

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 10 月 2 日 (02.10.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/154115 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/11 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/073891
- (22) 国际申请日: 2014 年 3 月 21 日 (21.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310097416.5 2013 年 3 月 25 日 (25.03.2013) CN
201310347764.3 2013 年 8 月 12 日 (12.08.2013) CN
- (71) 申请人: 铁岭先锋种子研究有限公司 (TIELING PIONEER SEED RESEARCH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省铁岭市银州区工人街十六委, Liaoning 112000 (CN)。
- (72) 发明人: 邓兴旺 (DENG, Xingwang); 中国北京市朝阳区建国路 91 号金地中心 A 座 19 层, Beijing 100022 (CN)。王海洋 (WANG, Haiyang); 中国北京市朝阳区建国路 91 号金地中心 A 座 19 层, Beijing 100022 (CN)。周君莉 (ZHOU, Junli); 中国北京市朝阳区建国路 91 号金地中心 A 座 19 层, Beijing 100022 (CN)。
- (74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司 (NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED); 中国北

京市西城区金融大街 27 号投资广场 A 座 10 层, Beijing 100033 (CN)。

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

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则 48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: SPT TRANSFORMATION EVENT OF RICE AND DETECTION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 水稻 SPT 转化事件及其检测方法

(57) Abstract: Provided is a transgenic rice plant containing a seed production technical event and the plant genome DNA flanking a transgenic sequence. Additionally provided is the fertility recovery of a homozygous recessive genic male sterile rice plant, and uses of said homozygous recessive genic male sterile rice plant. Specifically provided are rice transformation events SPT-7R-949D and SPT-7R-1425D, a primer pair, a probe pair or a reagent kit for detecting and identifying said rice transformation events, a method for using said primer pair, probe pair or reagent kit to detect a transformed plant and offspring thereof, including a construct, a tissue, an organ, a plant or a seed of a plant related to the rice transformation event, and also a method for constructing male sterile line of rice, a method for restoring the male fertility of a sterile rice plant, and a method for preparing hybrid rice.

(57) 摘要: 提供了含有制种技术事件和位于转基因序列侧翼的植物基因组 DNA 的转基因水稻植物。还提供了纯合隐性核雄性不育水稻植株的育性恢复方法, 及所述纯合隐性核雄性不育水稻植株的用途。具体提供了水稻转化事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D, 用于检测或鉴定所述水稻转化事件的引物对、探针对或试剂盒, 利用所述引物对、探针对或试剂盒检测转化植物及其后代的方法, 包含所述水稻转化事件的构建体、水稻细胞、组织、器官、植物、或其种子, 以及一种构建水稻雄性不育系的方法、一种恢复水稻不育植株雄性育性的方法, 和一种用于制备杂交水稻的方法。

WO 2014/154115 A1

水稻 SPT 转化事件及其检测方法

技术领域

本发明涉及植物分子生物学和育种领域。具体地，本发明的实施方案涉及含有制种技术事件和位于转基因序列侧翼的植物基因组 DNA 的转基因水稻植物。更具体地，本发明涉及纯合隐性核雄性不育水稻植株的育性恢复及其用途。进一步本发明涉及构建水稻雄性不育系、保持系的方法以及转化事件，更具体地，本发明涉及一种构建体，一种水稻细胞、组织或器官，一种构建水稻雄性不育系的方法，一种恢复水稻不育植株雄性育性的方法，一种制备水稻种子的方法，一种转化事件，一种水稻转化事件 SPT-7R-949D，一种水稻转化事件 SPT-7R-1425D，一种用于检测水稻转化事件的引物，一种用于检测水稻转化事件的试剂盒，具体地，利用该试剂盒鉴定插入的 T-DNA 和植物基因组 DNA 的结合区域并进一步鉴定转化事件的种子及其它组织的方法，一种用于制备杂交水稻的方法，以及水稻雄性不育系在制备杂交水稻中的用途。

背景技术

水稻杂交育种中常用的是“三系”和“两系”杂交。“三系”杂交需要特定的恢复系和保持系，育种程序和生产环节复杂，选育新不育系及新组合的周期长、效率低，种质资源的利用率低于 5%。另外，三系杂交稻杂种优势较弱，不育细胞质较单一，存在某种毁灭性病虫害暴发的潜在危险。“两系”杂交水稻由于不受恢复系、保持系之间关系的制约，亲本的遗传多样性得到明显改善，选育出高产杂交稻组合的速度明显加快，促进了超级杂交稻的研究和生产。但目前“两系”杂交中采用的不育系多为“光温敏”不育系，其育性受环境中的温度和光照影响。这些环境因素的不稳定会直接影响杂交种子的纯度和数量，加大制种风险，严重时会使企业和农民造成重大经济损失，限制“两系”杂交稻的大面积推广。而且利用目前技术所能选用的两系杂交稻不育系十分有限，例如粳稻品种中几乎没有很好的两系杂交组合，限制了品种资源的充分利用。因而，培育不受环境影响且可自主繁殖的稳定不育系已成为限制“两系”杂交技术广泛应用的技术瓶颈。

因而，目前的水稻杂交技术仍有待改进。

外源基因在植物中的表达是受其在植物基因组中的插入位点影响的,这有可能是由于插入位点周围的染色质结构(如异染色质的结构)或附近的转录调节元件(如增强子)的调节引起的(Weising et al., Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. (1988) *Ann. Rev. Genet* 22:421-477),例如,可以观察到在外源基因转化得到的插入位点不同的众多株系之间,外源基因的表达水平存在较大的差别,也可以观察到外源基因在不同转化株系中存在时空的表达差异,且这种差异不是人为选用的启动子等表达调控元件构建的表达框造成的。同时,外源基因在植物基因组的不同位置的整合会对植物的整体表型造成影响,比如,外源基因在植物基因组中的插入会使插入位点处的植物内源基因的表达收到影响。因此,在转化事件的创制过程中,有必要生产成千上万的独立转化株系,通过筛选大量的转化株系,鉴定得到符合产业化要求的一个最优化事件,具备合乎要求的外源基因整合位点和表达水平/模式,同时对植物的其它表型不造成影响。进一步,可以通过回交转育的常规育种方法,将该最优化事件的外源基因通过杂交转育到其他遗传背景的品种中去,而这些杂种的子代被赋予了最初转化体的转基因表达特性,同时,还保持了原有品种的各种优良性状。

在植物或种子或其子代或有性杂交的子代中,特异性检测特定转化事件的存在或不存在是非常重要的,事件特异性检测方法可以鉴定插入的外源 DNA 和受体基因组之间独特的接合(junction),这不仅涉及转基因自身,还涉及其在宿主植物或种子的基因组中的插入整合位置。此外,用于检测特定事件的方法对于符合植物食品的上市前许可和标签的规定、或环境监测及监测田地中作物的性状等也是非常有帮助的。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一或至少提供一种有用的商业选择。为此,本发明的一个目的在于提出一种具有能够有效构建新型稳定的隐性水稻雄性不育系和充分利用水稻种质资源用于杂交育种、提高杂交种纯度的手段。

本发明是基于发明人的下列发现而完成的:发明人以纯合隐性核雄性不育水稻突变体为转化受体材料,将紧密连锁的 3 个目标基因转化至该不育水稻突变体受体植株中。所述 3 个目标基因分别是水稻育性恢复基因、花粉失活基因和颜色

标记筛选基因。其中，育性恢复基因可使不育的转化受体育性恢复，花粉失活基因可使含有转化的外源基因的花粉失活，即失去授精能力，筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地、稳定地生产不育系。例如，根据本发明的一个实施例，可以以水稻核隐性不育 ms26 / ms26 突变体为转化受体材料，将紧密连锁的 3 个目标基因转化至该不育系：其中，育性恢复基因 OsCYP704B2（对应野生型的水稻 MS26 基因）可使转化受体育性恢复；花粉失活基因 Zm-AA1 可使含有外源基因的花粉失活，即失去授精能力；荧光色选基因 DsRed(r) 用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地稳定地生产不育系。由于该技术利用生物技术生产非转基因产品，解决了水稻杂交制种过程中面临的瓶颈问题，即三系法资源利用率低而两系法中不育系育性不稳定的问题。

由此，在本发明的一个实施例，本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包括：第一表达盒，所述第一表达盒含有第一核酸分子，所述第一核酸分子编码水稻雄性不育恢复基因；以及第二表达盒，所述第二表达盒含有第二核酸分子，所述第二核酸分子编码花粉失活基因。利用该构建体，能够有效地将水稻雄性不育恢复基因和花粉失活基因引入到纯合隐性核雄性不育水稻突变体植株中，从而得到携带外源基因的可育株作为保持系，从而可以方便地通过自交源源不断地生产不育系和保持系，另外，不携带外源基因的植株可以用作杂交的母本。由此，可以有效地用于水稻杂交，得到的杂交种也为非转基因。

由此，可以通过常规技术，例如农杆菌介导法，将前述构建体引入到水稻的细胞、组织或器官中，以便得到可以后续用于研究、杂交的样本。因而，在本发明的第二方面，本发明提出了一种水稻细胞、组织或器官。根据本发明的实施例，该水稻细胞、组织或器官中含有前面所述的构建体。

在本发明的第三方面，本发明提出了一种构建水稻雄性不育系的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：将前面所述的构建体引入到第一水稻纯合隐性雄性不育植株中，以便获得携带外源基因的第二水稻植株，所述第二水稻植株能够产生可育雄性配子，因此能够进行自体受精，可以得到携带外源基因的种子和不携带外源基因的种子，两者各占 50%。其中，不携带外源基因的种子可以作为

水稻雄性不育系。从而，可以方便地通过自交源源不断地生产不育系和保持系，另外，不携带外源基因的植株可以用作杂交的亲本。由此，所述方法可以有效地用于水稻杂交。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种恢复水稻不育植株雄性育性的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：将前面所述的构建体引入到水稻纯合隐性雄性不育植株中。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种制备水稻种子的方法。根据本发明的实施例，该方法包括以下步骤：将前面所述的构建体引入到水稻植株中；以及将所述水稻植株自体受精，以获得含有前面所述的构建体的种子。在本发明的第六方面，本发明提出了一种转化事件。根据本发明的实施例，所述转化事件是通过将前面所述的构建体引入到水稻纯合隐性雄性不育植株中获得的，其中，所述构建体包括：第一表达盒，所述第一表达盒含有第一核酸分子，所述第一核酸分子编码水稻雄性不育恢复基因；以及第二表达盒，所述第二表达盒含有第二核酸分子，所述第二核酸分子编码花粉失活基因。利用该构建体，能够有效地将水稻雄性不育恢复基因和花粉失活基因引入到纯合隐性核雄性不育水稻突变体植株中，从而得到携带外源基因的可育株作为保持系，从而可以方便地通过自交源源不断地生产不育系和保持系，另外，不携带外源基因的植株可以用作杂交的母本。由此，所述构建体可以有效地用于水稻杂交。由此，可以通过常规技术，例如农杆菌介导法，将前述构建体引入到水稻的细胞、组织或器官中，以便得到可以后续用于研究、杂交的样本。

在本发明的第七方面，本发明提出了一种水稻转化事件 SPT-7R-949D。根据本发明的实施例，该水稻转化事件 SPT-7R-949D 的基因组中包含选自 SEQ ID NO: 13、14、17、18 和 53 的至少一种 DNA 序列。由此，根据本发明的实施例，本发明提出了一种植物，其中，所述植物包含水稻转化事件 SPT-7R-949D。即在该植物的基因组中包含了选自 SEQ ID NO: 13、14、17、18 和 53 的至少一种 DNA 序列或其互补序列。并且本发明提出了由该植物衍生得到的种子、细胞和组织。

在本发明的第八方面，本发明提出了一种水稻转化事件 SPT-7R-1425D。根据本发明的实施例，该水稻转化事件 SPT-7R-1425D 的基因组中包含选自 SEQ ID

NO: 15、16、19、20 和 54 的至少一种 DNA 序列。由此,根据本发明的实施例,本发明提出了一种植物,其中,所述植物包含水稻转化事件 SPT-7R-1425D。即在该植物的基因组中包含了选自 SEQ ID NO: 15、16、19、20 和 54 的至少一种 DNA 序列或其互补序列。并且本发明提出了由该植物衍生得到的种子、细胞和组织。

在本发明的第九方面,本发明提出了一种用于检测水稻转化事件的引物。根据本发明的实施例,用于检测水稻转化事件 SPT-7R-949D 的引物,其特征在于,所述引物包含选自 SEQ ID NO: 13、14、17、18、53 或其互补序列的至少一种。用于检测水稻转化事件 SPT-7R-1425D 的引物,其特征在于,所述引物包含选自 SEQ ID NO: 15、16、19、20、54 或其互补序列的至少一种。

在本发明的第十方面,本发明提出了一种用于检测水稻转化事件的试剂盒。根据本发明的实施例,该试剂盒包括前面所述的引物。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

图 1 为根据本发明一个实施例的植物表达载体 pSPT7R 的结构示意图。其中,自右边界,依次包含了 PG47 启动子:: ZM-BT1 导肽:: ZM-AA1 基因:: IN2-1 终止子表达框, OsCYP704B2 基因表达框, 和 END2 启动子:: DsRed(r)基因::PINII 终止子表达框。

图 2 显示了根据本发明一个实施例的可育花粉粒和败育花粉粒(不可育)的 I2-IK 染色结果,其中 SPT-7R-949D 表示 SPT-7R-949D 转化体花粉的染色结果; SPT-7R-1425D 表示 SPT-7R-1425D 转化体花粉的染色结果。

图 3 是转化事件 SPT-7R-949D 中的 T-DNA 插入位点及整合方式示意图。在该转化事件的基因组中,整合了 2 个 T-DNA,分别为图示的 T-DNA1 和 T-DNA2。

图 4 是转化事件 SPT-7R-949D 中 T-DNA 插入序列与邻近基因位置关系及验证引物示意图,其中 SP3 为根据 T-DNA 序列设计的引物, A949B-L-1 和 A949B-R 为根据插入位点侧翼的基因组序列设计的引物,其中引物 A949B-L-1 和 SP3 进行

PCR 扩增获得的片段大小为 981bp,其具体的核苷酸序列如 SEQ ID NO:74 所示;引物 A949B-R 和 SP3 进行 PCR 扩增获得的片段大小为 540bp,其具体的核苷酸序列如 SEQ ID NO:75 所示。

图 5 是转化事件 SPT-7R-1425D 中的 T-DNA 插入位点及插入方式示意图。在该转化事件的基因组中,整合了 1 个 T-DNA,其右边界为 RB,左边界为 LB。

图 6 是转化事件 SPT-7R-1425D 中 T-DNA 插入序列与邻近基因位置关系及验证引物示意图。其中 7RB-3 和 SP3 为根据 T-DNA 序列设计的引物,A1425RB-2 和 A1425LB-2 为根据插入位点侧翼的基因组序列设计的引物,其中引物 A1425RB-2 和 7RB-3 进行 PCR 扩增获得的片段大小为 864bp,其具体的核苷酸序列如 SEQ ID NO:76 所示;A1425LB-2 和 SP3 进行 PCR 扩增获得的片段大小为 954bp,其具体的核苷酸序列如 SEQ ID NO:77 所示。

图 7 是转化事件 SPT-7R-949D 中 T-DNA 上探针位置及酶切位点示意图,7A 显示了目的基因上探针序列位置及 Hind III 酶切位点;7B 显示了色选基因上探针序列位置及 EcoR I 酶切位点。

图 8 是转化事件 SPT-7R-1425D 以 OsCYP704B2 为探针的预期杂交片段大小及 Hind III 酶切位点示意图。

图 9 是转化事件 SPT-7R-1425D 以 Zm-AA1 和 DsRed(r)为探针预期杂交片段大小及 EcoR I 酶切位点示意图。

图 10 是转化事件 SPT-7R-949D T2、T3 和 T4 代植株以目的基因为探针的 Southern blot 结果,其中电泳泳道 1、7 和 13: 分子量标准;2、8 和 14: 阳性对照(质粒 DNA+武运粳 7 号 DNA-BamHI); 3、9 和 15: 阴性对照(武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA -BamHI); 4、5 和 6: SPT-7R-949D -Hind III- T2 代 3 个独立的转基因单株;10、11 和 12: SPT-7R-949D -Hind III- T3 代 3 个独立的转基因单株;16、17 和 18: SPT-7R-949D -Hind III- T4 代 3 个独立的转基因单株。

图 11 是转化事件 SPT-7R-949D T2、T3 和 T4 代植株以色选基因为探针的 Southern blot 结果,其中电泳泳道 1、7 和 13: 分子量标准;2、8 和 14: 阳性对照(质粒 DNA)+武运粳 7 号 DNA-BamHI; 3、9 和 15: 阴性对照(武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA -BamHI); 4、5 和 6: SPT-7R-949D -EcoR I - T2 代 3

个独立的转基因单株；10、11 和 12：SPT-7R-949D -*EcoR*I - T3 代 3 个独立的转基因单株；16、17 和 18：SPT-7R-949D -*EcoR*I - T4 代 3 个独立的转基因单株。

图 12 是转化事件 SPT-7R-1425D T2、T3 和 T4 代植株以 OsCYP704B2 基因为探针的 Southern blot 结果，其中电泳泳道 1、7 和 13：分子量标准；2、8 和 14：阳性对照（质粒 DNA）+武运粳 7 号 DNA- BamHI；3、9 和 15：阴性对照（武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA- BamHI）；4、5 和 6：SPT-7R-1425D -Hind III- T2 代 3 个独立的转基因单株；10、11 和 12：SPT-7R-1425D -Hind III- T3 代 3 个独立的转基因单株；16、17 和 18：SPT-7R-1425D -Hind III- T4 代 3 个独立的转基因单株。

图 13 是转化事件 SPT-7R-1425D T2、T3 和 T4 代植株以 Zm-AA1 基因为探针的 Southern blot 结果，其中电泳泳道 1、7 和 13：分子量标准；2、8 和 14：阳性对照（质粒 DNA）+武运粳 7 号 DNA- BamHI；3、9 和 15：阴性对照（武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA- BamHI）；4、5 和 6：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T2 代 3 个独立的转基因单株；10、11 和 12：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T3 代 3 个独立的转基因单株；16、17 和 18：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T4 代 3 个独立的转基因单株。

图 14 是转化事件 SPT-7R-1425D T2、T3 和 T4 代植株以 DsRed(r)基因为探针的 Southern blot 结果，其中电泳泳道 1、7 和 13：分子量标准；2、8 和 14：阳性对照（质粒 DNA）+武运粳 7 号 DNA- BamHI；3、9 和 15：阴性对照（武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA- BamHI）；4、5 和 6：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T2 代 3 个独立的转基因单株；10、11 和 12：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T3 代 3 个独立的转基因单株；16、17 和 18：SPT-7R-1425D -*EcoR*I - T4 代 3 个独立的转基因单株。

图 15 是 RT-PCR 鉴定 T2 代转化事件 SPT-7R-949D 3 个目标基因表达模式图，其中根为苗期根；茎为苗期茎；叶为苗期叶；P3 期为颖花原基分化期幼穗；P6 期为花粉母细胞减数分裂时期幼穗；P8 期为花粉成熟期幼穗；种子为籽粒成熟期的种子；突变体为武运粳 7 号 ms26/ms26；野生型为武运粳 7 号；空白对照为以水为扩增模板；阳性对照为以转化体基因组 DNA 为扩增模板。

图 16 是 RT-PCR 鉴定 T2 代转化事件 SPT-7R-1425D 3 个目标基因表达模式

图，其中根为苗期根；茎为苗期茎；叶为苗期叶；P3 期为颖花原基分化期幼穗；P6 期为花粉母细胞减数分裂时期幼穗；P8 期为花粉成熟期幼穗；种子为籽粒成熟期的种子；突变体为武运粳 7 号 ms26/ms26；野生型为武运粳 7 号；空白对照为以水为扩增模板；阳性对照为以转化体基因组 DNA 为扩增模板。

图 17 显示了根据本发明一个实施例，水稻核隐性不育 ms26 / ms26 突变体为转化受体材料，通过转基因所得到的转化体通过自交得到不育系的示意图，其中受体 (ms/ms) 指纯合隐性核雄性不育转基因受体材料；保持系含有纯合隐性核雄性不育位点和转基因杂合位点，因此为可育；不育系含有纯合隐性核雄性不育位点且不含转基因，因此为雄性不育；保持系产生的花粉一半含有转基因，一半不含有转基因；保持系结实产生 50% 的不育系种子和 50% 的保持系种子。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

本文提到的所有参考文献都通过引用并入本文。

除非有相反指明，本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。除非有相反指明，本文所使用的或提到的技术是本领域普通技术人员公知的标准技术。材料、方法和例子仅作阐述用，而非加以限制。

术语“事件”指包括异源 DNA 的原始转化体和该转化体包括但不限于通过自交或杂交或无性繁殖产生的子代。通过用异源 DNA，即，包括目标转基因的核酸构建体对植物细胞进行转化，由转基因插入到特定植物基因组中产生的植物群体的再生，和选择以对特定基因组位置的插入为特征的特定的植物，来产生转基因“事件”。因而，术语“事件”还指通过在转化体和另一个包括异源转基因 DNA 和侧翼基因组 DNA 的品种之间进行有性的异型杂交生产的子代。术语“事件”还指来自原始转化体的、包含插入的 DNA 和紧密邻近于插入的 DNA 的侧翼基因组序列的 DNA，期待着将其转移到子代中，该子代作为包括插入的 DNA 的一个亲本系（例如，原始转化体和自交或无性繁殖的子代）与不含有该插入的 DNA 的亲本系进行有性杂交的结果，接受了包括目标转基因的插入 DNA。

术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要

性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是两个或两个以上，除非另有明确具体的限定。

本发明是基于发明人的下列发现而完成的：发明人以水稻核隐性不育突变体为转化受体材料，通过将紧密连锁的 3 个目标基因转化至不育突变体中，其中，育性恢复基因可使转化受体育性恢复，花粉失活基因可使含有外源基因的花粉失活，即失去授精能力，筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地、稳定地生产不育系。例如，根据本发明的一个实施例，可以以水稻核隐性不育 ms26 / ms26 突变体为转化受体材料，将紧密连锁的 3 个目标基因转化至不育系：育性恢复基因 OsCYP704B2 可使转化受体育性恢复，花粉失活基因 Zm-AA1 可使含有外源基因的花粉失活，即失去授精能力，荧光色选基因 DsRed (r) 用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地、稳定地生产不育系。由于该技术利用生物技术生产非转基因产品，解决了水稻杂交制种过程中面临的瓶颈问题，即三系法资源利用率低而两系法中不育系育性不稳定的问题。

由此，在本发明的一个实施例，本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包括：第一表达盒，所述第一表达盒含有第一核酸分子，所述第一核酸分子编码水稻雄性不育恢复基因；以及第二表达盒，所述第二表达盒含有第二核酸分子，所述第二核酸分子编码花粉失活基因。利用该构建体，能够有效地将水稻雄性不育恢复基因和花粉失活基因引入到水稻植株例如水稻纯合隐性雄性不育植株中，从而得到携带外源基因的可育株作为保持系，从而可以方便地通过自交源源不断地生产不育系和保持系。另外，不携带外源基因的植株可以用作杂交之中的亲本。由此，所述构建体可以有效地用于水稻杂交。

在本文中，构建体的形式不受特别限制，根据本发明的具体示例，其可以为质粒、噬菌体、人工染色体、粘粒 (Cosmid)、病毒的至少一种。根据本发明的具体示例，构建体（有时也称为表达载体、遗传载体或载体）呈质粒的形式。质粒作为遗传载体，具有操作简单，可以携带较大片段的性质，便于操作和处理。质粒的形式也不受特别限制，既可以是环形质粒，也可以是线性质粒，即可以是

单链的，也可以是双链的。本领域技术人员可以根据需要进行选择。根据本发明的实施例，可以采用 Ti 载体，例如可以采用将第一和第二表达盒设置在表达载体 pSPT7R 的 T-DNA 之左右边界之间。由此，可以通过农杆菌介导的转化方法将第一和第二表达盒转化至受体植株，例如水稻 ms26 隐性核雄性不育突变体中。由此，可以获得不含除草剂抗性标记基因和抗生素抗性标记基因的水稻转化株系。如此获得的转化株系有如下特点：(1) 转化位点在各世代始终处于杂合状态，因此有一半花粉不含外源基因，一半含有外源基因，含外源基因的花粉失活（即失去授精能力），所以外源基因仅通过雌配子传递至下一代，不会通过花粉漂移到环境中；(2) 转化体自交可结实，所结可育种子（带荧光标记）与不育种子（不带荧光标记）的比例为 1：1，可育株（带有外源基因）用作保持系，可以通过自交方便地、源源不断地生产不育系和保持系，不育株（不含转基因成分）在生产上用作杂交制种的亲本；(3) 因为不育株不含转基因，因此用其生产的杂交种子不含转基因，用此杂交种生产的水稻商品粮食更不含转基因，从而消除了转基因生物安全的隐患。该新型杂交育种体系为充分利用水稻杂种优势提供了切实可行的技术新突破。

在本发明中所使用的术语“核酸”可以是任何包含脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸的聚合物，包括但不限于经过修饰的或者未经修饰的 DNA、RNA，其长度不受任何特别限制。对于用于构建重组细胞的载体，优选核酸为 DNA，因为 DNA 相对于 RNA 而言，其更稳定，并且易于操作。

根据本发明的实施例，水稻雄性不育恢复基因的类型并不受特别限制。在本发明的一个实施例中，所述水稻雄性不育恢复基因编码具有如 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的蛋白质。即，可以采用的水稻雄性不育恢复基因为 OsCYP704B2，由此，可以将其作为水稻受体 ms26 纯合突变体（完全雄性不育）的野生型育性恢复基因。OsCYP704B2 基因编码的蛋白属于细胞色素 P-450 家族，在花药发育的 P8 到 P10 阶段的绒粘层和小孢子中特异表达。该基因突变后会导致绒粘层膨胀，花粉外壁残缺而发育终止及花药角质层终止发育，从而导致植株雄性不育，而雌性育性正常。进一步的化学成分分析发现，在该基因缺失突变体的花药中，几乎检测不到角质单体，进而发现该基因的功能是催化产生含有 16 和 18 个碳链的羟基脂肪酸。

根据本发明的具体实施例,在本发明的一个实施例中,所述水稻雄性不育恢复基因具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列。与野生型的 OsCYP704B2 基因(其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示)相比,SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列引入了三个单核苷酸突变,但不改变其编码的氨基酸序列,这三个单核苷酸突变在 OsCYP704B2 基因编码区上的位置及具体突变分别为:238 位核苷酸 A 突变为 C;240 位的核苷酸 G 突变为 C;243 位的核苷酸 G 突变为 C。发明人惊奇地发现,利用该 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列能够便于在各种分子鉴定中区别外源基因与内源基因,并且能够更有效地使水稻 ms26/ms26 不育受体植株的育性得到恢复。水稻受体 ms26 纯合突变体是经过辐射诱导所得,突变是由 3103 bp 缺失(包含 OsCYP704B2 大部分片段)导致(缺失区段物理位置:ensembl plants oryza japonica group version 64.6(MSU6) chromosome 3: 3,701,319 -3,704,421)。大片段缺失突变使回复突变的概率极低,因此不育性状稳定,从而保障了不育系的稳定性,降低杂交制种风险。

在本发明的一个实施例中,所述第一表达盒还可以进一步包括:第一启动子,所述第一启动子与所述第一核酸分子可操作地相连,所述第一启动子为雄配子特异性启动子;以及第一终止子,所述第一终止子与所述第一核酸分子可操作地相连。根据本发明的实施例,第一启动子和第一终止子的类型并不受特别限制。根据本发明的一个实施例,对于 OsCYP704B2 基因,可以采用 OsCYP704B2 的内源启动子、ORF 区及终止区的序列,均为野生水稻基因组序列。在本发明的一个实施例中,所述第一启动子具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列。在本发明的一个实施例中,所述第一终止子具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。发明人惊奇地发现,利用该启动子和终止子的组合,能够进一步显著地提高表达相应蛋白的效率,进而能够提高利用构建体构建不育系的效率,并且能够更有效地使水稻 ms26/ms26 不育受体植株的育性得到恢复。

根据本发明的实施例,花粉失活基因的类型并不受特别限制。根据本发明的实施例,所述花粉失活基因编码具有如 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的蛋白质。由此,可以编码 Zm-AA1 所编码的 α -淀粉酶。 α -淀粉酶属于糖基水解酶。该基因是从授粉 10 天后的玉米胚和胚乳的 cDNA 文库中分离得到,其功能是催化水解多糖分子(例如淀粉)的(1-4)- α -D-葡萄糖苷。玉米内源的 Zm-AA1 基因

主要在萌发的种子的盾片组织中表达，玉米花粉中检测不到该基因的表达。根据本发明的实施例，所述花粉失活基因具有如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列。由此，可以进一步提高表达相应蛋白的效率。根据本发明的实施例，第二表达盒进一步包括：第二启动子，所述第二启动子与所述第二核酸分子可操作地相连，所述第二启动子为花粉特异性启动子；以及第二终止子，所述第二终止子与所述第二核酸分子可操作地相连。由此，可以更有效的提高相应基因的表达效率。另外，根据本发明的实施例，在第二表达盒中还可以进一步包括编码导肽的序列，由此，第二表达盒可以有效地编码具有导肽的花粉失活蛋白，由此，可以使得目的基因（花粉失活基因）能够被靶向定位到特定的细胞器中。例如，根据本发明的实施例，编码导肽的序列具有如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列（来自于玉米的 brittle-1 基因的编码导肽（TP）的序列）。由此，可以有效地将所表达的蛋白靶向淀粉体，分解花粉中的淀粉，从而使花粉失去活力，丧失授精能力，造成转基因花粉失活。进而，根据本发明的具体实施例，该基因在玉米花粉特异性启动子 PG47 驱动下，与来自于玉米的 brittle-1 基因的编码导肽（TP）的序列及终止子 IN2-1 组成表达框，可在发育后期的成熟花粉中特异性表达淀粉酶，并靶向淀粉体，分解花粉中的淀粉，从而使花粉失去活力，丧失授精能力，造成转基因花粉失活。该设计使得所有含有此基因的转基因花粉失活，不能授精还能严格防止基因漂移等生物安全问题，失活的花粉不能与周围其它植株或杂草授粉，因而转基因不能通过花粉漂移到环境中。

另外，根据本发明的实施例，构建体还可以进一步包括：第三表达盒，所述第三表达盒包含第三核酸分子，所述第三核酸分子编码筛选基因，所述筛选基因为发光基因。由此，便于通过筛选基因的表达来确定植物及其部分是否含有构建体所引入的基因。

根据本发明的实施例，可以采用选自红色荧光基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因、花青素 p1 基因和草丁膦乙酰转移酶编码基因的至少一种作为筛选基因。在本发明的一个实施例中，可以采用红色荧光蛋白基因作为筛选基因。红色荧光蛋白基因（DsRed），来源于礁珊瑚（*Discosoma* sp.），是表达框内唯一非粮食作物来源的基因序列。红色荧光蛋白最大吸收波长为 558 nm，最大发射波长为 583 nm。将 DsRed 编码的氨基酸

序列通过与过敏原及毒蛋白序列比对显示,相似性极低,无毒性及致敏性。DsRed 常用作遗传转化的筛选基因,从未发生过转基因生物安全事项。在本发明的一个实施例中,所述筛选基因具有如 SEQ ID NO: 1 所述的核苷酸序列。由此,可以更加有效地表达红色荧光蛋白,增强 DsRed 基因在水稻中的表达。SEQ ID NO: 1 所述的核苷酸序列与野生型 DsRed 基因(其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示)相比,具有两个单核苷酸突变,命名为 DsRed(r)。这两个单核苷酸突变分别为:由第 21 位碱基 C 转换为 G、由第 315 位碱基 G 转换为 C。发明人惊奇地发现,可以更加有效地表达红色荧光蛋白,增强红色荧光蛋白基因在水稻中的表达。

在本发明的一个实施例中,所述第三表达盒进一步包括:第三启动子,所述第三启动子与所述第三核酸分子可操作地相连,所述第三启动子为愈伤组织或种子特异性的启动子;第三终止子,所述第三终止子与所述第三核酸分子可操作地相连。在本发明的一个实施例中,所述第三启动子具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。在本发明的一个实施例中,所述第三终止子具有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列。由此,根据本发明的一个实施例,DsRed(r)的开放读码框连接于来自玉米且为愈伤组织和种子(胚和胚乳)特异性启动子 END2 和来自马铃薯的终止子 Pin II 之间,重组成 DsRed(r)基因表达盒(END2::DsRed(r)::PINII)。含有该表达框的水稻种子在荧光激发下呈现非常容易辨认的红色,因此该表达框在本发明中用于辨认和分选保持系和不育系种子。

由此,根据本发明的实施例,可以利用根据本发明的实施例的构建体,以非转基因隐性核雄性不育水稻(ms26/ms26)作为转化的受体,进行遗传转化,得到整合含有以下紧密连锁的三个外源基因 DsRed(r), Ms26, Zm-AA1 的水稻保持系, Ms26 即 OsCYP704B2 育性基因。外源基因的插入与内源雄性不育位点(ms26/ms26)是非连锁的,因此得到的转基因水稻保持系含有独立的纯合的 ms26 隐性不育位点及杂合的外源基因(包括 OsCYP704B2 基因)整合位点。

由此,可以通过常规技术,例如农杆菌介导法,将前述构建体引入到水稻的细胞、组织或器官中,以便得到可以后续用于研究、杂交的样本。因而,在本发明的第二方面,本发明提出了一种水稻细胞、组织或器官。根据本发明的实施例,该水稻细胞、组织或器官中含有前面所述的构建体。在本发明的一个实施例中,所述水稻细胞、组织或器官来自水稻纯合隐性雄性不育植株。在本发明的一个实

施例中，所述水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。由此，本发明的水稻细胞、组织或器官，可以有效地用于构建雄性不育株。前面关于构建体所描述的特征和优点，也适用于该水稻细胞、组织或器官，不再赘述。

由此，在本发明的第三方面，本发明提出了一种构建水稻雄性不育系的方法。根据本发明的实施例，参考图 17，该方法包括：将前面所述的构建体引入到第一水稻纯合隐性雄性不育植株中，以便获得携带外源基因的第二水稻植株，所述第二水稻植株能够产生可育雄性配子，并且第二水稻植株中的外源基因处于杂合状态，因此第二水稻植株中有一半花粉不含外源基因，一半含有外源基因，含外源基因的花粉失活（即失去授精能力）。进而培育所得到的第二水稻植株，通过第二水稻植株即转化体的自交受精，可以得到不携带外源基因的种子，从而构建水稻雄性不育系。根据本发明的实施例，第一水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。另外，根据本发明的实施例，可以通过荧光检测进行分拣的步骤，即通过检测水稻种子是否携带发光基因，例如是否发出荧光来进行分拣，区分其是否携带外源基因。前面关于构建体所描述的特征和优点，也适用于该方法，不再赘述。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种恢复水稻不育植株雄性育性的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：将前面所述的构建体引入到水稻纯合隐性雄性不育植株中。在本发明的一个实施例中，所述水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。前面关于构建体所描述的特征和优点，也适用于该方法，不再赘述。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种制备水稻种子的方法。根据本发明的实施例，该方法包括以下步骤：将前面所述的构建体引入到水稻植株中；以及将所述水稻植株自体受精，以获得含有前面所述的构建体的种子。在本发明的一个实施例中，所述水稻植株为水稻纯合隐性雄性不育植株。在本发明的一个实施例中，所述水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种转化事件。根据本发明的实施例，所述转化事件是通过将前面所述的构建体引入到水稻纯合隐性雄性不育植株中获得的。在本发明的一个实施例中，所述水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。在本发明的一个实施例中，所述转化事件为选自

SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的至少一种。在本发明的一个实施例中，通过农杆菌介导法引入所述构建体。

根据本发明的实施例，本发明利用农杆菌转化法将紧密连锁的 OsCYP704B2、ZM-AA1 及 DsRed(r) 基因转化到水稻中，获得了遗传稳定的 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 转基因水稻株系。采用 TAIL-PCR 技术，对 T1 代植株 T-DNA 插入位置的旁侧序列进行了扩增，获得旁侧序列；将获得的旁侧序列进行测序分析，并与数据库 (MSU Rice Genome Annotation Project Release 7, 发布时间 2011 年 10 月 31 日, ftp://ftp.plantbiology.msu.edu/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs/pseudomolecules/version_7.0/) 中水稻基因组序列进行比对，发现 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的 T-DNA 插入位点分别定位在第 3 号染色体短臂近着丝粒处 (物理位置为 Chr3: 14,746,015-14,746,027) 和第 1 号染色体长臂远端 (物理位置为 Chr1: 42,215,016-42,215,095)，两者均未插入水稻内源基因内部；而后，对接合区域进行 PCR 扩增以验证外源 T-DNA 插入位置并初步推测 T-DNA 整合方式，即以旁侧序列及 T-DNA 插入序列之间为靶序列进行 PCR 扩增，结果与预期相符，进一步证实了 T-DNA 插入位点的正确性，并且显示 SPT-7R-949D 为反向串联的双拷贝整合，而 SPT-7R-1425D 内 T-DNA 为单拷贝插入。

由此，在本发明的第七方面，本发明提出了一种水稻转化事件 SPT-7R-949D。根据本发明的实施例，该水稻转化事件 SPT-7R-949D 的基因组中包含选自 SEQ ID NO: 13、14、17、18 和 53 的至少一种 DNA 序列。另外，根据本发明的实施例，本发明提出了一种植物，其中，所述植物包含水稻转化事件 SPT-7R-949D。即在该植物的基因组中包含了选自 SEQ ID NO: 13、14、17、18 和 53 的至少一种 DNA 序列或其互补序列。并且本发明提出了由该植物衍生得到的种子、细胞和组织。在本发明的第八方面，本发明提出了一种水稻转化事件 SPT-7R-1425D。根据本发明的实施例，该水稻转化事件 SPT-7R-1425D 的基因组中包含选自 SEQ ID NO: 15、16、19、20 和 54 的至少一种 DNA 序列。另外，根据本发明的实施例，本发明提出了一种植物，其中，所述植物包含水稻转化事件 SPT-7R-1425D。即在该植物的基因组中包含了选自 SEQ ID NO: 15、16、19、20 和 54 的至少一种 DNA 序列或其互补序列。并且本发明提出了由该植物衍生得到的种子、细胞

和组织。

另外，本发明还提供了一种转基因检测方法及其组合物，用于检测来自水稻事件 SPT-7R-949D 的植株或种子，或来自该转基因植株的部分或种子的产物的转基因/基因组 DNA 连接区的检测。转化事件 SPT-7R-949D，其完整外源插入序列为如 SEQ ID NO: 53 所示，其 T-DNA 区与插入位点的 5'侧翼序列构成的连接序列（又称嵌合 DNA 分子）如 SEQ ID NO: 17 所示，其中第 1-10 位的核苷酸序列为水稻内源基因组 DNA，第 11-20 位的核苷酸序列为外源插入的 T-DNA 序列；与 3'端侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 18 所示，其中第 1-10 位的核苷酸序列为外源插入的 T-DNA 序列，第 11-20 位的核苷酸序列为水稻内源基因组 DNA。在本发明中，上述连接序列还可以在 SEQ ID NO:17 和 18 的基础上，包括更长的基因组 DNA 序列和外源插入的 T-DNA 序列，更具体的，所述外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 5'侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 13 所示，其中 SEQ ID NO:13 的第 884-903 位核苷酸序列如 SEQ ID NO:17 所示；所述外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 3'侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 14 所示，其中 SEQ ID NO:14 的第 497-516 位核苷酸序列如 SEQ ID NO:18 所示。所有这些序列以及包含这些序列的植物和种子构成本发明的一个方面。由此，本发明提供了一种新的 DNA 序列，该序列来自转化事件 SPT-7R-949D 的 DNA 转基因/基因组区域的 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 14 或其互补 DNA 分子。在其基因组中包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 14 或其互补 DNA 分子的水稻植株和种子均在本发明的保护范围之内。

本发明还提供了一组 PCR 引物用于转化事件 SPT-7R-949D 的 DNA 检测，其中，该一组 PCR 引物包含第一 PCR 引物和第二 PCR 引物，其中第一 PCR 引物包含 SEQ ID NO: 13 的 T-DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸，第二 PCR 引物来自 SEQ ID NO: 13 的 5'侧翼水稻基因组 DNA 区域的任何部分的类似长度的连续多核苷酸，这些核酸分子作为引物分子在一起进行 PCR 扩增时是有效的。或是第一 PCR 引物包含 SEQ ID NO: 14 的 T-DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸，第二 PCR 引物来自 SEQ ID NO: 14 的 3'侧翼水稻基因组 DNA 区域的任何部分的类似长度的连续多核苷酸，该一组 PCR 引物在一起进行 PCR 扩增时是有效的。或是第一 PCR 引物和第二 PCR

引物均来自 SEQ ID NO:53, 包含序列 SEQ ID NO: 53 的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸, 该一组 PCR 引物在一起进行 PCR 扩增时是有效的。通过使用上述引物进行 PCR 获得的扩增产物, 可以用于检测出水稻转化事件 SPT-7R-949D。所述 DNA 扩增产物中包含部分或全部的 SEQ ID NO:13、14、17、18 或 53 所示的 DNA 序列。

SEQ ID NO: 13 和 17 覆盖 (span) 基因组侧翼 DNA 和插入 T-DNA 之间的 5' 接点 (junction)。SEQ ID NO: 17 相应于 SEQ ID NO: 13 的位置 884-903。

SEQ ID NO: 13 长度为 1444 个核苷酸。其包含 5' 侧翼基因组区域的 893 个核苷酸(位置 1-893)和 T-DNA 插入序列的 551 个核苷酸(位置 894-1444)。SEQ ID NO: 13 的位置 894 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 53) 的位置 1。SEQ ID NO: 13 的位置 1444 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 53) 的位置 551。

SEQ ID NO: 14 和 18 覆盖基因组侧翼 DNA 和插入 T-DNA 之间的 3' 接点。SEQ ID NO: 18 相应于 SEQ ID NO: 14 的位置 497-516。

SEQ ID NO: 14 长度为 959 个核苷酸。其包含 T-DNA 插入序列的 506 个核苷酸(位置 1-506)和 3' 侧翼基因组区域的 453 个核苷酸(位置 507-959)。SEQ ID NO: 14 的位置 1 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 53) 的位置 19,199。SEQ ID NO: 14 的位置 506 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 53)的位置 19,704。

本发明还提供了一种转基因检测方法及其组合物, 用于检测来自水稻事件 SPT-7R-1425D 的植株或种子, 或来自该转基因植株的部分或种子的产物的 DNA 转基因/基因组连接区的检测。转化事件 SPT-7R-1425D, 其完整外源插入序列如 SEQ ID NO: 54 所示, 其外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 5' 侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 其中第 1-10 位的核苷酸序列为水稻内源基因组 DNA, 第 11-20 位的核苷酸序列为外源插入的 T-DNA 序列; 外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 3' 端侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 20 所示, 其中第 1-10 位的核苷酸序列为外源插入的 T-DNA 序列, 第 11-20 位的核苷酸序列为水稻内源基因组 DNA。在本发明中, 上述连接序列还可以在 SEQ ID NO:19 和 20 的基础上, 包括更长的基因组 DNA 序列和外源插入的 T-DNA 序列, 更具体的, 所述外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 5' 侧翼序列构成的连接序列可以如 SEQ ID NO: 15 所示, 其中 SEQ ID NO:15 的第 817-836 位核苷酸序列如 SEQ ID

NO:19 所示；所述外源插入 T-DNA 序列与插入位点的 3'侧翼序列构成的连接序列如 SEQ ID NO: 16 所示，其中 SEQ ID NO:16 的第 398-417 位核苷酸序列如 SEQ ID NO:20 所示。所有这些序列以及包含这些序列的植物和种子构成本发明的一个方面。由此，本发明提供了一种新的 DNA 序列，该序列来自转化事件 SPT-7R-1425D 的 DNA 转基因/基因组区域的 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 54 或其互补 DNA 分子。在其基因组中包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 54 或其互补 DNA 分子的水稻植株和种子均在本发明的保护范围之内。

本发明还提供了一组 PCR 引物用于转化事件 SPT-7R-1425D 的 DNA 检测，该组 PCR 引物包括第三 PCR 引物和第四 PCR 引物。其中第三 PCR 引物包含 SEQ ID NO: 15 的 T-DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸，第四 PCR 引物来自 SEQ ID NO: 15 的 5'侧翼水稻基因组 DNA 区域的任何部分的类似长度的连续多核苷酸，这些核酸分子作为引物分子在一起进行 PCR 扩增时是有效的。或是第三 PCR 引物包含 SEQ ID NO: 16 的 T-DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸，第四 PCR 引物来自 SEQ ID NO: 16 的 3'侧翼水稻基因组 DNA 区域的任何部分的类似长度的连续多核苷酸，该组 PCR 引物作为引物分子在一起进行 PCR 扩增时是有效的。或是第三 PCR 引物和第四 PCR 引物均来自 SEQ ID NO:54，包含序列 SEQ ID NO: 54 的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸，该组 PCR 引物在一起进行 PCR 扩增时是有效的。通过使用上述引物进行 PCR 获得的扩增产物，可以用于检测水稻转化事件 SPT-7R-1425D。所述扩增产物中包含部分或全部的 SEQ ID NO: 15、16、19、20 或 54 所示的 DNA 序列。

SEQ ID NO: 15 和 19 覆盖基因组侧翼 DNA 和插入 T-DNA 之间的 5'接点。SEQ ID NO: 19 相应于 SEQ ID NO: 15 的位置 817-836。

SEQ ID NO: 15 长度为 1259 个核苷酸。其包含 5'侧翼基因组区域的 826 个核苷酸(位置 1-826)和 T-DNA 插入序列的 433 个核苷酸(位置 827 – 1259)。SEQ ID NO: 15 的位置 827 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 54) 的位置 1。SEQ ID NO: 15 的位置 1259 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 54)的位置 433。

SEQ ID NO: 16 和 20 覆盖基因组侧翼 DNA 和插入 T-DNA 之间的 3'接点。

SEQ ID NO: 20 相应于 SEQ ID NO: 16 的位置 398-417。

SEQ ID NO: 16 长度为 1280 个核苷酸。其包含 T-DNA 插入序列的 407 个核苷酸(位置 1-407)和 3'侧翼基因组区域的 873 个核苷酸(位置 408 – 1280)。SEQ ID NO: 16 的位置 1 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 54)的位置 10,530。SEQ ID NO: 16 的位置 407 相应于 T-DNA 插入序列(SEQ ID NO: 54)的位置 10,936。

在本文中所使用的术语“引物”是分离的多核酸，其通过核酸杂交与互补的目标多核酸链退火形成引物和目标多核酸链的杂交体，然后通过聚合酶，例如 DNA 聚合酶沿目标多核酸链延伸。本发明的引物对涉及它们用于扩增目标多核酸分子的扩增的用途，例如，通过聚合酶链式反应 (PCR) 或其他常规的核酸扩增方法。

本发明的引物可以在严格条件下与目标 DNA 序列杂交。可使用任何常规的核酸杂交或扩增方法可以用于鉴定样品中来自 SPT-7R-949D 事件或 SPT-7R-1425D 的 DNA 的存在。核酸分子或其片段能够在某些情况下与其他核酸分子特异性杂交。如此处使用的，如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构并且有足够长度以在高严格条件下维持这种结构，则称为两个核酸分子能相互特异性地杂交。如果核酸分子显示出完全的互补性，则称核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。如此处使用的，当一个分子的每一个核苷酸与另一个分子的核苷酸互补时，称为分子显示出“完全的互补性”。如果分子的相互杂交具有足够的稳定性以允许它们在至少常规的“低严格”条件下保持相互的退火，称两个分子是“最低度互补的”。类似地，如果分子的相互杂交具有足够的稳定性以允许它们在常规的“高严格”条件下保持相互的退火，称所述分子是“互补的”。Sambrook et al., 1989, and by Haymes et al. (1985) 描述了常规的严格条件。因而从完全互补性的偏离是可允许的，只要这种偏离不完全地排除分子形成双链结构的能力。为了使核酸分子作为引物或探针，仅需在序列中充分的互补，以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

如此处使用的，基本上同源的序列是在高度严格条件下与其相比较的核酸序列的互补物特异性杂交的核酸序列。促进 DNA 杂交的适合的严格条件，例如， $6.0 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 约 45°C ，之后是在 50°C 用 $2.0 \times$ SSC 洗涤，对本领域的技术人员是公知的。例如，洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格的约 $2.0 \times$

SSC、50°C 到高度严格的约 $0.2 \times \text{SSC}$ 、50°C。此外，洗涤步骤中的温度可以从低度严格条件的室温下约 22°C，升高到高度严格条件的约 65°C。温度和盐度可以都变化，或者温度或盐浓度保持不变而另一个变量发生改变。在优选的实施方式中，本发明的核酸将在中度严格条件下，例如在约 $2.0 \times \text{SSC}$ 和约 65°C 下特异性地杂交需要扩增的核酸分子。

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

术语“特异于（目标序列）”是指引物在严格杂交条件下仅与包含目标序列的样品中的目标序列杂交。

如在此使用的，“扩增的 DNA”或“扩增子”是指作为核酸模板的部分的目标核酸序列的核酸扩增的产物。例如，为了确定产自有性杂交的植物是否含有转基因事件 SPT-7R-949D，或采集自田间的样品是否包含 SPT-7R-949D，或植物提取物是否包含 SPT-7R-949D。可以用从植物组织样品或提取物中提取的 DNA 进行使用引物对的核酸 PCR 扩增方法，所述引物对包括来源于邻近插入的异源转基因 DNA 的插入位点的基因组区域的第一引物，和来源于插入的异源转基因 DNA 的第二引物，来产生对于事件 DNA 的存在是诊断性的扩增子。扩增子具有一定长度并具有序列，所述序列对所述事件也是诊断性的。扩增子的长度可根据引物对加上一个核苷酸碱基对、或加上约五十个核苷酸碱基对，或加上约两百五十个核苷酸碱基对，或加上约三百五十个核苷酸碱基对或更多的组合长度而变化。

做为选择，引物对可以来源于插入的 T-DNA 两侧的侧翼基因组序列，以获得包括整个 T-DNA 插入核苷酸序列的扩增子。来自植物基因组序列的引物对的成员可以选自距插入的转基因 T-DNA 分子一定距离内，该距离可以从一个核苷酸碱基对到约两万个核苷酸碱基对间变化。术语“扩增子”的使用要特别排除可在 DNA 热扩增反应中形成的引物二聚物。

可以通过本领域已知的各种核酸扩增反应方法的任一种，包括聚合酶链式反应（PCR）来实现核酸扩增。各种扩增方法是本领域已知的，这些方法以及本领域的其他 DNA 扩增方法可以用于本发明的实践中。可以提供多种技术来检测这

些方法产生的扩增子。一个这种方法是 Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al., 1994), 其中设计一 DNA 寡核苷酸, 其覆盖邻近的侧翼基因组 DNA 序列和插入的 DNA 转基因序列。将寡聚核苷酸固定在微孔平板的孔中。在对目标区域进行 PCR 之后 (使用 T-DNA 插入序列中的一个引物, 和邻近侧翼基因组序列中的一个引物), 单链 PCR 产物可与固定的寡聚核苷酸杂交并充当模板, 用于利用 DNA 聚合酶和特异于期待的下一个碱基的标记的 ddNTP 进行单碱基延伸反应。读出过程可以是基于荧光的或基于 ELISA 的信号。信号指示了由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸导致的插入物/侧翼基因组序列的存在。

另一种方法是 Winge (2000) 描述的 Pyrosequencing 技术。在这个方法中设计一寡核苷酸, 其覆盖邻近的基因组 DNA 和插入物 DNA 接点。使寡核苷酸与来自目标区域的单链 PCR 产物 (一个引物在插入的序列中, 一个在侧翼基因组序列中) 杂交, 在存在 DNA 聚合酶、ATP、硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、腺苷酸 5'磷酸和萤光素的情况下孵育。分别地添加 dNTPs, 测量产生光信号的掺入。光信号指示了由于成功的扩增、杂交和单碱基或多碱基延伸导致的转基因插入物/侧翼序列的存在。

Chen 等 (1999) 描述的荧光偏振是可以用于检测本发明的扩增子的一种方法。使用这种方法设计一寡核苷酸, 其覆盖基因组侧翼和插入的 DNA 接点。使寡核苷酸与来自目标区域的单链 PCR 产物 (一个引物在插入的 DNA 序列中, 一个在侧翼基因组 DNA 序列中) 杂交, 在存在 DNA 聚合酶和荧光标记的 ddNTP 的情况下孵育。单碱基延伸导致 ddNTP 的掺入。利用荧光计测量偏振的变化可以测量掺入。偏振的变化指示了由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸导致的转基因插入物/侧翼基因组序列的存在。

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 被描述为一种对 DNA 序列的存在进行检测和定量的方法, 可以根据厂家提供的说明完全理解。简要地, 设计一 FRET 寡核苷酸探针, 其覆盖基因组侧翼和插入的 DNA 接点。在存在热稳定聚合酶和 dNTP 的情况下, FRET 探针和 PCR 引物 (一个引物在插入的 DNA 序列中以及一个在侧翼基因组序列中) 进行循环。FRET 探针的杂交引起 FRET 探针上荧光部分从淬灭部分裂解和释放。荧光信号指示了由于成功的扩增和杂交产生的侧翼基因组/转基因插入物序列的存在。

在如 Tyangi et al. (1996) 中描述的, Molecular Beacons 已经被用于序列检测中。简要地, 设计一 FRET 寡核苷酸探针, 其覆盖侧翼基因组和插入物 DNA 接点。该 FRET 探针的独特的结构造成其含有二级结构, 该二级结构使荧光和淬灭部分保持邻近。在存在热稳定聚合酶和 dNTP 的情况下, FRET 探针和 PCR 引物 (一个引物在插入的 DNA 序列中以及一个在侧翼基因组序列中) 进行循环。在成功的 PCR 扩增之后, FRET 探针对目标序列的杂交引起探针二级结构的消除和荧光部分与淬灭部分的空间分隔, 产生荧光信号。荧光信号指示了由于成功的扩增和杂交产生的侧翼基因组/转基因插入物序列的存在。

其他描述的方法, 例如 microfluidics 提供了分离和扩增 DNA 样品的方法和设备。光染料用于检测和测定特定的 DNA 分子。包含用于检测 DNA 分子的电子传感器或结合特定 DNA 分子的纳珠并因而可被检测的纳试管 (nanotube) 设备 (WO/06024023) 对于检测本发明的 DNA 分子也是有用的。

由此, 在本发明的第九方面, 本发明提出了一种用于检测水稻转化事件的引物。根据本发明的实施例, 该引物包括选自 SEQ ID NO: 13、14、15、16 及其互补序列的至少一种。由此, 可以通过 PCR 反应有效地对水稻转化事件进行检测, 尤其是可以有效地检测水稻转化事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的至少一种。在本发明的第十方面, 本发明提出了一种用于检测水稻转化事件的试剂盒。根据本发明的实施例, 该试剂盒包括前面所述的引物。

在本发明的第十一方面, 本发明提出了一种用于制备杂交水稻的方法。根据本发明的实施例, 该方法采用水稻雄性不育系, 该水稻雄性不育系是通过前面构建水稻雄性不育系的方法构建的。由此, 可以进一步利用本发明的水稻雄性不育系进行水稻杂交, 提高水稻杂交的效率。前面关于构建体所描述的特征和优点, 也适用于该方法, 不再赘述。

在本发明的第十二方面, 本发明提出了水稻雄性不育系在制备杂交水稻中的用途。根据本发明的实施例, 所述水稻雄性不育系是通过前面构建水稻雄性不育系的方法构建的。由此, 可以进一步利用本发明的水稻雄性不育系进行水稻杂交, 提高水稻杂交的效率。前面关于构建体所描述的特征和优点, 也适用于该用途, 不再赘述。

在本发明的又一方面, 本发明还提出了一种构建水稻雄性不育系的方法。根

据本发明的实施例，该方法包括采用水稻纯合隐性雄性不育植株作为母本，所述水稻纯合隐性雄性不育植株包含 Ms26 基因的纯合隐性等位基因；将母本与轮回亲本进行回交转育，以便获得具有所述轮回亲本性状的水稻雄性不育系，其中，所述轮回亲本不具有 Ms26 基因的纯合隐性等位基因。由此，利用本发明的方法，可以在 MS26 纯合隐性雄性水稻不育系的基础上，发展更多的不同遗传背景的不育系。根据本发明的实施例，利用常规回交育种方法，所有不同类型的水稻都可以创制成相应的智能不育系(即可以源源不断地生产相应的不育系品种)，使杂种优势资源利用达到 95%以上。

本发明还提出了一种含有特定外源 DNA 序列的转基因水稻，所述特定外源 DNA 序列通过水稻转化的方法引入受体植株中，并获得在本文中被称为“事件 SPT-7R-949D”或“SPT-7R-949D”或“949D”或“事件 949D”的事件。转化的植株或种子也可以称为“水稻 SPT-7R-949D”或“水稻 949D”等。本发明还提供了用于鉴定由事件 SPT-7R-949D 所衍生出的子代或是含有所述事件 DNA 的植株的材料和方法。

本发明提出了含有特定外源 DNA 序列的转基因水稻，所述特定的外源 DNA 序列通过水稻转化的方法引入受体植株中，并获得在本文中被称为“事件 SPT-7R-1425D”或“SPT-7R-1425D”或“1425D”或“事件 1425D”的事件。转化的植株或种子也可以称为“水稻 SPT-7R-1425D”或“水稻 1425D”等。本发明还提供了用于鉴定由事件 SPT-7R-1425D 所衍生出的子代或是含有所述事件 DNA 的植株的材料和方法。

本发明的实施例中还提出了一种特异的侧翼序列，所述“侧翼序列”又称为“旁侧序列”，在本发明中，所述侧翼序列可用于开发生物样品中的事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的特异性鉴定方法。在一些实施方案中，还公开了 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的左边界和右边界的侧翼区域序列，这些侧翼序列可用于设计特定的引物和探针。本发明还提供了基于上述特异性引物和探针，对生物样品中是否包含 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 特定外源 DNA 序列进行鉴定的方法。

根据本发明的实施方案记载，本发明还提供了检测样品中与事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 对应的 DNA 是否存在的方法。具体地，所述方

法包括：(a) 将包含 DNA 的样品与 DNA 引物接触，所述 DNA 引物与从包含事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的植株中提取出的基因组 DNA 进行核苷酸扩增反应时，可以产生用于鉴定事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的特定扩增子；(b) 进行核酸扩增反应，产生扩增子；(c) 检测鉴定所述扩增子。

含有事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 中特定的外源插入序列与插入位点处的基因组旁侧序列所构成的连接序列的 DNA 分子，及与所述 DNA 分子同源或互补的序列，均在本发明的保护范围之内。

本发明实施方案中还提出了一种包含事件 SPT-7R-949D 中特定的侧翼序列或连接序列，具体如 SEQ ID NO: 13、14、17 或 18 所示的 DNA 分子，和包含事件 SPT-7R-1425D 中特定的侧翼序列或连接序列，具体如 SEQ ID NO: 15、16、19 或 20 所示的 DNA 分子。本发明实施方案中包括 DNA 序列，所述 DNA 序列由一条转基因插入序列和一条来自插入位点处的侧翼水稻基因组 DNA 组成，所述 DNA 序列可用于设计引物，所述引物可扩增出用于检测植物或植物材料中是否含有事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的扩增子产物。

本发明的实施方案中进一步提出了一种含有事件 SPT-7R-949D 的外源插入 T-DNA 区（其核苷酸序列如 SEQ ID NO:53 所示）的至少 11 个或更多个核苷酸的 DNA 序列，和含有事件 SPT-7R-1425D 的外源插入 T-DNA 区（其核苷酸序列如 SEQ ID NO:54 所示）的至少 11 个或更多个核苷酸的 DNA 序列，或上述 DNA 序列的互补序列，以及与 SPT-7R-949D 的 SEQ ID NO:13、14、17 或 18 所示的侧翼水稻基因组 DNA 序列具有相似长度的 DNA 序列或其互补序列，或是与 SPT-7R-1425D 的 SEQ ID NO:15、16、19 或 20 所示的侧翼水稻基因组 DNA 序列具有相似长度的 DNA 序列或其互补序列。上述 DNA 序列可作为 DNA 扩增中的引物序列。由上述引物所产生的扩增子可分别用于检测事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D。因此，本发明的实施方案也包括由 DNA 引物产生的扩增子，所述 DNA 引物与 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的转基因 T-DNA 区或其特定的侧翼序列同源或互补。

本发明的实施方案中还提出了一种检测样品中对应于事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的 DNA 分子的方法，所述方法包括：(a) 将从植物中提取出的 DNA 样品与 DNA 探针接触，所述探针包含在严谨杂交条件下能与从事件

SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 中提取的 DNA 杂交但在严谨杂交条件下不与对照植株 DNA 杂交的分子；(b) 使样品和探针处于严谨杂交条件；(c) 检测探针与 DNA 的杂交情况。更具体的，本发明实施方案中还提供了检测样品中对应于 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的特定 DNA 分子的方法，所述方法包括 (a) 将探针与样品接触，所述样品为从水稻植株中提取出的 DNA，所述 DNA 探针分子选自事件中特定的序列如连接序列的部分序列，所述 DNA 探针分子在严谨杂交条件下可以与事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的 DNA 杂交，并且在严谨杂交条件下不能与对照水稻植株的 DNA 杂交；(b) 使样品和探针处于严谨杂交条件下；(c) 检测探针和 DNA 的杂交情况。

本发明实施方案进一步提供了一种生物样品中事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的 DNA 的检测试剂盒。所述试剂盒包含可用于 PCR 鉴定程序的第一引物和第二引物，所述第一引物可以特异性识别事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的左边界或右边界侧翼序列，所述第二引物可以特异性识别事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 中的外源插入 DNA 序列。本发明实施方案还提出了另一种检测生物样品中事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的试剂盒，所述试剂盒包含一条特异性探针，所述特异性探针具有对应于以下序列或与以下序列互补的序列：与事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的特异性区域具有 80%-100% 的相似性的序列。对应于特异性区域的探针序列包含事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的部分 5' 或 3' 侧翼部分序列。

本发明实施方案还提出了一种为了其他目的而使用本发明已述及的实施方案中的方法和试剂盒，所述其他目的包括但不限于以下：鉴定植物、植物材料或产品中的事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D，所述产品包括但不限于含有或源自植物的食品或饲料产品（新鲜的或加工过的）；区分出转基因材料和非转基因材料中的转基因材料；以及确定包含水稻事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的植物材料的质量。所述试剂盒还可以含有为了实施检测方法所必需的其他试剂和材料。

另一方面，本发明还提供了一种生产含有事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的子代植株的方法。所述子代植株可以是自交或杂交植株。在其他实施方案中，本发明提出了一种用于事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的标

记辅助育种的方法。另一方面，本发明还提出了一种包含事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的稳定转化的水稻植株。

创制种子生产技术事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的多核苷酸序列连在同样的 DNA 载体上，所述多核苷酸序列插入到水稻基因组的特定位置后获得事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D。在已述染色体位置上携带 SPT-7R-949D 事件的植物含有如 SEQ ID NO:13、14、17 或 18 所示的基因组/转基因插入序列构成的连接序列，在已述染色体位置上携带 SPT-7R-1425D 事件的植物含有如 SEQ ID NO:15、16、19 或 20 所示的基因组/转基因插入序列构成的连接序列。具有事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的基因组插入位点的特性是可以增强育种效率，并且使利用分子标记在育种群体及其子代中追踪转基因插入序列成为可能。本发明还提供了用于水稻事件 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 的植物、植物部分、种子和谷类产品的鉴定、检测和使用的多种方法和组合物。

在一些实施方案中，创制水稻 SPT-7R-949D 或 SPT-7R-1425D 事件的多核苷酸序列还可以通过基因工程的方法进行分子聚集（molecular stack）。在其他实施方案中，所述分子聚集体还可以进一步包含至少一条其他的转基因多核苷酸序列。所述多核苷酸序列可以赋予制种技术其他的特性或赋予转化植株其他植物性状。

在某些实施方案中，可以将目的多核苷酸序列进行任意组合创建分子聚集体，并转化植物以创制出具有所需性状组合的植株，以实现植物性状的聚集。本发明中所述的“性状”，是指特定 DNA 序列或 DNA 序列群组表达后所呈现出的表型。所述生成的组合还可以包括任何一个或多个目的多核苷酸序列的多个拷贝。所述性状聚集组合可以通过任何一种方法创制，包括但不限于通过传统方法进行植物育种，或是通过遗传转化的方法获得。如果序列是通过植物遗传转化来聚集的，则目的多核苷酸可以在任意时间、以任意方向进行组合。所述性状可以通过转化表达盒提供的目的多核苷酸序列在共转化操作步骤中引入。例如，如果要引入两条序列，那么两条序列可以包含在不同的转化表达盒（反式）中，或包含在同一个转化表达盒（顺式）中。所述序列的表达可以由同一个或是不同的启动子驱动。在某些情况，可能希望引入抑制目的多核苷酸序列表达的转化表达盒。也可以通过将抑制表达盒或过表达盒进行任意组合，以产生具有所需性状组合的

植株。本领域技术人员还应该意识到，多核苷酸序列还可以通过位点特异性重组系统在所需的基因组位置进行聚集。上述技术参见专利 WO99/25821、WO99/25854、WO99/25840、WO99/25855 和 WO99/25853，以上全部在此通过引用并入。

需要说明的是，根据本发明实施例的构建体及其用途是本申请的发明人经过艰苦的创造性劳动和优化工作才完成的。具体实施方式述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

具体实施方式

下面根据具体的实施例对本发明进行说明。需要说明的是，这些实施例仅仅是为了说明本发明，而不能以任何方式解释为对本发明的限制。另外，除非特别说明，在下面的实施例中所涉及的方法为常规方法，可以参照《分子克隆实验指南》第三版或者相关文献进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1：载体构建

通过装配下述 DNA 元件，构建如图 1 所示的被称为 pSPT7R 的表达载体：

1) 以 pCAMBIA1300 载体为基础，利用 Xmn I 和 Bgl II 酶切去除 pCAMBIA1300 质粒上的潮霉素抗性基因和花椰菜花叶病毒 35S 启动子序列；

2) 基因表达盒 END2：*DsRed(r)*-PINII，*DsRed(r)* 基因（SEQ ID NO：1）的开放读码框连接于 END2 启动子（SEQ ID NO：2）和 PINII 终止子（SEQ ID NO：3）之间，重组成 *DsRed(r)* 的基因表达盒（END2：*DsRed(r)*：PINII）；

3) *OsCYP704B2* 基因，目标基因 *OsCYP704B2* 及其启动子和终止子的全长核苷酸序列如 SEQ ID NO：4 所示，其中 *OsCYP704B2* 基因的启动子序列如 SEQ ID NO：7 所示，其终止子序列如 SEQ ID NO：8 所示，*OsCYP704B2* 基因的基因组 DNA 序列如 SEQ ID NO：5 所示，其核苷酸序列编码的蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO：6 所示；

4) 基因表达盒 PG47：ZM-BT1：*ZM-AA1*：IN2-1，目标基因 *ZM-AA1*（其核苷酸序列如 SEQ ID NO：9 所示）的开放读码框连接于启动子 PG47（其核苷酸序列如 SEQ ID NO：10 所示）、转运肽 ZM-BT1（其核苷酸序列如 SEQ ID NO：11 所示）

的下游，终止子 IN2-1（其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示）的上游。

具体地，载体 pSPT7R 的构建流程具体描述如下：

第一步，从玉米愈伤组织的 cDNA 中扩增花粉失活基因 *ZM-AA1* 和编码导肽的 ZM-BT1，从玉米基因组 DNA 中扩增获得 PG47 启动子。其中，用于扩增 *ZM-AA1* 的扩增引物为：

F3: CGGTACCCGGGGATCAGATCTCAAGGAAAAGACGTTATGCAG (SEQ ID NO: 37)，方框内为 Bgl II 酶切位点，

R3: AAGGTCGTCCGGGCGGCCTGCGGCCTGGTCCAGGCAC (SEQ ID NO: 38)，其中下划线标示的核苷酸序列为 15bp 的重叠序列；

用于扩增 ZM-TP 的扩增引物为：

F4: CGCCCGGACGACCTTGGGATCG (SEQ ID NO: 39)；

R4: ATGGCGGCGACAATGGCAGTGAC (SEQ ID NO: 40)；

用于扩增 PG47 启动子的引物为：

F5: CATTGTCCCGCCCATGGTGTCTGTATCGATGCTTTAT (SEQ ID NO: 41)，

R5: CGACTCTAGAGGATCTGCACCGGACACTGTCTGGTGG (SEQ ID NO: 42)，其中下划线标示的核苷酸序列为 15bp 重叠序列)。

采用 In-Fusion 的方法将扩增所得到的 *ZM-AA1* 基因，ZM-BT1 导肽，PG47 启动子三个片段连入 BamHI 酶切开的双元载体 pCambia1300 上，得到中间载体 A。

第二步，PCR 扩增人工合成的红色荧光蛋白基因 PINII-*DsRed(r)* 序列，其中人工合成的 PINII-*DsRed(r)* 序列为如 SEQ ID NO: 43 所示，其扩增引物为：

F1: ATTAAACGCCGAATTGCCGCATTCGCAAAACACACC (SEQ ID NO: 44)，

R1: CAAGAACTAGTAACCATGGCCTCCTCCGAGAACGTGA (SEQ ID NO: 45)，其中斜体下划线标示的核苷酸序列为 15bp 的重叠序列。

从玉米基因组 DNA 中扩增 END 2 序列，其扩增引物为：

F2: CTCGGAGGAGGCCATGTTACTAGTTCTTGGGGGACG (SEQ ID NO: 46)，

R2:

CTTTTCCTTGAGATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCAGCTTCGCTTAGTTTTTAGT (SEQ ID NO: 47)，其中斜体下划线标示的核苷酸序列为 15bp 的重叠序列。

采用 In-Fusion 的方法将扩增得到的 PIN II-*DsRed(r)* 片段与来自玉米且为

愈伤组织和种子（胚和胚乳）特异性启动子 END 2 片段同时连入 Xmn I 与 Bgl II 酶切的中间载体 A，得到中间载体 B。

第三步，人工合成 IN2-1 的核苷酸序列，其序列如 SEQ ID NO:48 所示。用 EcoR I 与 BglIII 双酶切人工合成的 IN2-1 序列，其中，人工合成的 IN2-1 序列如下所示：

agatctgacaaagcagcattagtcggttggaagaccactcgtcagtggtgagttgaat
gtttgatcaataaaatacggcaatgctgtaagggtgttttttatgccattgataatacactgtactgt
tcagttgttgaactctatcttagccatgccaaagtgcctttcttattttgaataacattacagcaaaa
agttgaaagacaaaaaaaaaacccccgaacagagtgcctttgggtcccaagctacttttagactgtgttc
ggcgttccccctaaatttctccccctatatctcactcactgtgcacatcagcggttctctttccccctata
tctccacgtcgacgcggccaaatcctgaggatctggtcttcctaaggacccgggatatcgacggggga
tccactagttctagagcggccgggtaccgagctcgaattaattggcgcgccgtttaaactcgcgatcg
atAagggaattccagcacactggcggccgttactagcgagaattc (SEQ ID NO:48)，其中下

划线序列为 IN2-1 序列，其余序列为载体连接区序列，方框标示的序列依次分别为：Bgl II，Asc I，Nru I 和 EcoR I 酶切位点，其中 Bgl II 酶切位点后五个碱基在 IN2-1 序列上，另外有 Asc I，Nru I 和 EcoR I 三个酶切位点在载体连接区序列上。酶切人工合成的 IN2-1 序列所在的质粒，连入同时用 EcoR I 与 Bgl II 双酶切的中间载体 B，得到中间载体 C。

第四步，将 *OsCYP704B2* 基因分为两段，分别是 CYP1 和 CYP2，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:61 所示。从水稻基因组 DNA 中，分别扩增 CYP1 和 CYP2。

其中，CYP1 的扩增引物为：

F6: CGATCGCGATTGGTCGAACACGAGGTAGGCG (SEQ ID NO:49)，方框内为 Nru I 酶切位点；

R6: TCGAAGGACCGCACCGTGACCGGTGACATG (SEQ ID NO:50)，方框内为 Sal I 酶切位点，下划线标识的碱基是为了区分水稻内源的 *OsCYP704B2* 基因序列，并且提高表达效率而特意引入的三个 SNP；

CYP2 的扩增引物为：

F7: CATGTCGACGGTCACGGTCGGTCCTTCGA (SEQ ID NO:51)，方框内为 Sal I 酶切位点，下划线标识的是为了区分水稻内源 CYP 序列，并且提高表达效率而特意引入的三个 SNP；

R7: ATTGGCGCGCGTTTAAACAGGTGGAAGACAAGGTGGTGAGG (SEQ ID NO:52)，方框内为 Asc I 酶切位点

将所得到的两个扩增产物，连 T-载体测序正确后，再分别用 Nru I 与 Sal I，以及 Sal I 和 Asc I 双酶切，同时连入用 Nru I 和 Asc I 双酶切的中间载体 C，即得到 SPT7R 载体，也称为 pSPT7R。

实施例 2：水稻转化

利用热激法将质粒 pSPT7R 转入农杆菌 AGLO 菌株，利用农杆菌介导法对水稻进行共转化(Hiei , et al. Efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. (1994) *Plant J* 6(2):271-282，通过参照将其并入本文)。具体的转化受体材料为水稻 ms26 完全雄性不育纯合突变体，该突变体是经过辐射诱导所得，突变是由 3103 bp 缺失（包含 OsCYP704B2 大部分片段）导致（缺失区段物理位置：ensembl plants oryza japonica group version 64.6(MSU6) chromosome 3: 3,701,319 -3,704,421)。大片段缺失突变使回复突变的概率极低，因此不育性状稳定，从而保障了不育系的稳定性，降低杂交制种风险。利用农杆菌将质粒 pSPT7R 转化水稻受体材料，利用载体中的 DsRed(r) 基因编码的红色荧光蛋白作为筛选标记，通过 3-4 轮的愈伤荧光筛选切割后，分化得到转基因植株，该构建体经过水稻转化得到阳性转基因材料 1000 株以上，进一步通过插入位点、拷贝数、载体骨架污染等分析后，结合田间观察到的花粉失活效果、结实率、种子分离比例等结果，从中优选出两个转基因事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D。

实施例 3：转化事件的花粉育性检测

对实施例 2 中所得到的两个转基因事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 进行观察分析发现，本发明所得到的转基因植株和非转基因对照植株之间没有观察到明显的形态上的不同。

以转化受体品系对应的野生型非转基因水稻品种武运粳 7 号（可育，下面简称为 CK1）和转基因水稻对应的非转基因水稻品系武运粳 7 号 ms26 突变体（不育，下面简称为 CK2）为对照，进行花粉可染率检测。

在水稻开花晚期，从大田的转基因水稻、CK1 及 CK2 小区各随机抽取单株，各株取一朵花，每朵花取 1 个花药，置于载玻片中央，滴加一滴 1%的 I2-IK 溶液，用镊子和解剖针释放花粉后，盖上盖玻片，在显微镜下观察、计数可染色花粉数和花粉总数（图 2 显示了染色后的可育花粉粒和不可育花粉粒）。分别计算转基因水稻、CK1 及 CK2 花粉可染率各材料 3 次重复的平均数的标准差。在 CK1 正常可育和 CK2 正常不育的前提下，通过 χ^2 测验，分析转基因水稻的花粉可染率与理论值（50%）有无显著差异。

结果显示，SPT-7R-949D 株系 T2 代植株上的花粉（T3 代基因型）的可染率如下表 1 所示。本试验利用 I2-KI 染色法对随机抽取的 17 个植株的花粉分离比例（3 次重复的平均数）进行了调查，从表 1 中可以看出，可育对照(CK1)的可育率在 98.6%~100%之间；不育对照(CK2)可育率为 0；通过 χ^2 -检验（自由度为 1），17 个 SPT-7R-949D 单株中，除单株 9 的卡方值（7.454）微高于临界值（3.81）外，其它 16 朵花朵中可育花粉与不育花粉分离比例均在 $P \leq 0.05$ 水平，符合 1 : 1 的比例。

SPT-7R-1425D 株系 T2 代植株上的花粉（T3 代基因型）的可染率如表 2 所示。随机抽取的 17 个植株，计算 3 次重复的平均数。从表 2 中可以看出，可育对照(CK1)的可育率在 95.01%~99.8%之间；不育对照(CK2)可育率为 0；通过 χ^2 -检验（自由度为 1），17 个 SPT-7R-1425D 单株中，除单株 3 的卡方值（6.426）高于临界值（3.81）外，其它 16 朵花朵中可育花粉与不育花粉分离比例均在 $P \leq 0.05$ 水平，符合 1 : 1 的比例。

该结果表明，转化事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 中的 T-DNA 外源基因在各世代均处于杂合状态，因此有一半花粉不含外源基因（可育），一半含有外源基因（不育），且 ZM-AA1 表达框可以有效地分解花粉中的淀粉，从而使含有外源基因的花粉失去活力，丧失授精能力，造成转基因花粉失活。该设计使得上述两个转化事件中，含有 ZM-AA1 基因的转基因花粉全部失活，不能授精还能严格防止基因漂移等生物安全问题，失活的花粉不能与周围其它植株或杂草授

粉，因而转基因也不能通过花粉漂移到环境中。

表 1：转化体 SPT-7R-949D T₂代植株上花粉 I₂-KI 染色分析

植株 编号	CK1(野生型)			CK2 (不育突变体)			SPT-7R-949D			
	可育 花粉数	不育 花粉数	可育率 (%)	可育 花粉数	不育 花粉数	可育率 (%)	可育 花粉数	不育 花粉数	两种花 粉比例	χ^2 值
1	440	1	99.8	0	0	0	437	421	1.04	0.298*
2	432	4	99.1	0	0	0	232	255	0.91	1.086*
3	339	3	99.1	0	0	0	442	398	1.11	2.305*
4	477	5	99.0	0	0	0	215	185	1.16	2.250*
5	628	4	99.4	0	0	0	199	205	0.97	0.089*
6	587	1	99.8	0	0	0	231	235	0.98	0.034*
7	530	0	100.0	0	0	0	254	299	0.85	3.662*
8	364	5	98.6	0	0	0	233	226	1.03	0.107*
9	602	3	99.5	0	0	0	204	263	0.78	7.454
10	441	4	99.1	0	0	0	404	358	1.13	2.777*
11	351	2	99.4	0	0	0	346	385	0.90	2.081*
12	459	2	99.6	0	0	0	213	203	1.05	0.240*
13	422	3	99.3	0	0	0	524	563	0.93	1.399*
14	556	5	99.1	0	0	0	365	399	0.91	1.513*
15	362	1	99.7	0	0	0	291	263	1.11	1.415*
16	733	2	99.7	0	0	0	169	172	0.98	0.026*
17	598	3	99.5	0	0	0	125	123	1.02	0.016*
总数	8321	48	99.4				4884	4953	0.99	

注： $\chi^2_{0.05}(1) = 3.81$ ，* 表示显著水平 0.05 下认为符合 1:1 比例。

表 2：转化体 SPT-7R-1425D T₂代植株上花粉 I₂-KI 染色分析

植株 编号	CK1(野生型)			CK2 (不育突变体)			SPT-7R-1425D			
	可育 花粉数	不育 花粉数	可育率 (%)	可育 花粉数	不育 花粉数	可育率 (%)	可育 花粉数	不育 花粉数	两种花 粉比例	χ^2 值
1	432	4	99.1	0	0	0	227	231	0.98	0.035*
2	339	3	99.1	0	0	0	388	360	1.08	1.048*
3	628	4	99.4	0	0	0	538	458	1.17	6.426
4	590	1	99.8	0	0	0	241	252	0.96	0.245*
5	587	1	99.8	0	0	0	516	485	1.06	0.960*
6	364	5	98.6	0	0	0	224	230	0.97	0.079*
7	441	4	99.1	0	0	0	388	367	1.06	0.584*
8	370	2	99.5	0	0	0	246	238	1.03	0.132*
9	422	3	99.3	0	0	0	316	288	1.10	1.298*
10	598	3	99.5	0	0	0	368	384	0.96	0.340*
11	100	5	95.0	0	0	0	76	88	0.864	0.878*
12	131	6	95.4	0	0	0	98	102	0.961	0.080*
13	78	2	97.4	0	0	0	63	71	0.887	0.478*
14	98	1	99.0	0	0	0	56	47	1.191	0.786*
15	111	1	99.1	0	0	0	52	41	1.268	1.301*
16	123	2	98.4	0	0	0	56	68	0.824	1.161*

17	88	1	98.9	0	0	0	219	192	1.1347	1.774*
总数	5500	48	99.1	0	0	0	4072	3902	1.04	

注: $\chi^2_{0.05}(1) = 3.81$, * 表示显著水平 0.05 下认为符合 1:1 比例。

实施例 4: 荧光种子与非荧光种子分离比例

随机选取通过实施例 2 中所得到的 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的各 24 个 T2 代植株单株, 对其上所结荧光与非荧光种子的分离比例进行了调查, 结果如下表 3 所示。其中, χ^2 值 (df=1) 低于临界值 3.81, 表明 2 个转化体每个植株上所结种子均符合 1:1 分离比。说明本发明中所提供的表达载体各元件作为整体表达良好, 即转化位点在转化事件的各个世代始终处于杂合状态, 因此有一半花粉不含外源基因, 一半含有外源基因, 含外源基因的一半花粉失活 (即失去授精能力), 所以外源基因仅通过雌配子传递至下一代, 不含有外源基因的另外一半花粉可以使转化体自交结实, 所结荧光可育种子与非荧光不育种子的比例为 1:1, 可育株 (带有外源基因) 用作保持系, 可以通过自交方便地、源源不断地生产不育系和保持系, 不育株 (不含转基因成分) 在生产上用作杂交制种的亲本。

表 3: 株系 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 上自交所结荧光种子与非荧光种子数比例

植株编号	SPT-7R-949D				SPT-7R-1425D			
	荧光种子	非荧光种子	比例	χ^2 -检验	荧光种子	非荧光种子	比例	χ^2 -检验
1	461	462	1.00	0.001*	746	738	1.01	0.043*
2	589	586	1.01	0.008*	706	670	1.05	0.942*
3	648	655	0.99	0.038*	523	478	1.09	2.023*
4	566	583	0.97	0.252*	416	406	1.02	0.122*
5	578	563	1.03	0.197*	712	711	1.00	0.001*
6	421	409	1.03	0.173*	599	561	1.07	1.245*
7	837	864	0.97	0.429*	515	545	0.94	0.849*
8	521	543	0.96	0.455*	956	982	0.97	0.349*
9	526	567	0.93	1.538*	472	469	1.01	0.010*
10	601	600	1.00	0.001*	525	542	0.97	0.271*
11	110	122	0.90	0.621*	55	48	1.15	0.476*
12	139	149	0.93	0.347*	118	133	0.89	0.896*

13	106	112	0.95	0.165*	134	118	1.14	1.016*
14	54	65	0.83	1.017*	67	73	0.92	0.257*
15	131	126	1.04	0.097*	109	96	1.14	0.824*
16	111	111	1.00	0.000*	145	144	1.01	0.003*
17	101	106	0.95	0.121*	183	188	0.97	0.067*
18	29	40	0.73	1.754*	135	136	0.99	0.004*
19	152	149	1.02	0.030*	62	45	1.38	2.701*
20	74	91	0.81	1.752*	257	291	0.88	2.109*
21	206	207	1.00	0.002*	46	54	0.85	0.640*
22	185	158	1.17	2.125*	29	32	0.91	0.148*
23	97	73	1.33	3.388*	186	214	0.87	1.960*
24	63	74	0.85	0.883*	255	292	0.87	2.503*

注: $\chi^2_{0.05}(1) = 3.81$, * 表示显著水平在 0.05 以下, 认为符合 1:1 比例。

由上述实施例 3 和实施例 4 可以看出, 本发明实现了其稳定创制水稻雄性不育系和保持系的发明目的。

实施例 5: 转化事件的侧翼序列分析

以实施例 2 中所得到的转基因水稻品系 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 植株的基因组 DNA 为模板, pSPT7R 载体和水稻转化受体武运粳 7 号 ms26 突变体(不育)植株作为阴性对照, 利用 TAIL-PCR 扩增 T-DNA 旁侧序列, 获得转化事件 SPT-7R-949D 及 SPT-7R-1425D 的 T-DNA 旁侧序列, 并分析验证 T-DNA 的整合方式。利用普通 PCR 验证推测的 T-DNA 整合方式, 并分析外源基因是否插入已知水稻内源基因内部。

实验分析过程中所用的引物信息见表 4。

表 4 PCR 扩增过程中用到的引物信息

引物名称	引物序列 (5' -3' , SEQ ID NO:)
SP1	ATAATGTGGGCATCAAAGTTGTGTG (24)
SP2	CTTATCCTAAATGAATGTCACGTGTCTT (25)
SP3	TAGGTGTGTTTTGCGAATGCGGC (26)
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCVN>NNNGGAA (27)
AC1	ACGATGGACTCCAGAG (28)
7RB-1	TCGTGACTGGGAAAACCTGGC (29)
7RB-2	GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC (30)
7RB-3	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA (31)
A949B-L-1	GTGGATGAAAGCCTTCGTTAC (32)

A949B-R	TTCCACCACACACCAAAACCA (33)
A1425LB-2	TAAAGAAGGCTCGCAAGTGTG (34)
A1425RB-2	CATCCTAGTCATTGGGTTGGG (35)

将提取的水稻基因组 DNA 适当稀释，测定并记录其在 260nm 和 280nm 的紫外光吸收率，以一个 OD260 值相当于 50 µg/mL DNA 浓度来计算纯化的 DNA 浓度。DNA 溶液 OD260/OD280 的比值在 1.7~2.0 之间。4℃保存一周内使用。

根据刘耀光等人设计的改进过的热不对称交错 PCR 法 (THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED PCR TAIL-PCR) (Liu et al., Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asym-metric interlaced PCR,(1998) *Plant Molecular Biology Reporter*

16(2) :175-181, 通过参照将其并入本文), 在外源插入的 T-DNA 上设计 3 条嵌套的特异引物 (SPECIALPRIMER, 分别为 SP1, SP2, SP3), 将 SP1 与随机简并引物 (LONG ARBITRARYDEGENERATE PRIMER, LAD) 组合, 而 SP2 和 SP3 分别与锚定引物 AC1 组合, 以基因组 DNA 为模板, 根据引物长短和特异性差异设计不对称的温度循环, 进行 TAIL-PCR。其中, 反应流程如表 5 所示。

表 5 TAIL-PCR 实验流程

循环	循环数	程序
第一轮	1	93 °C 2 min, 95 °C 3 min
	10	94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min30s
	1	94 °C 30 s, 25°C 3 min, 以 0. 5 °C/ s 升至 72 °C, 72 °C 2 min30s
	25	94 °C 20 s, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min30s
	1	72 °C 10 min
	1	4 °C till end
第二轮	1	94 °C 5 min
	2	94 °C 30s, 60 °C 30s, 72 °C 2 min30s
	14	94 °C 20s , 63°C 30s, 72 °C 2 min30s 94 °C 20s , 63 °C 30s, 72 °C 2 min30s 94 °C 20s , 50°C 30s, 72 °C 2 min30s
	1	72 °C 10 min

	1	4 °C till end
第三轮	1	94 °C 5 min
	2	94 °C 30s, 60 °C 30s, 72 °C 2 min30s
	14	94 °C 20s, 63°C 30s, 72 °C 2 min30s 94 °C 20s , 63 °C 30s, 72 °C 2 min30s 94 °C 20s, 50°C 30s, 72 °C 2 min30s
	1	72 °C 10 min
	1	4 °C till end

制备 1%的琼脂糖凝胶，将 TAIL-PCR 第二轮和第三轮的产物点入样品槽，120V 恒压电泳 20 分钟，在紫外灯下观察凝胶，并将大小嵌套的产物切下，使用琼脂糖凝胶回收试剂盒（TIANGEN，北京）将 PCR 产物回收。利用 T4 连接酶（New England Biolabs，美国）将纯化回收的 PCR 产物连接到 T-载体（Promega，美国）上，该体系于 16°C 反应过夜。连接体系如表 6 所示。

表 6 T-载体连接体系

试剂	体积
T4 连接酶 10X Buffer	2 μ l
T4 连接酶	0.4 μ l
PCR 产物	2 μ l
pGEM-T	0.4 μ l
去离子水	15.2 μ l

将上述 16°C 反应过夜的连接液转化大肠杆菌，挑取获得的单菌落，于含氨苄的 LB 培养液中 37°C 振荡培养（150 rpm）5 小时，提取 DNA 测序。

根据 TAIL-PCR 的结果，依据 T-DNA 插入位置的旁侧序列设计引物，与 T-DNA 内引物组合，以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如表 7 所示。

表 7 PCR 反应体系（20 μ l 体系）

试剂	体积
10X buffer	2 μ l

10 mM dNTP	0.5 μ l
DMSO	0.133 μ l
Taq 酶	0.25 μ l
DNA 模板	1 μ l
去离子水	16.117 μ l

根据不同的引物设定 PCR 扩增条件，并将 PCR 产物跑琼脂糖凝胶检测。

将获得的旁侧序列进行测序分析，并与数据库(MSU Rice Genome Annotation Project Release 7，发布时间 2011 年 10 月 31 日，

ftp://ftp.plantbiology.msu.edu/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs/pseudomolecules/version_7.0/)中水稻基因组序列进行比对，发现在 SPT-7R-949D 转化事件中，T-DNA 插入在水稻第 3 号染色体短臂近着丝粒处，物理位置为 Chr3: 14,746,015-14,746,027，未插入已知水稻内源基因编码区，距上游基因 LOC_Os03g25760 的起始密码子 4411bp，距下游基因 LOC_Os03g25770 的终止密码子 5804bp (图 3，图 4)。T-DNA 整合导致整合位点处基因组序列缺失 11 个碱基，缺失序列如 SEQ ID NO:63 所示，为 5' GGGGGTCGGTG 3'，该缺失序列未破坏水稻内源基因编码区。

在 SPT-7R-1425D 转化事件中，T-DNA 插入在水稻第 1 号染色体长臂远端，物理位置为 Chr1: 42,215,016-42,215,095，且未插入已知水稻内源基因编码区，距上游基因 LOC_Os01g72760 终止密码子 1343bp，距下游基因 LOC_Os01g72780 起始密码子 1953bp (图 5，图 6)。T-DNA 整合导致基因组序列缺失 78 个碱基，缺失序列如 SEQ ID NO:62 所示，该缺失序列未破坏水稻内源基因编码区。

在两个转化事件中，T-DNA 均未插入已知的水稻内源基因内部。对外源 T-DNA 与插入位置的基因组 DNA 的接合区域进行 PCR 扩增来验证外源 T-DNA 插入位置并推测 T-DNA 整合方式，即以旁侧序列及 T-DNA 插入序列之间为靶序列进行 PCR 扩增，结果进一步证实了 T-DNA 插入位点的正确性，并且显示 SPT-7R-949D 为反向串联的双拷贝单位点整合，其结果如图 4 所示，所插入的外源 T-DNA 的 5'端和 3' 端旁侧序列的具体核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示；而 SPT-7R-1425D 的 T-DNA 为单拷贝插入，其结果如图 6 所示，插入的外源 T-DNA 的 5'端和 3' 端旁侧序列的具体核苷酸序列分别如 SEQ

ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示。

进一步, 通过测序分析获得了插入转化事件 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的完整的外源 T-DNA 序列, 该具体序列分别如 SEQ ID NO:53 和 SEQ ID NO: 54 所示。通过分析两个转化事件中外源 T-DNA 片段的测序结果, 证实转化事件 SPT-7R-949D 的基因组中整合有两个拷贝的外源 T-DNA, 且反向串联, 其中一个拷贝与载体相同, 另外一个拷贝内的 PG47 启动子缺失 1965bp, 该缺失不影响各元件及表达框的正常生物学功能, 转化事件 SPT-7R-1425D 的基因组中则只整合有一个完整拷贝的 T-DNA。

实施例 6: 转化事件中外源基因整合稳定性分析

为了验证上述转化事件中外源基因插入物的拷贝数和完整性, 本发明采用 Southern blot 印记分析的方法对上述转化事件进行分析。

根据载体中的 T-DNA 序列设计探针, 其中用于检测转化事件 SPT-7R-949D 中目的基因(包含 OsCYP704B2 和 ZM-AA1 表达框)的探针序列如 SEQ ID NO:55 所示, 检测色选基因 DsRed(r)的探针序列如 SEQ ID NO:56 所示。转化事件 SPT-7R-949D 中外源 T-DNA 上的探针结合位置及酶切位点如图 7 所示, 其中图 7A 显示了目的基因上探针序列位置及 Hind III 酶切位点; 图 7B 显示了色选基因上探针序列位置及 EcoR I 酶切位点。

用于检测转化事件 SPT-7R-1425D 中 OsCYP704B2 的探针序列如 SEQ ID NO:57 所示, 检测花粉失活基因 ZM-AA1 的探针序列如 SEQ ID NO:58 所示, 检测色选基因 DsRed(r)的探针序列如 SEQ ID NO:59 所示。转化事件 SPT-7R-1425D 中外源 T-DNA 上的探针结合位置及酶切位点如图 8 和图 9 所示, 其中图 8 显示了转化事件 SPT-7R-1425D 以 OsCYP704B2 为探针, HindIII 酶切后, 进行 Southern blot 所产生的预期片段大小; 图 9 显示了转化事件 SPT-7R-1425D 分别以 Zm-AA1 和 DsRed(r)为探针, EcoR I 酶切后, 进行 Southern blot 所产生的预期片段大小。

以转基因水稻株系 SPT-7R-949D 和 SPT-7R-1425D 的 T2、T3 和 T4 代植株, 和转化受体材料武运粳 7 号 ms26/ ms26 突变体为实验材料, 通过以下的实验流程进行 Southern blot 印记分析。

1、DNA 提取

按中华人民共和国农业行业标准 NY/T674 操作, 提取水稻基因组 DNA。将

DNA 适当稀释，测定并记录其在 260 nm 和 280nm 的紫外光吸收率，以一个 OD260 值相当于 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA 浓度来计算纯化的 DNA 浓度。DNA 溶液 OD260/OD280 的比值在 1.7~2.0 之间。依据测得的浓度将 DNA 溶液稀释到 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，4℃ 保存一周内使用。

2、地高辛标记探针（随机引物法）

1 μL (至少 300ng)模板 DNA，用无菌 ddH₂O 稀释到 16 μL ；

沸水浴煮 10min，立即放入冰中；

混匀 DIG-High Prime （瓶 1），加 4 μL 到变性 DNA 中，混匀，稍加离心；

37℃ 反应过夜（约 20 小时）；

加入 2 μL 0.2M EDTA (Ph8.0) 或 65℃ 10min 终止反应。

3、检测探针效率

将对照探针和标记好的探针进行一系列稀释后，直接点在膜上，通过标准检测来确定目的探针的标记效率。

4、电泳和转膜

- (1) 制备 1% 琼脂糖凝胶，恒压 45V 电泳过夜；
- (2) 溴酚兰距加样孔 6-8 cm 左右时停止电泳。切掉加样孔及多余的胶，切掉左下角作标记；
- (3) 将凝胶浸入 200ml, 0.25M HCl 中进行脱嘌呤处理约 5-10min；
- (4) 将凝胶取出在去离子水中漂洗一下后，浸入变性液中，2 $\times$ 15min；
- (5) 将凝胶取出，在去离子水中漂洗一下，然后浸入中和液中，2 $\times$ 15min；
- (6) 将凝胶取出在去离子水中漂洗一下后，进行毛细转移；
- (7) DNA 的毛细转移：大培养皿中盛 20 $\times$ SSC $\rightarrow$ 上架玻璃板 $\rightarrow$ 玻璃板上铺厚滤纸 $\rightarrow$ 赶气泡 $\rightarrow$ 将凝胶加样孔朝下放在滤纸桥上 $\rightarrow$ 周围用 Parafilm 膜盖住 $\rightarrow$ 胶上放等大的尼龙膜 $\rightarrow$ 赶气泡 $\rightarrow$ 膜上放四层与膜等大的滤纸 $\rightarrow$ 赶气泡 $\rightarrow$ 上放 10 cm 厚的纸巾 $\rightarrow$ 放玻璃板 $\rightarrow$ 上压 500 g 重物；
- (8) 毛细转移 24 h，取出膜在 2 $\times$ SSC 中洗一下，夹于滤纸中，夹于滤纸中，254nmUV, 紫外交联 3min。

5、杂交

- (1) 预杂交: 将膜浸入预热到杂交温度的(52℃)DIG Easy Hyb 中(10ml /100cm²膜), 在杂交箱中 52℃, 60rpm, 预杂交 1h;
- (2) 将 DNA 探针 (约 25ng/ml DIG Easy Hyb) 在 100℃变性 10min 后, 立即放到冰上, 冷却 10 min;
- (3) 将变性的 DNA 探针加到预热的 (52℃) DIG Easy Hyb 中 (3.5ml /100cm²膜), 轻柔混匀, 避免泡沫;
- (4) 倒掉预杂交液, 将杂交液倒入杂交瓶中, 52℃, 60rpm, 杂交 12—16 小时;
- (5) 杂交结束, 回收杂交液, -20℃可保存 1 年, 再用时 68℃加热 10min 重新变性探针。

6、洗膜

- 1) 低严谨性 (高盐, 低温): 充足的 2×SSC+0.1%SDS, 室温 60rpm 洗涤 2×15min;
- 2) 高严谨性 (低盐, 高温): 0.5×SSC+0.1%SDS (预热到洗涤温度), 60rpm 洗涤 2×15min。

注: 如果探针>150 bp 且 G/C% 较高, 应当在 68℃洗膜; 短于 100bp 时, 洗涤温度同杂交温度。

7、检测

应用化学发光检测法, 所有操作都在室温进行。

- 1) 杂交结束并洗膜后, 在 Washing buffer 中短暂冲洗膜约 1-5 min;
- 2) 在 80ml Blocking solution 中封闭 30 min (轻摇);
- 3) 在 20ml Antibody solution 中反应 40 min;
- 4) 转移膜入新容器, 用 Washing buffer 洗两次, 每次 15min;
- 5) 在 20ml Detection buffer 中平衡 2-5min。
- 6) 将膜 DNA 面朝上小心放入杂交袋中, 吸取 1ml CSPD ready-to-use (Kit 瓶 5) 均匀应用到膜上, 立即将杂交袋的上层盖在膜上, 使底物均匀布满膜表面, 并且避免气泡产生, 室温反应 5min;
- 7) 挤出多余液体, 将杂交袋的边缘封住 (防止膜干燥);
- 8) 将膜放在 37℃, 10 min, 以强化发光反应;
- 9) 曝光 X-胶片 15-25min, 观察结果。

结论 1、转化体 SPT-7R-949D 的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株中外源基因整合稳定性的 Southern blot 分析结果

以转化受体武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA 作为阴性对照,将质粒 DNA 加入到武运粳 7 号野生型基因组 DNA 中作为阳性对照,探针在此杂交条件下能够与靶标序列顺利结合。

目的基因的整合稳定性结果分析

用 Hind III 消化转化体 SPT-7R-949D T₂、T₃ 和 T₄ 代植株基因组 DNA,根据目的基因设计探针进行 Southern blot。结果显示该株系 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株的单株中均有~5.6kb 和~7.9kb 的信号条带(图 10),实际观察片段与转化体上预期片段大小(即 5574bp 和 7921bp)相符(表 8),表明均为 2 个拷贝。代际间条带大小相同,拷贝数一致,表明转化体 SPT-7R-949D 的目的基因在 T₂、T₃ 和 T₄ 代之间稳定遗传。

色选基因整合稳定性结果分析

用 EcoR I 消化转化体 SPT-7R-949D T₂、T₃ 和 T₄ 代植株基因组 DNA,根据色选基因序列设计探针进行 Southern blot 检测。结果显示,该株系的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株的三个单株中都有~18kb 和~8.4kb 的信号条带(图 11)。实际观察片段与转化体上预期片段大小(即 18184bp 和 8425bp)相符(表 8)。3 代间杂交信号条代数相同,条带大小一致,表明转化体 SPT-7R-949D 的色选基因在 T₂、T₃ 和 T₄ 代之间稳定遗传。

综上所述,根据转化体 SPT-7R-949D 上 T-DNA 序列、插入位点旁侧序列、探针位置及酶切位点,可以预测杂交片段大小。将实际观察与预测相比较,从而证实外源基因的拷贝数。从表 8 可以看出,所有杂交的实际观察片段与相应的预测片段大小相符。因此,外源基因在 SPT-7R-949D 的 T₂、T₃ 和 T₄ 代之间稳定整合,且保持 2 个拷贝不变。

表 8 转化体 SPT-7R-949D 的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株中外源基因的 Southern blot 预测片段及实际观察片段大小

转化体	探针所在 基因	内切酶	代别	转化体上预 测的片段大小	实际观察 片段大小
SPT-7R-949D	目的基因		T ₂	5574 bp 7921bp	~5.6kb ~8.0kb

色选基因	<i>EcoR</i> I	T ₃	5574 bp	~5.6kb
			7921bp	~8.0kb
		T ₄	5574 bp	~5.6kb
			7921bp	~8.0kb
		T ₂	8425bp	~8.4kb
			18184bp	~18kb
		T ₃	8425bp	~8.4kb
			18184bp	~18kb
		T ₄	8425bp	~8.4kb
			18184bp	~18kb

根据目的基因序列和色选基因序列设计探针,对转化体 SPT-7R-949D 的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株基因组 DNA 进行 Southern blot,结果显示,3 代间外源基因均为 2 拷贝,杂交条带的数目相同,条带大小一致,表明该转化体的外源基因在三代之间稳定遗传。

结论 2、转化体 SPT-7R-1425D 的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株中外源基因的整合稳定性的 Southern blot 分析

以转化受体武运粳 7 号 ms26/ms26 突变体 DNA 作为阴性对照,将质粒 DNA 加入到武运粳 7 号野生型基因组 DNA 中作为阳性对照,探针在此杂交条件下能够与靶标序列顺利结合。

***OsCYP704B2* 基因的整合稳定性结果分析**

用 Hind III 消化转化体 SPT-7R-1425D T₂、T₃ 和 T₄ 代植株基因组 DNA,根据 *OsCYP704B2* 基因设计探针进行 Southern blot。结果显示该株系的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株的单株中都有~8.3kb 的信号条带(图 12)。实际观察片段与转化体上预期片段大小(即 8348bp)相符(表 9),表明均为 1 个拷贝。代际间条带大小相同,拷贝数一致,表明转化体 SPT-7R-1425D 的 *OsCYP704B2* 基因在 T₂、T₃ 和 T₄ 代之间稳定遗传。

***ZM-AA1* 基因的整合稳定性结果分析**

用 EcoR I 消化转化体 SPT-7R-1425D T₂、T₃ 和 T₄ 代植株基因组 DNA,根据 *ZM-AA1* 基因设计探针进行 Southern blot 检测。结果显示该株系的 T₂、T₃ 和 T₄ 代植株的三个单株中都有~5.9kb 的信号条带(图 13),实际观察片段与转化体上预期片段大小(即 5934bp)相符(表 9),表明均为 1 个拷贝。3 代间杂交

信号条代数目相同，条带大小一致，表明转化体 SPT-7R-1425D 的 ZM-AA1 基因在 T2、T3 和 T4 代之间稳定遗传。

*DsRed(r)*基因的整合稳定性结果分析

用 EcoR I 消化转化体 SPT-7R-1425D T2、T3 和 T4 代植株基因组 DNA，根据 *DsRed(r)*基因序列设计探针进行 Southern blot 检测。结果显示该株系的 T2、T3 和 T4 代植株的三个单株中都有~4.8kb 的信号条带（图 14）。实际观察片段与转化体上预期片段大小（即 4824bp）相符（表 9），均为 1 个拷贝。3 代间杂交信号条代数目相同，条带大小一致，表明转化体 SPT-7R-1425D 的 *DsRed(r)*基因在 T2、T3 和 T4 代之间稳定遗传。

综上所述，根据转化体 SPT-7R-1425D 上 T-DNA 序列、插入位点旁侧序列、探针位置及酶切位点，预测杂交片段大小。将实际观察与预测相比较，从而证实外源基因的拷贝数。从下表 9 可以看出，所有杂交的实际观察片段与相应的预测片段大小相符。因此，外源基因在 SPT-7R-1425D 的 T2、T3 和 T4 代之间稳定整合，且保持 1 个拷贝不变。

表 9 转化体 SPT-7R-1425D 的 T2、T3 和 T4 代植株中外源基因的 Southern blot 预测片段及实际观察片段大小

转化体	探针所在基因	内切酶	代别	在转化体上预测的片段大小	实际观察片段大小
SPT-7R-1425D	<i>OsCYP704B2</i>	<i>Hind</i> III	T ₂	8348bp	~ 8.3kb
			T ₃	8348bp	~ 8.3kb
			T ₄	8348bp	~ 8.3kb
	<i>Zm-AA1</i>	<i>EcoR</i> I	T ₂	5934 bp	~6.0kb
			T ₃	5934 bp	~6.0kb
			T ₄	5934 bp	~6.0kb
	<i>DsRed(r)</i>	<i>EcoR</i> I	T ₂	4824bp	~4.8kb
			T ₃	4824bp	~4.8kb
			T ₄	4824bp	~4.8kb

根据 *OsCYP704B2*、*Zm-AA1* 和 *DsRed(r)*基因序列设计探针，对转化体 SPT-7R-1425 的 T2、T3 和 T4 代植株基因组 DNA 进行 Southern blot，结果显示，3 代间外源基因均为 1 个拷贝，杂交条带的数目相同，条带大小一致，表明该转化体的外源基因在三代之间稳定遗传。

实施例 7：转化事件中外源基因的表达分析（RT-PCR 检测）

以转基因水稻株系 T2 代苗期根、苗期茎、苗期叶、颖花原基分化期幼穗(P3 期)、花粉母细胞减数分裂时期幼穗(P6 期)、花粉成熟期幼穗(P8 期)、籽粒成熟时期种子的 cDNA 为模板，分别对目标基因 *OsCYP704B2*、*Zm-AA1* 和 *DsRed(r)* 进行扩增，研究目标基因在水稻不同生长阶段不同组织中的表达水平。

取材时期、组织和检测目标基因见表 10。

取 100mg 样品加液氮于研钵中研磨成粉状，迅速加 Trizol（每 100mg 加 1ml）再次研磨至组织均匀，然后将研磨液转移至离心管（每管 1ml），每管加入 0.2ml 氯仿，激烈震荡，直到混匀。离心 6min,14000rpm，取 400ul 上清至新离心管，加 500ul 异丙醇，上下轻微摇匀，于室温静置 2min，室温离心 5min,14000rpm，去上清，加 500ul 75%乙醇(DEPC 处理)洗涤沉淀 2 次，室温离心 2min,12000rpm，自然晾干（大概 15min）后加 40μl 去离子水(DEPC 处理)溶解 RNA 沉淀。最后用 DNase 酶消化半小时。反转录按照 Fermentas 的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 的操作步骤，将 RNA 反转录成 cDNA。

表 10 试验材料的取样阶段、部位及所检测的基因

部位 取样阶段	根	茎	叶	穗	种子
苗期	<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>	<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>	<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>		
P3 期				<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>	
P6 期				<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>	
P8 期				<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>	
种子					<i>OsCYP704B2</i> <i>Zm-AA1</i> <i>DsRed(r)</i>

引物及扩增产物

以 *OsCYP704B2* 基因、*DsRed(r)* 基因、*Zm-AA1* 基因和 Actin 基因的表达序列为模板

设计引物（表 11）。Actin 基因和 OsCYP704B2 基因的引物均跨内含子设计，这两个基因的 cDNA 为模板扩增产物长度理论上小于以基因组 DNA（gDNA）为模板的扩增产物的长度。

表 11 目标基因和内参基因定性 PCR 引物信息

检测基因	引物名称	引物序列（5' -3'，SEQ ID NO:）	扩增产物大小
<i>OsCYP704B2</i>	RT-CYP-F	TGACATCATTCTTCCCAGTAGCA (64)	cDNA (344bp) / gDNA (432bp)
	RT-CYP-R	ATCACCGAGCAGCACATCCA (65)	
<i>Zm-AA1</i>	RT-ZMAA-F	GACAATGGCAGTGACGACGAT (66)	cDNA (882bp)
	RT-ZMAA-R	CCGCTGTAGCTCAGCGAGTT (67)	
<i>DsRed(r)</i>	RT-DsRed-F	CTCGTACTGCTCCACGATGGT (68)	cDNA (365bp)
	RT-DsRed-R	AGCGCGTGATGAACTTCGA (69)	
<i>Actin</i>	Actin-F	ACCTTCAACACCCCTGCTATG (70)	cDNA (554bp) / gDNA (803bp)
	Actin-R	GCAATGCCAGGGAACATAGTG (71)	
<i>Actin</i>	Q- Actin-F	TGGCATCTCTCAGCACATTCC (72)	DNA (157bp)
	Q- Actin-R	TGCACAATGGATGGGTCAGA (73)	

注：括号内碱基数为相应引物和模板 PCR 扩增产物大小

PCR 扩增

PCR 体系据 Taq 酶说明书提供的体系建立（表 12）。扩增程序均为：94℃ 5min；94℃ 0.5 min，60℃ 0.5 min，72℃ 1min，30 循环；72℃ 10 min。PCR 扩增后，每个反应体系取 10μL 扩增产物用于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 12 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	单样品体积
ddH ₂ O		28.75 μL
10×PCR 缓冲液	1×	5 μL
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	4 μL
10 μmol/L Primer 1	0.5 μmol/L	2.5 μL
10 μmol/L Primer 2	0.5 μmol/L	2.5 μL
5 U/μL Taq 酶	0.025 U/μL	0.25 μL
25 ng/μL DNA 模板	1 ng/μL	2.0 μL
总体积		50 μL

SPT-7R-949D 转化事件中 3 个目标基因的表达模式

分别提取 SPT-7R-949D T2 代植株和对照武运粳 7 号 ms26/ms26（突变体）、武运粳 7 号（野生型）的苗期根、苗期茎、苗期叶、P3 期、P6 期、P8 期以及籽粒成熟时期种子的

RNA 并反转录获得 cDNA，以这些 cDNA 为模板对目标基因 OsCYP704B2、Zm-AA1、DsRed(r) 及内参基因 Actin 分别进行扩增（图 15）。

（1）空白对照中无扩增条带，表明 PCR 扩增体系无目标序列污染；

（2）阳性对照以转基因株系基因组 DNA 为模板，都能扩增出目的条带，且大小与预期相符，表明 PCR 扩增体系能有效对目标序列进行扩增；

（3）以上述转基因株系材料的 cDNA 为模板，扩增出大约 554bp 的内参基因 Actin 片段和 344bp 的目标基因 OsCYP704B2 片段，小于以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物(大小分别为 803bp 和 432bp)，表明 RNA 提取和反转录成功，且无 DNA 污染。

（4）以武运粳 7 号(野生型)不同时期不同组织的 cDNA 为模板，只有 P6 期幼穗 cDNA 中扩增出大约 344bp 大小的 OsCYP704B2 片段。表明水稻内源基因 OsCYP704B2 在 P6 期特异性表达。

（5）以武运粳 7 号 ms26/ms26（突变体）不同时期不同组织的 cDNA 为模板，未扩增到 OsCYP704B2 基因产物，表明突变造成了水稻内源 OsCYP704B2 基因的表达缺失。

（6）以 SPT-7R-949D 不同时期不同组织的 cDNA 为模板对目标基因进行扩增，在 P6 期幼穗 cDNA 扩增出大约 344bp 大小的 OsCYP704B2 片段，在 P8 期幼穗 cDNA 扩增出大约 882bp 大小的 ZmAA1 片段，在籽粒成熟时期种子中扩增出大概 365bp 大小的 DsRed(r) 片段；实验结果证明 OsCYP704B2 基因在 P6 期特异性表达，Zm-AA1 基因在 P8 期特异性表达，DsRed(r)基因在种子中特异性表达。

SPT-7R-1425D 转化体 3 个目标基因的表达模式

分别提取 SPT-7R-1425D T2 代植株和对照材料武运粳 7 号 ms26/ms26（突变体）、武运粳 7 号（野生型）的苗期根、苗期茎、苗期叶、P3 期、P6 期、P8 期以及籽粒成熟时期种子的 RNA 并反转录获得 cDNA，以这些 cDNA 为模板对目标基因 OsCYP704B2、Zm-AA1、DsRed(r) 及内参基因 Actin 分别进行扩增（图 16）。

（1）空白对照中无扩增条带，表明 PCR 扩增体系无目标序列污染；

（2）阳性对照以转基因株系基因组 DNA 为模板，都能扩增出目的条带，且大小与预期相符，表明 PCR 扩增体系能有效对目标序列进行扩增；

（3）以上述转基因株系材料的 cDNA 为模板，扩增出大约 554bp 的内参基因 Actin 片段和 344bp 的目标基因 OsCYP704B2 片段，小于以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物(大小分别为 803bp 和 432bp)，表明 RNA 提取和反转录成功，且无 DNA 污染。

(4)以武运粳7号(野生型)不同时期不同组织的 cDNA 为模板,只有 P6 期幼穗 cDNA 中扩增出大约 344bp 大小的 OsCYP704B2 片段。表明水稻内源基因 OsCYP704B2 在水稻 P6 期特异性表达。

(5)以武运粳7号 ms26/ms26 (突变体)不同时期不同组织的 cDNA 为模板,未扩增到 OsCYP704B2 基因产物,表明突变造成了水稻内源 OsCYP704B2 基因的表达缺失。

(6)以 SPT-7R-1425D 不同时期不同组织的 cDNA 为模板对目标基因进行扩增,在 P6 期的幼穗 cDNA 扩增出大约 344bp 大小的 OsCYP704B2 片段,在 P8 期的幼穗 cDNA 扩增出大约 882bp 大小的 ZmAA1 片段,在籽粒成熟时期种子中扩增出大概 365bp 大小的 DsRed(r)片段;实验结果证明 OsCYP704B2 基因在 P6 期特异性表达,Zm-AA1 基因在 P8 期特异性表达,DsRed(r)基因在种子中特异性表达。

工业实用性

本发明的构建体,能够有效地应用于水稻雄性不育系和保持系的构建,进而获得的育性稳定的水稻雄性不育系和保持系能够高效地应用于杂交种子的生产,从而能够获得安全、优质的杂交水稻种子。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1. 一种植物或其含有DNA的部分，其包含SEQ ID NO: 13、14、17或18的DNA序列。
2. 一种植物或其含有DNA的部分，其包含SEQ ID NO: 15、16、19或20的DNA序列。
3. 用于鉴定生物学样品中的事件SPT-7R-949D或SPT-7R-1425D的引物对或探针对，包含：
 - a) 特异性靶向第一序列的第一探针或第一引物，其中所述被靶向的第一序列位于SEQ ID NO: 53或54的T-DNA插入序列中；及
 - b) 特异性靶向第二序列的第二探针或第二引物，其中所述被靶向的第二序列是包含在选自SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19和20的序列中的侧翼区域；其中在少于100,000碱基对的单个核酸片段中检测所述第一和第二靶序列。
4. 权利要求3的引物对，包括用于鉴定事件SPT-7R-949D的引物对，其中所述被靶向的第一序列位于SEQ ID NO: 53的T-DNA插入序列中，并且所述被靶向的第二序列是包含在选自SEQ ID NO:13、14、17和18的序列中的侧翼区域。
5. 权利要求4的引物对，其中所述被靶向的第二序列包含位于SEQ ID NO: 13的位置1-893中的区域或者位于SEQ ID NO: 14的位置507-959中的区域。
6. 权利要求3的引物对，包括用于鉴定事件SPT-7R-1425D的引物对，其中所述被靶向的第一序列位于SEQ ID NO: 54的T-DNA插入序列中，并且所述被靶向的第二序列是包含在选自SEQ ID NO:15、16、19和20的序列中的侧翼区域。
7. 权利要求6的引物对，其中所述被靶向的第二序列包含位于SEQ ID NO: 15的位置1-826中的区域或者位于SEQ ID NO: 16的位置408-1280中的区域。
8. 一种检测生物学样品中事件SPT-7R-949D或其子代存在性的方法，包括：
 - a) 从所述生物学样品提取DNA样品；
 - b) 提供DNA引物对，其中
 - (i) 所述引物对的一个引物靶向位于SEQ ID NO: 53的T-DNA插入序列中的序列；及
 - (ii) 所述引物对的第二个引物靶向位于事件SPT-7R-949D 的侧翼序列中的序列，其中所述侧翼序列包含在选自SEQ ID NO:13、14、17和18的序列中；
 - c) 提供DNA扩增反应条件；

- d) 进行DNA扩增反应, 从而产生DNA扩增子分子; 及
 - e) 检测所述DNA扩增子分子, 其中在所述DNA扩增反应中检测到所述DNA扩增子分子表示存在事件SPT-7R-949D。
9. 权利要求8的方法, 其中所述第二个引物靶向包含位于SEQ ID NO: 13的位置1-893中的区域的序列或者靶向包含SEQ ID NO: 17的位置1-10的序列。
10. 权利要求8的方法, 其中所述第二个引物靶向包含位于SEQ ID NO: 14的位置507-959中的区域的序列或者靶向包含SEQ ID NO: 18的位置10-20的序列。
11. 检测生物学样品中事件SPT-7R-1425D或其子代存在性的方法, 包括:
- a) 从所述生物学样品提取DNA样品;
 - b) 提供DNA引物对, 其中
 - (i) 所述引物对的一个引物靶向位于SEQ ID NO: 54的T-DNA插入序列中的序列; 及
 - (ii) 所述引物对的第二个引物靶向位于事件SPT-7R-1425D的侧翼序列中的序列, 其中所述侧翼序列包含在选自SEQ ID NO: 15、16、19和20的序列中;
 - c) 提供DNA扩增反应条件;
 - d) 进行DNA扩增反应, 从而产生DNA扩增子分子; 及
 - e) 检测所述DNA扩增子分子, 其中在所述DNA扩增反应中检测到所述DNA扩增子分子表示存在事件SPT-7R-1425D。
12. 权利要求11的方法, 其中所述第二个引物靶向包含位于SEQ ID NO: 15的位置1-826中的区域的序列或者靶向包含SEQ ID NO: 19的位置1-10的序列。
13. 权利要求11的方法, 其中所述第二个引物靶向包含位于SEQ ID NO: 16的位置408-1280中的区域的序列或者靶向包含SEQ ID NO: 20的位置10-20的序列。
14. 通过权利要求9的方法产生的扩增子, 其中所述扩增子包含SEQ ID NO: 17的序列。
15. 权利要求14的扩增子, 其具有SEQ ID NO: 74的序列。
16. 通过权利要求10的方法产生的扩增子, 其中所述扩增子包含SEQ ID NO: 18的序列。
17. 权利要求16的扩增子, 其具有SEQ ID NO: 75的序列。
18. 通过权利要求12的方法产生的扩增子, 其中所述扩增子包含SEQ ID NO: 19的序列。
19. 权利要求18的扩增子, 其具有SEQ ID NO: 76的序列。

20. 通过权利要求13的方法产生的扩增子，其中所述扩增子包含SEQ ID NO: 20的序列。
21. 权利要求20的扩增子，其具有SEQ ID NO: 77的序列。
22. DNA分子，其包含：
- a. 具有选自SEQ ID NO: 13、14、17和18的序列的多核苷酸分子；
 - b. 具有SEQ ID NO: 17或18的至少11个连续核苷酸的序列的多核苷酸分子；
 - c. 与(a)或(b)互补的序列。
23. DNA分子，其包含：
- a. 具有选自SEQ ID NO: 15、16、19和20的序列的多核苷酸分子；
 - b. 具有SEQ ID NO: 19或20的至少11个连续核苷酸的序列的多核苷酸分子；
 - c. 与(a)或(b)互补的序列。
24. 权利要求22或23的DNA分子，其中所述DNA分子包含在水稻植物、植物细胞、种子、子代植物、植物部分或商品中。
25. 用于诊断事件SPT-7R-949D存在的多核苷酸探针，其中所述探针的长度足以结合SEQ ID NO: 17或18序列的至少11个连续核苷酸的序列。
26. 用于诊断事件SPT-7R-1425D存在的多核苷酸探针，其中所述探针的长度足以结合SEQ ID NO: 19或20序列的至少11个连续核苷酸的序列。
27. 包含事件SPT-7R-949D或SPT-7R-1425D的水稻植物。
28. 权利要求27的植物产生的种子，其中所述种子包含所述事件。
29. 在或大约在3号染色体短臂的物理位置14,746,015-14,746,027具有*OsCYP704B2*基因的水稻品系。
30. 在或大约在1号染色体长臂的物理位置42,215,016-42,215,095具有*OsCYP704B2*基因的水稻品系。

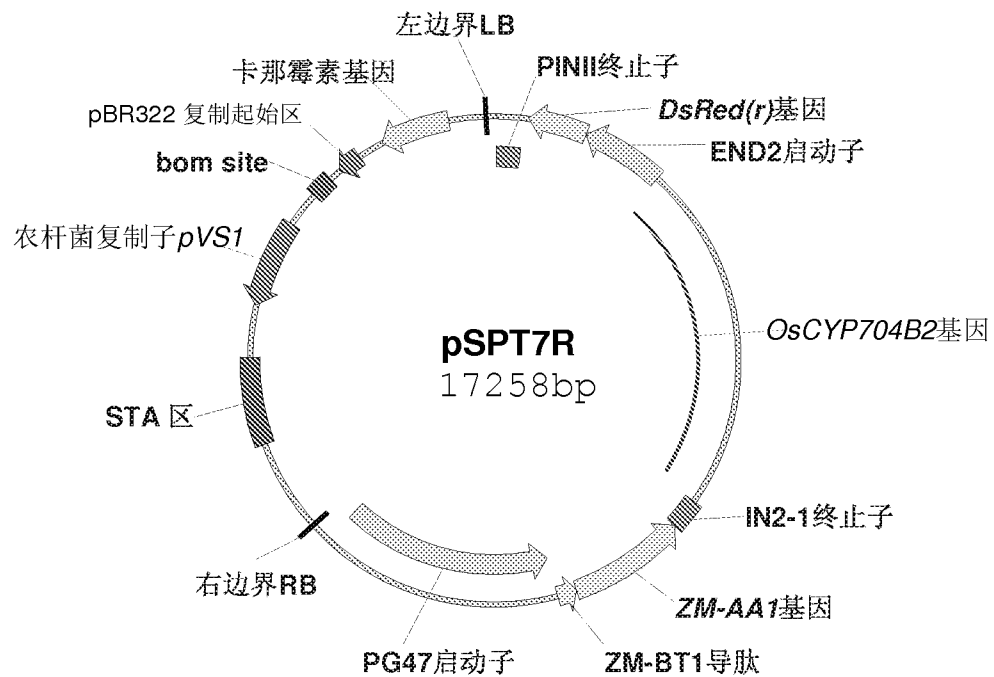


图 1

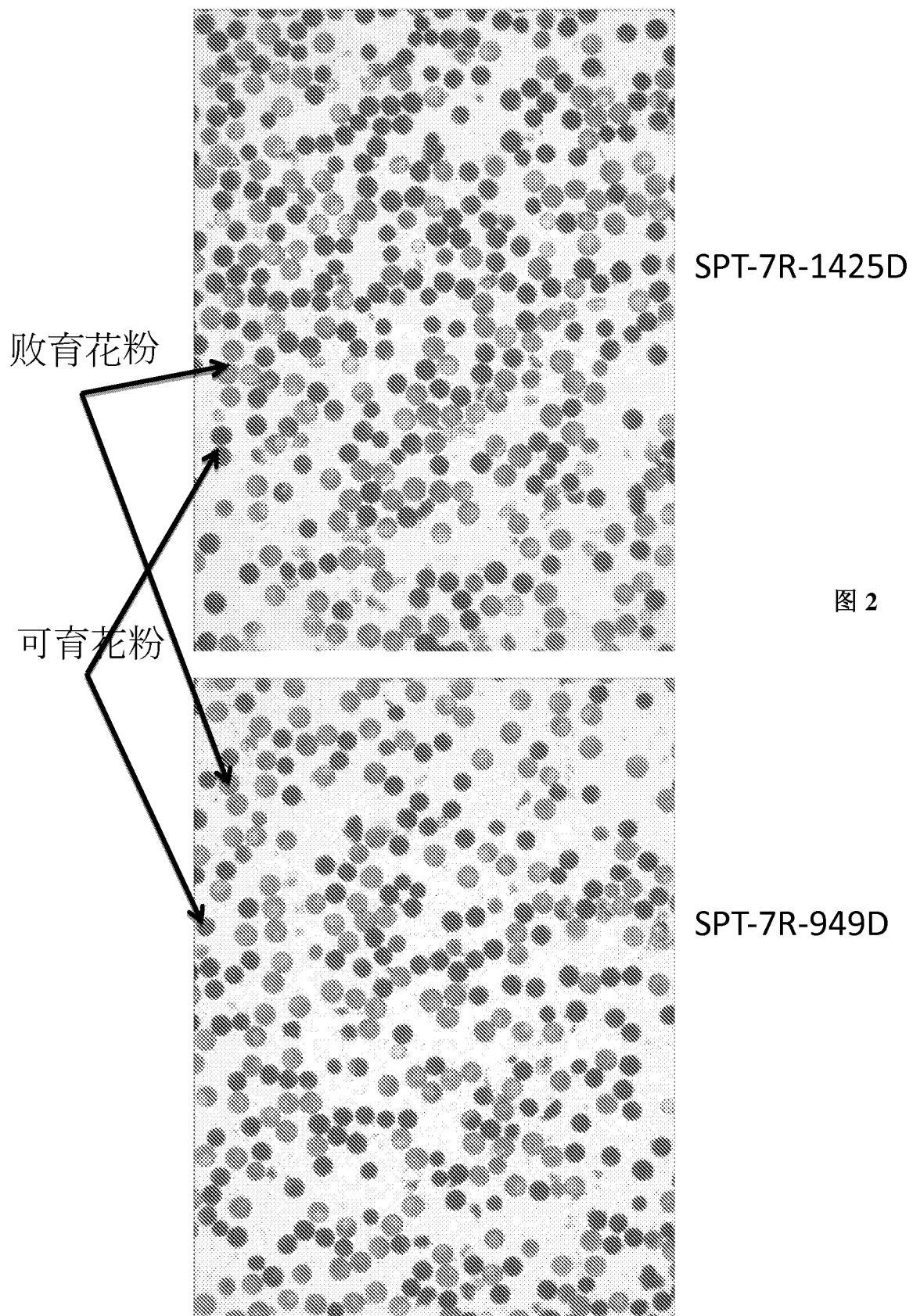


图 2

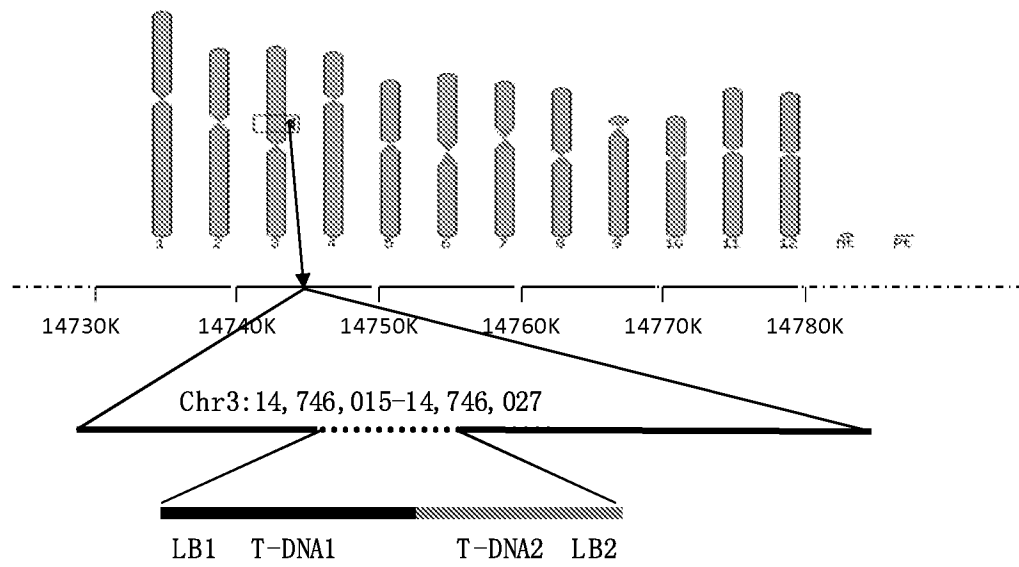


图 3

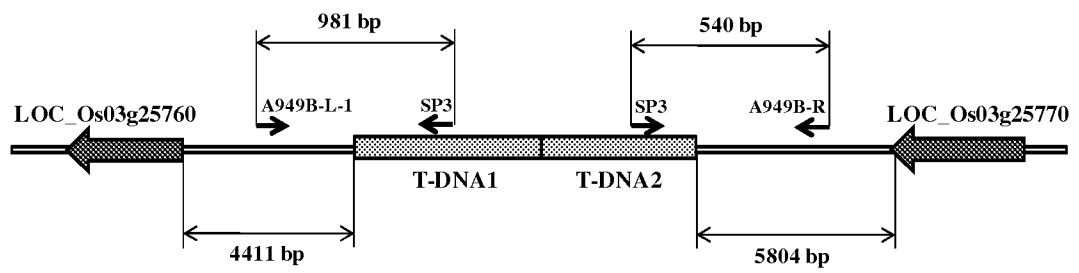


图 4

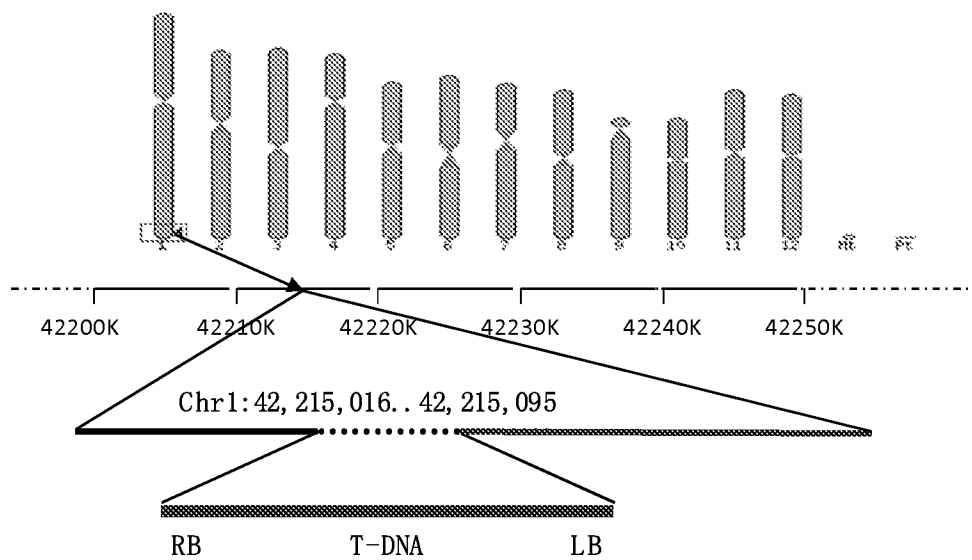


图 5

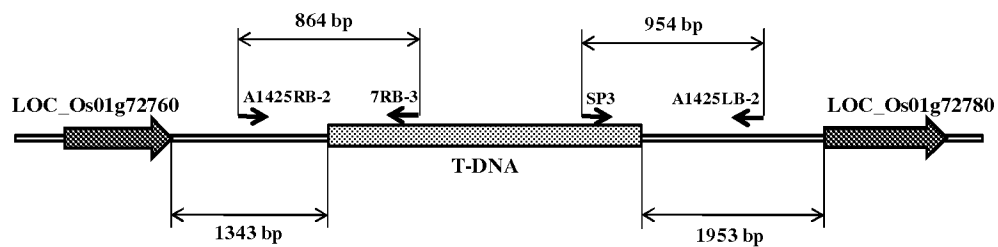


图 6

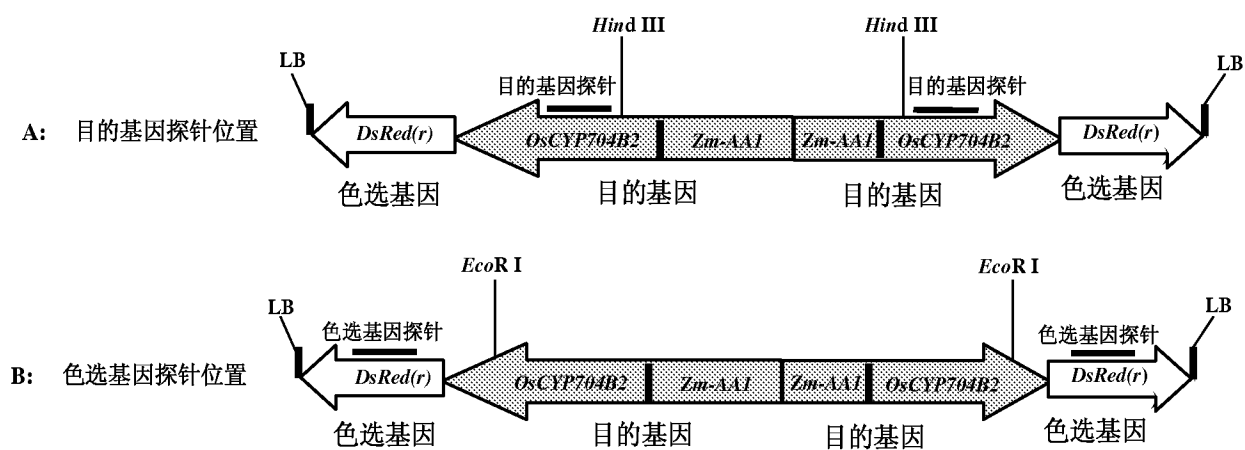


图 7

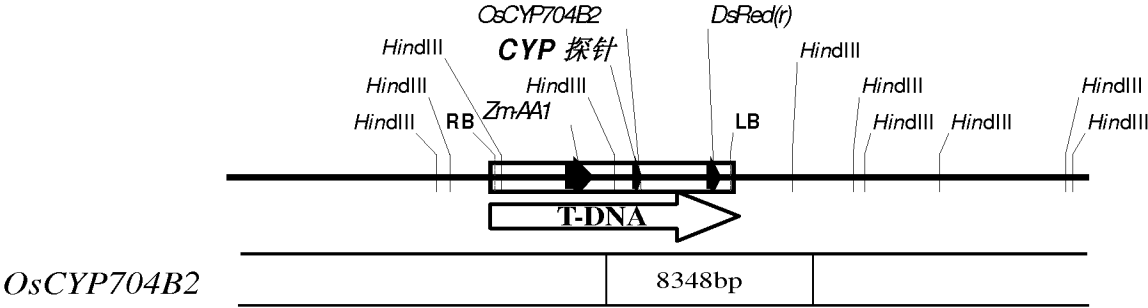


图 8

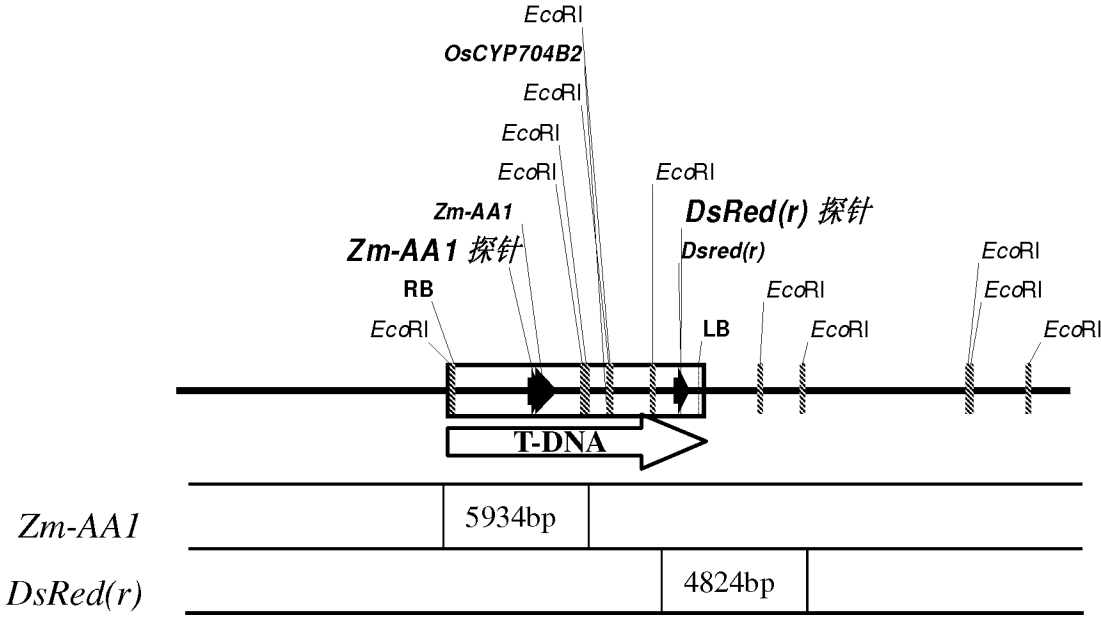


图 9

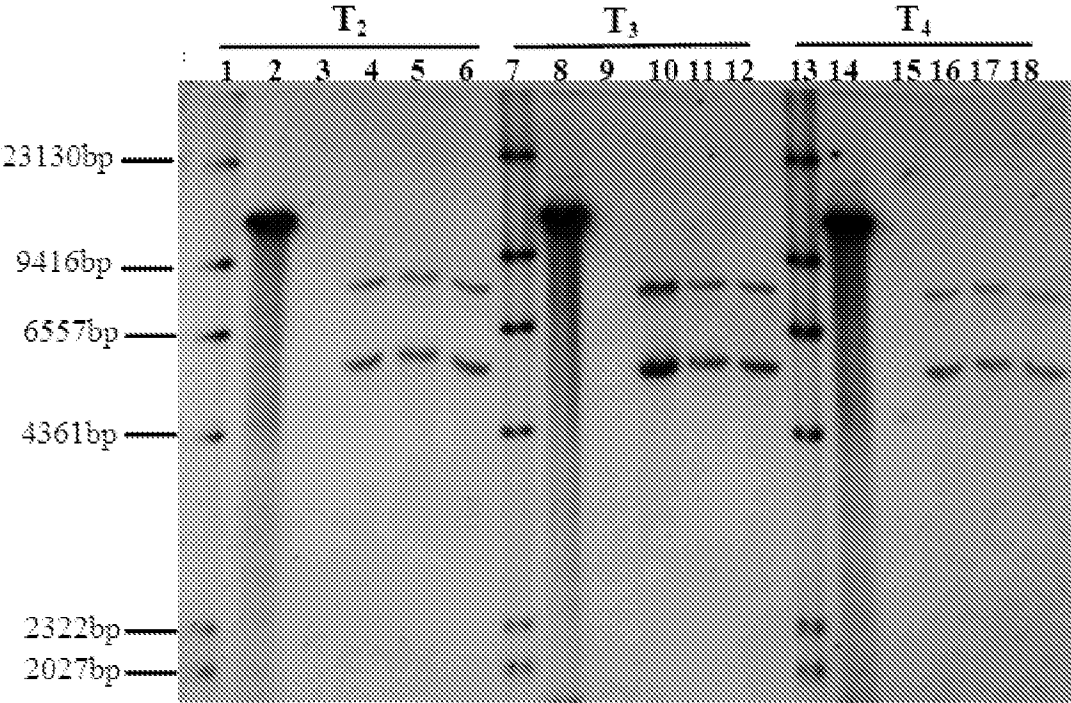


图 10

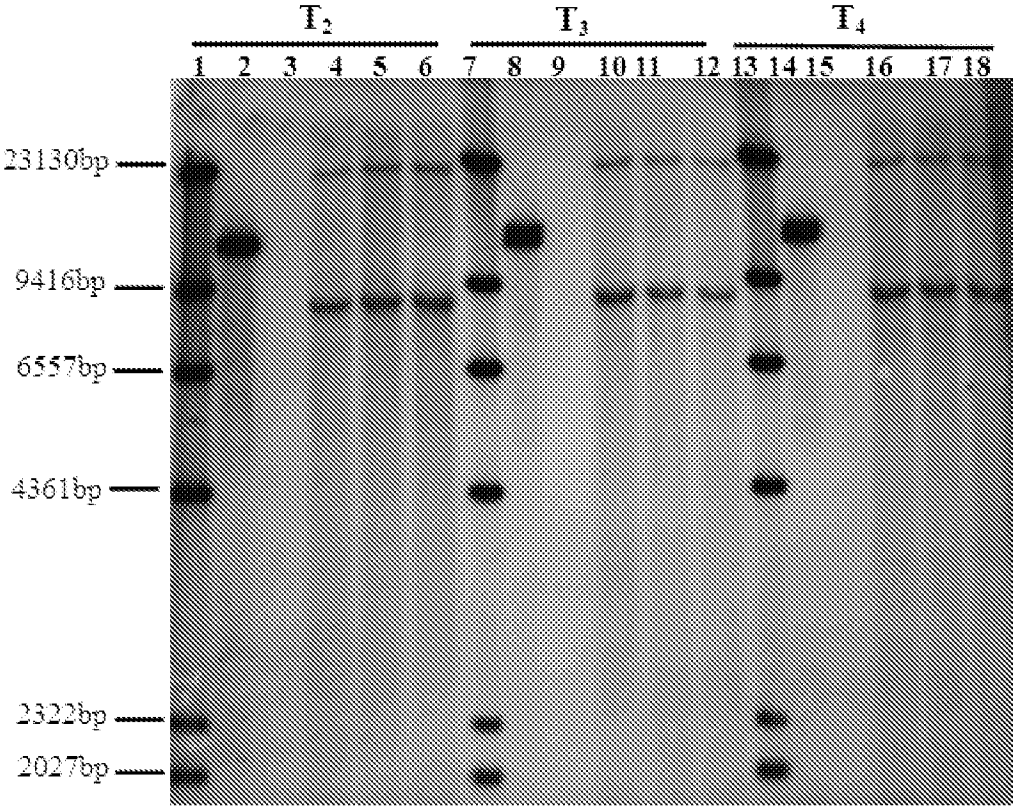


图 11

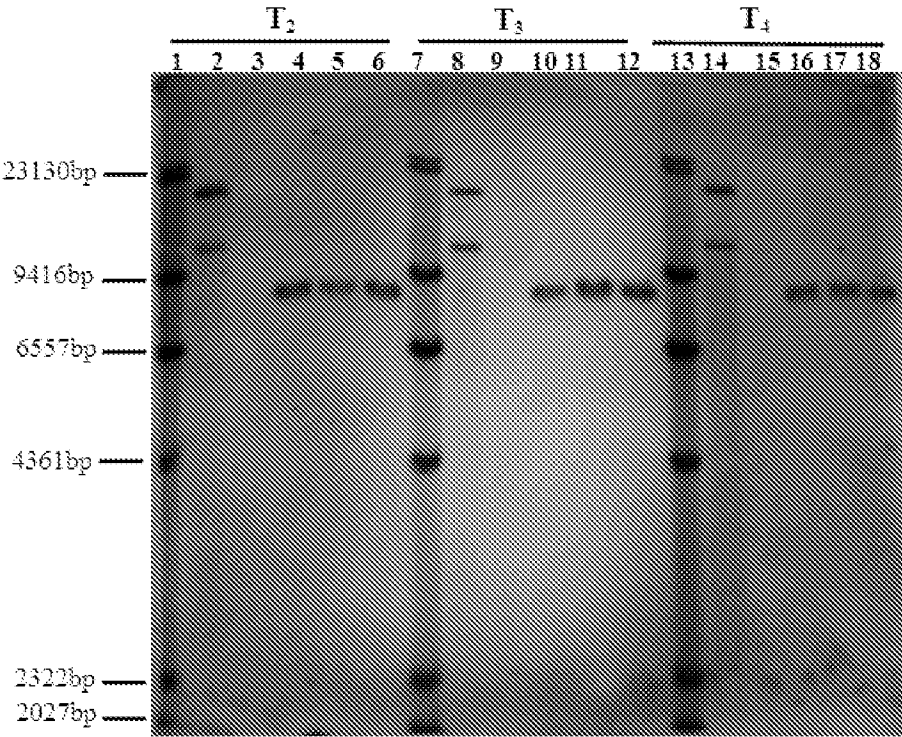


图 12

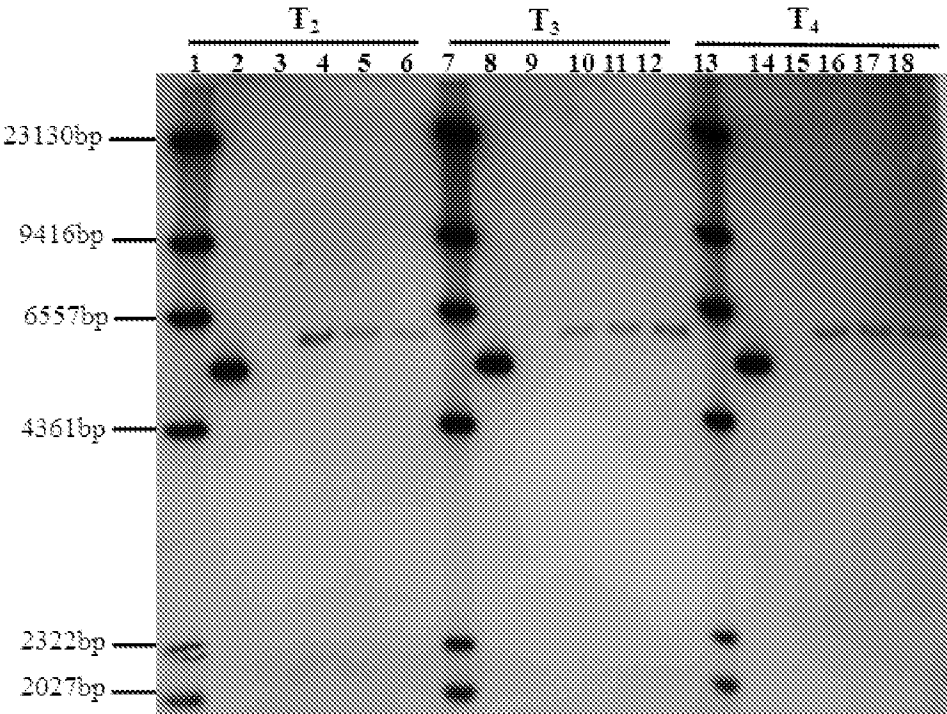


图 13

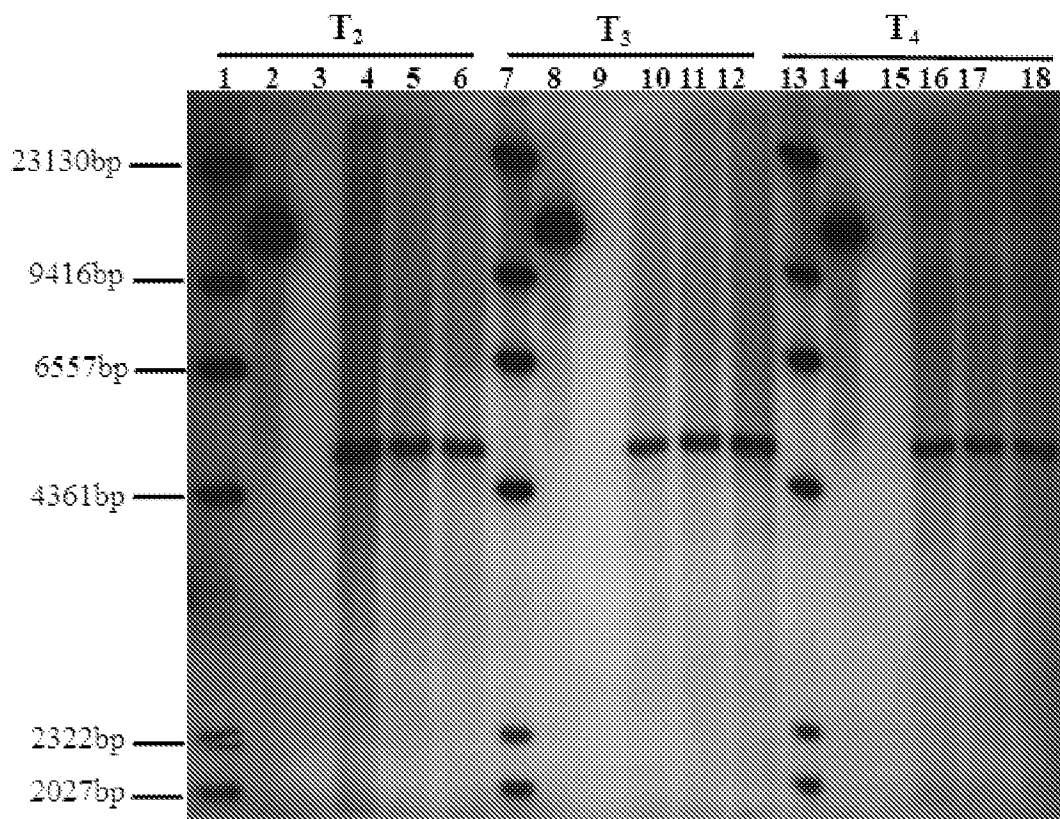


图 14

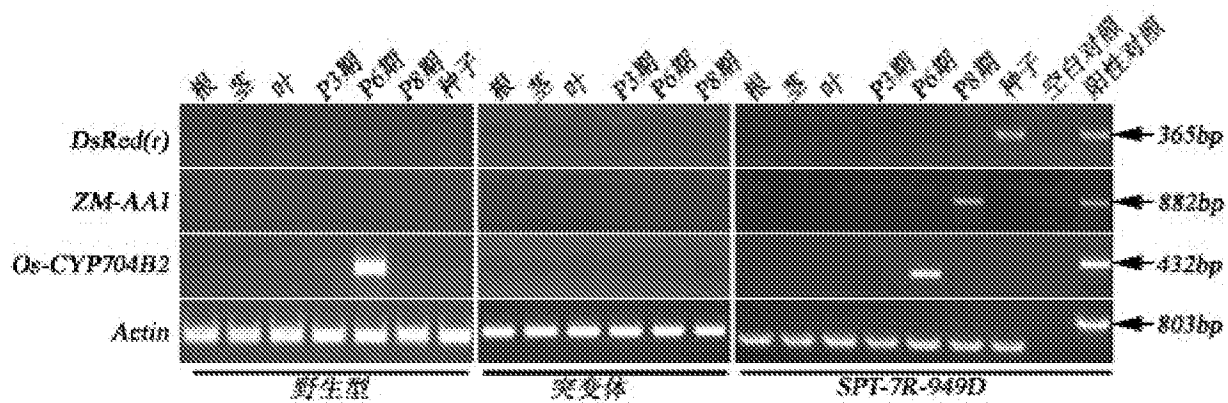


图 15

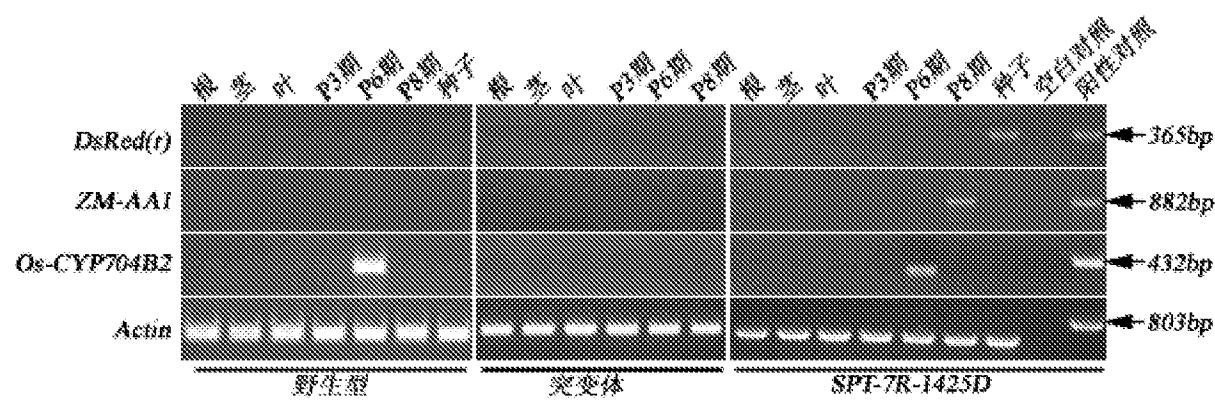


图 16

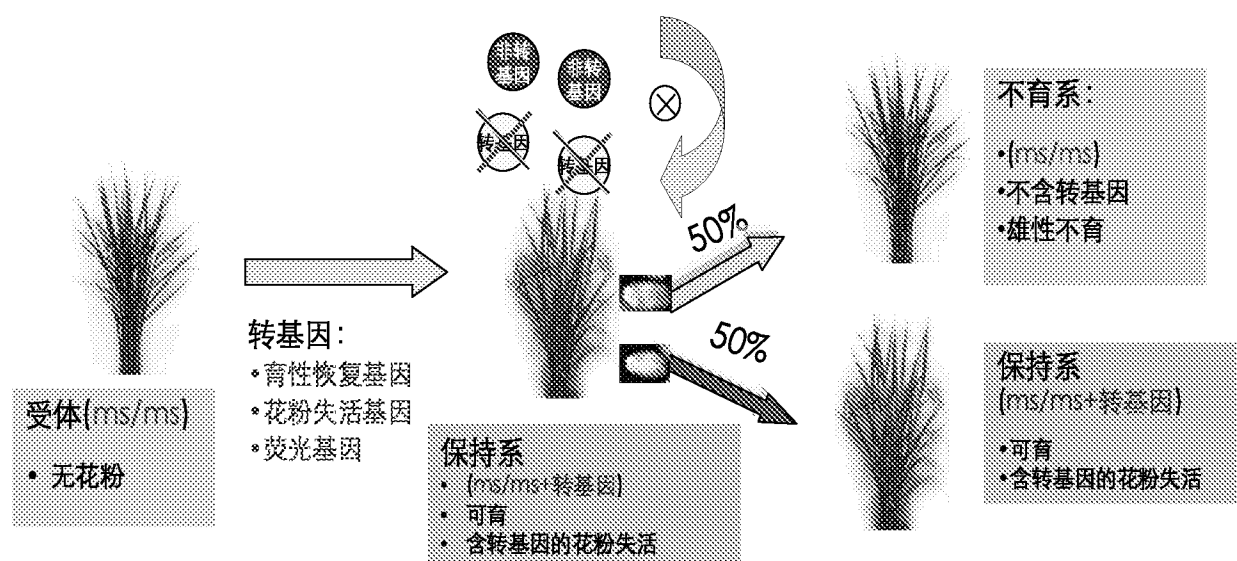


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/073891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; A01H 1/00 (2006.01) i; A01H 5/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12Q; A01H

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

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

Data Bases: CPRSABS, CNABS, CNTXT, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, EMBL+GENBANK+DDBJ

Search Terms: 949D, 1425D, SPT-7R-949D, SPT-7R-1425D, pSPT7R, MS26, CYP70482, Zm-AA1, DsRed, RFP, toxicity of pollen, Zea mays amylase, red fluorescent protein, rice, Oryza sativa, recessive genic sterile, fertility, sterility, fertile, sterile, transform event, transgenic event, primer, probe, sequence search of SEQ ID NOs: 13-20, name search of inventors and applicants

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"GenBank accession number: AC112523.5" GenBank Data Base, 25 November 2003 (25.11.2003), see the sequences and the related information	22, 24-25 (all are partial)
X	"GenBank accession number: GP638212.1" GenBank Data Base, 28 September 2009 (28.09.2009), see the sequences and the related information	22, 24-25 (all are partial)
X	CN 101248183 A (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.), 20 August 2008 (20.08.2008), see claims 1-65, embodiments 13-15, and figure 23	29-30
X	"GenBank accession number: CR382128.1" GenBank Data Base, 16 March 2012 (16.03.2012), see the sequences and the related information	23-24, 26 (all are partial)

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 July 2014 (14.07.2014)	Date of mailing of the international search report 25 July 2014 (25.07.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LIAO, Yajing Telephone No.: (86-10) 62088348

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/073891

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"GenBank accession number: AM484157.2" GenBank Data Base, 05 February 2008 (05.02.2008), see the sequences and the related information	23-24, 26 (all are partial)
A	CN 102199619 A (BEIJING KAITUO DNA BIOTECH RESEARCH CENTER CO., LTD. et al.), 28 September 2011 (28.09.2011), see claims 1-7, embodiments 1, 3 and 4, SEQ ID NOs: 1-4	1-30
A	CN 102154446 A (BEIJING KAITUO DNA BIOTECH RESEARCH CENTER CO., LTD. et al.), 17 August 2011 (17.08.2011), see the whole document	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/073891

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] the first group of inventions: claims 3, 24, 27-28 (both are partial), 1, 4-5, 8-10, 14-17, 22, 25 and 29,
[2] relates to the technical solutions based on SEQ ID NOs: 13, 14, 17 or 18 in the above-mentioned claims, including plants containing SEQ ID NOs: 13, 14, 17 or 18 or parts containing DNA thereof, identification primer pairs of event SPT-7R-949D, identification methods, amplicons, DNA molecules, polynucleotide probes, rice plants, rice seeds, or rice varieties.
[3] The second group of inventions: claims 3, 24, 27-28 (both are partial), 2, 6-7, 11-13, 18-21, 23, 26 and 30,
[4] relates to the technical solutions based on SEQ ID NOs: 15, 16, 19 or 20 in the above-mentioned claims, including plants containing SEQ ID NOs: 15, 16, 19 or 20 or parts containing DNA thereof, identification primer pairs of event SPT-7R-1425D, identification methods, amplicons, DNA molecules, polynucleotide probes, rice plants, rice seeds, or rice varieties.
[5] The above-mentioned two groups of inventions respectively relate to sequences of two different rice transgene events SPT-7R-949D or SPT-7R-1425D. The two groups of sequences are located at different genome positions, and have no conserved domain therebetween, and therefore the two groups of inventions lack a same or corresponding special technical feature therebetween. It can be seen that the two different groups of inventions of the present application do not share a same or corresponding technical feature, and thus do not meet the requirement of unity of invention under PCT Rule 13.1.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/073891

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101248183 A	20.08.2008	WO 2007002267 A3	26.04.2007
		JP 2012065678 A	05.04.2012
		EP 2278019 A1	26.01.2011
		CN 103642832 A	19.03.2014
		AU 2006262185 A2	12.06.2008
		US 2006015968 A1	19.01.2006
		AU 2006262185 A1	04.01.2007
		JP 5058990 B2	24.10.2012
		JP 2008543341 A	04.12.2008
		BR PI 0613133 A2	21.12.2010
		CA 2755243 A1	04.01.2007
		EP 1899469 A2	19.03.2008
		US 2009183272 A1	16.07.2009
		AR 054148 A1	06.06.2007
		US 2009183273 A1	16.07.2009
		US 2009183274 A1	16.07.2009
		AU 2006262185 B2	21.07.2011
		US 2009183275 A1	16.07.2009
		CA 2755369 A1	04.01.2007
		EP 2295585 A1	16.03.2011
		CA 2613336 A1	04.01.2007
		US 7517975 B2	14.04.2009
		WO 2007002267 A2	04.01.2007
CN 102199619 A	28.09.2011	CN 102199619 B	15.05.2013
CN 102154446 A	17.08.2011	CN 102154446 B	15.05.2013

A. 主题的分类 C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i; A01H 1/00(2006.01)i; A01H 5/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; C12Q; A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CPRSABS, CNABS, CNTXT, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, EMBL+GENBANK+DDBJ 检索词: 949D, 1425D, SPT-7R-949D, SPT-7R-1425D, pSPT7R, MS26, CYP704B2, Zm-AA1, 花粉毒性, 玉米淀粉酶, DsRed, 红色荧光蛋白, RFP, 稻, 隐性核不育, 育性, 不育, 转化事件, 转基因事件, 引物, 探针, pollen toxic, Zea mays amylase, red fluroscent protein, rice, Oryza sativa, recessive genic sterile, fertility, sterility, fertile, sterile, transform event, transgenic event, primer, probe, 对 SEQ ID NO: 13-20的序列检索, 对发明人和申请人的姓名检索																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>"GenBank登录号: AC112523.5" GenBank数据库, 2003年 11月 25日 (2003 - 11 - 25), 参见序列及相关信息</td> <td>22, 24-25 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"GenBank登录号: GP638212.1" GenBank数据库, 2009年 9月 28日 (2009 - 09 - 28), 参见序列及相关信息</td> <td>22, 24-25 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 101248183A (先锋高级育种国际公司) 2008年 8月 20日 (2008 - 08 - 20) 参见权利要求1-65, 实施例13-15, 图23</td> <td>29-30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"GenBank登录号: CR382128.1" GenBank数据库, 2012年 3月 16日 (2012 - 03 - 16), 参见序列及相关信息</td> <td>23-24, 26 (均为部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	"GenBank登录号: AC112523.5" GenBank数据库, 2003年 11月 25日 (2003 - 11 - 25), 参见序列及相关信息	22, 24-25 (均为部分)	X	"GenBank登录号: GP638212.1" GenBank数据库, 2009年 9月 28日 (2009 - 09 - 28), 参见序列及相关信息	22, 24-25 (均为部分)	X	CN 101248183A (先锋高级育种国际公司) 2008年 8月 20日 (2008 - 08 - 20) 参见权利要求1-65, 实施例13-15, 图23	29-30	X	"GenBank登录号: CR382128.1" GenBank数据库, 2012年 3月 16日 (2012 - 03 - 16), 参见序列及相关信息	23-24, 26 (均为部分)
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	"GenBank登录号: AC112523.5" GenBank数据库, 2003年 11月 25日 (2003 - 11 - 25), 参见序列及相关信息	22, 24-25 (均为部分)															
X	"GenBank登录号: GP638212.1" GenBank数据库, 2009年 9月 28日 (2009 - 09 - 28), 参见序列及相关信息	22, 24-25 (均为部分)															
X	CN 101248183A (先锋高级育种国际公司) 2008年 8月 20日 (2008 - 08 - 20) 参见权利要求1-65, 实施例13-15, 图23	29-30															
X	"GenBank登录号: CR382128.1" GenBank数据库, 2012年 3月 16日 (2012 - 03 - 16), 参见序列及相关信息	23-24, 26 (均为部分)															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2014年 7月 14日		国际检索报告邮寄日期 2014年 7月 25日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		受权官员 廖雅静 电话号码 (86-10)62088348															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	"GenBank登录号：AM484157.2" GenBank数据库，2008年 2月 05日（2008 - 02 - 05）， 参见序列及相关信息	23-24、26（均 为部分）
A	CN 102199619A（北京凯拓迪恩生物技术研发中心有限责任公司等）2011年 9月 28日 （2011 - 09 - 28） 参见权利要求1-7，实施例1，3和4，SEQ ID NO:1-4	1-30
A	CN 102154446A（北京凯拓迪恩生物技术研发中心有限责任公司等）2011年 8月 17日 （2011 - 08 - 17） 参见全文	1-30

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 第1组发明: 权利要求3、24、27-28 (均为部分)、1、4-5、8-10、14-17、22、25、29
- [2] 涉及上述权利要求中基于SEQ ID NO:13、14、17或18的技术方案, 包括包含SEQ ID NO:13、14、17或18的植物或其含有DNA的部分、事件SPT-7R-949D的鉴定引物对、鉴定方法、扩增子、DNA分子、多核苷酸探针、水稻植物、水稻种子, 或水稻品系。
- [3] 第2组发明: 权利要求3、24、27-28 (均为部分)、2、6-7、11-13、18-21、23、26、30
- [4] 涉及上述权利要求中基于SEQ ID NO:15、16、19或20的技术方案, 包括包含SEQ ID NO: 15、16、19或20的植物或其含有DNA的部分、事件SPT-7R-1425D的鉴定引物对、鉴定方法、扩增子、DNA分子、多核苷酸探针、水稻植物、水稻种子, 或水稻品系。
- [5] 上述2组发明分别涉及基于两个不同的水稻转基因事件SPT-7R-949D或SPT-7R-1425D的序列, 这2组序列位于不同的基因组位置, 相互之间缺少相同的保守结构域, 因此, 2组发明之间缺乏相同或相应的特定技术特征。由此可见, 本申请的2组不同发明之间不具备相同或相应的特定技术特征, 不符合PCT实施细则13.1有关单一性的规定。

1. ☒ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求具体地说, 是权利要求:
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

对异议的意见

- ☒ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/073891

检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
CN	101248183A	2008年 8月 20日	WO	2007002267A3	2007年 4月 26日
			JP	2012065678A	2012年 4月 05日
			EP	2278019A1	2011年 1月 26日
			CN	103642832A	2014年 3月 19日
			AU	2006262185A2	2008年 6月 12日
			US	2006015968A1	2006年 1月 19日
			AU	2006262185A1	2007年 1月 04日
			JP	5058990B2	2012年 10月 24日
			JP	2008543341A	2008年 12月 04日
			BR	PI0613133A2	2010年 12月 21日
			CA	2755243A1	2007年 1月 04日
			EP	1899469A2	2008年 3月 19日
			US	2009183272A1	2009年 7月 16日
			AR	054148A1	2007年 6月 06日
			US	2009183273A1	2009年 7月 16日
			US	2009183274A1	2009年 7月 16日
			AU	2006262185B2	2011年 7月 21日
			US	2009183275A1	2009年 7月 16日
			CA	2755369A1	2007年 1月 04日
			EP	2295585A1	2011年 3月 16日
			CA	2613336A1	2007年 1月 04日
			US	7517975B2	2009年 4月 14日
			WO	2007002267A2	2007年 1月 04日
CN	102199619A	2011年 9月 28日	CN	102199619B	2013年 5月 15日
CN	102154446A	2011年 8月 17日	CN	102154446B	2013年 5月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)