

<400> 2
 gggcctaact tttgggtgtga tg

22

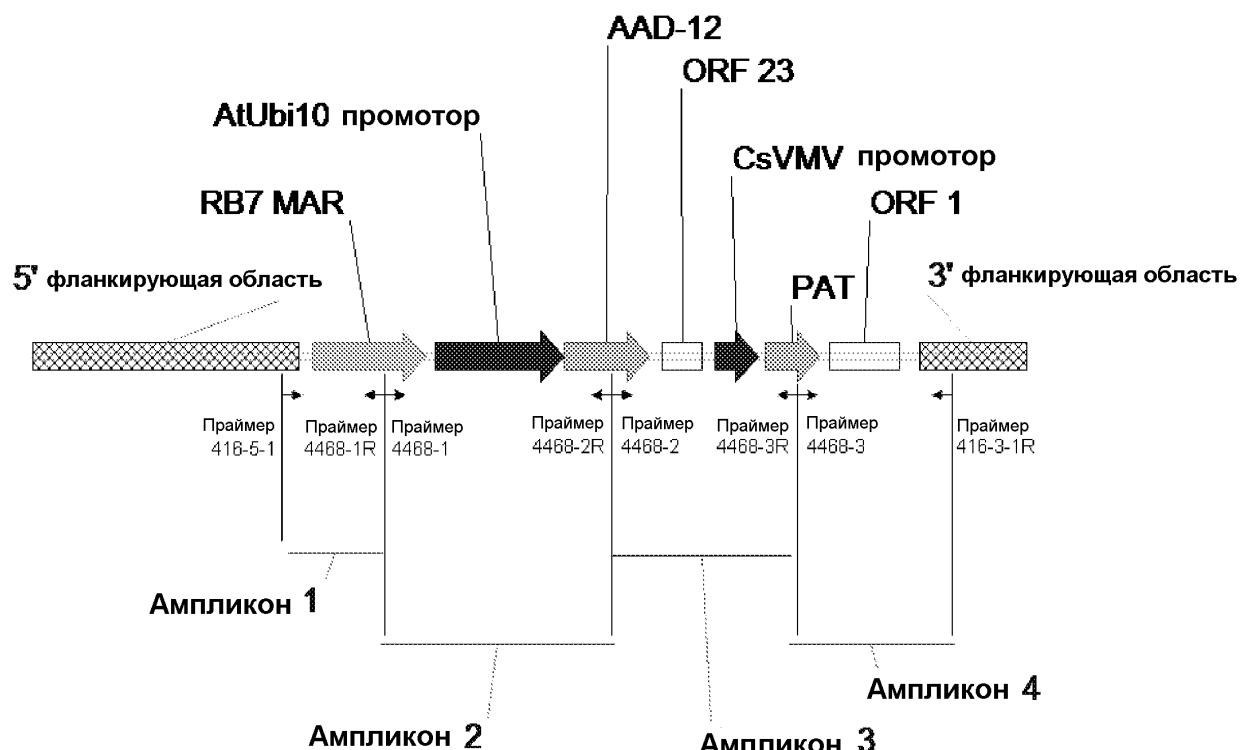
<210> 3

<211> 29		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Зонд события		
<400> 3		
taatggctct tgtcgtaagt caataaaatt		29
<210> 4		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Зонд события		
<400> 4		
ttcaaggacc agtcagcat		19
<210> 5		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Лектиновый референсный праймер		
<400> 5		
tcccgagtggtt gtgaggatag		20
<210> 6		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Лектиновый референсный праймер		
<400> 6		
tcatgcgtt ccccgaggat		20
<210> 7		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Лектиновый референсный зонд		
<400> 7		
ttctctgctg ccacgggact cga		23

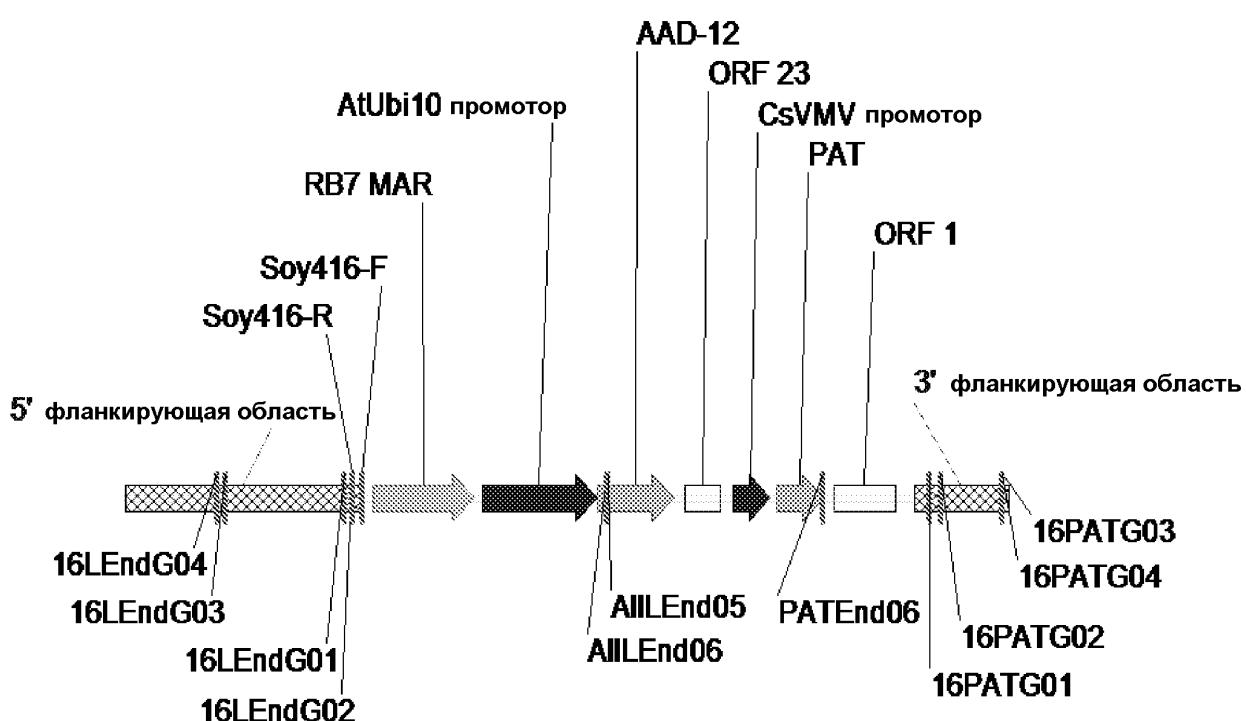


Геномная ДНК события DAS-68416-4 у сои расщепляли EcoRV или Pvull и использовали для создания соответствующих библиотек GENOMEWALKER™, которые использовались в качестве матрицы для амплификации последовательностей ДНК-мишеней

ФИГ. 1



ФИГ. 2



Схематическая диаграмма изображает положения праймеров для подтверждения полноразмерной последовательности события DAS-68416-4 у сои в направлении от 5'- к 3'- границе

ФИГ. 3



Делеция 55 п.н. из геномной ДНК родителя

Схематическая диаграмма изображает положения праймеров для подтверждения последовательности участка вставки
AAD-12-события DAS-68416-4 у сои

ФИГ. 4