(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115426875 A
(43)申请公布日 2022.12.02

(21)申请号 202180029953.9
(22)申请日 2021.04.20
(30)优先权数据
63/014,771 2020.04.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/028189 2021.04.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/216571 EN 2021.10.28
(71)申请人 孟山都技术公司
地址 美国密苏里州
(72)发明人 S·L·布朗 S·弗拉辛斯基 潘爱红 J·W·斯特尔泽 H·M·温德勒 阴勇
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 孟凡宏
(51)Int.Cl.
A01H 6/46(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)
C12Q 1/686(2006.01)
C12Q 1/6895(2006.01)

权利要求书3页 说明书46页
序列表45页 附图3页

(54)发明名称

转基因玉米事件MON95275以及其检测方法和用途

(57)摘要

本发明提供转基因玉米事件MON95275、包含可检测量的玉米事件MON95275DNA的植物、植物细胞、种子、植物部分(包括花粉、种子和细胞,以及对应于雄穗、根、秆、茎、叶、穗轴等的组织)、后代植物、商品产品。本发明还提供对玉米事件MON95275特异的多核苷酸以及使用和检测玉米事件MON95275DNA以及包含玉米事件MON95275的植物、植物细胞、种子、植物部分、后代植物和商品产品的方法。本发明还提供了与制造和使用玉米事件MON95275有关的方法。

CN 115426875 A

1.一种重组DNA分子,所述重组DNA分子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10,以及前述任一者的完整互补序列。

2.如权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述分子来自玉米事件MON95275,包含所述事件的种子的代表性样品已经以ATCC登录号PTA-126049保藏。

3.一种DNA分子,所述DNA分子包含长度足以充当DNA探针的多核苷酸区段,所述DNA探针在严格杂交条件下与样品中的玉米事件MON95275 DNA特异性杂交,其中在所述严格杂交条件下检测所述DNA分子的杂交可诊断所述样品中是否存在玉米事件MON95275 DNA。

4.如权利要求3所述的DNA分子,其中所述样品包含玉米植物、玉米植物细胞、玉米种子、玉米植物部分、玉米后代植物、加工过的玉米种子、包含玉米的动物饲料、玉米油、玉米面、玉米粉、玉米片、玉米糠、用玉米制成的面食、玉米生物质和使用玉米或玉米部分生产的燃料产品。

5.一种DNA分子对,所述DNA分子对包含第一DNA分子和不同于所述第一DNA分子的第二DNA分子,在与含有玉米事件MON95275模板DNA的样品一起用于扩增反应时用作DNA引物,以产生可诊断所述样品中是否存在所述玉米事件MON95275 DNA的扩增子,其中所述扩增子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

6.一种检测样品中是否存在可诊断玉米事件MON95275 DNA的DNA区段的方法,所述方法包括:

a)使所述样品与如权利要求3所述的DNA分子接触;

b)使所述样品和所述DNA分子经受严格杂交条件;以及

c)检测所述DNA分子与所述样品中的所述DNA的杂交,

其中所述检测可诊断所述样品中是否存在所述玉米事件MON95275 DNA。

7.一种检测样品中是否存在可诊断玉米事件MON95275 DNA的DNA区段的方法,所述方法包括:

a)使所述样品与如权利要求5所述的DNA分子对接触;

b)进行足以产生DNA扩增子的扩增反应;以及

c)检测所述反应中是否存在所述DNA扩增子,

其中所述DNA扩增子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

8.一种玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分,其包含玉米事件MON95275 DNA,所述玉米事件MON95275 DNA的特征在于可检测到重组多核苷酸分子的存在,所述重组多核苷酸分子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

9.如权利要求8所述的玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分,其中当所述玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分在鞘翅目害虫的饮食中提供时是杀虫的。

10.如权利要求9所述的玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分，其中所述鞘翅目害虫选自由西方玉米根虫(玉米根萤叶甲)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲)组成的组。

11.如权利要求8所述的玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分，其中所述玉米植物进一步定义为包含玉米事件MON95275的任何一代玉米植物的后代。

12.一种保护玉米植物免受昆虫侵染的方法，其中所述方法包括在鞘翅目害虫的饮食中提供杀虫有效量的包含玉米事件MON95275的所述玉米植物的细胞或组织。

13.如权利要求12所述的方法，其中所述鞘翅目害虫选自由西方玉米根虫(玉米根萤叶甲)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲)组成的组。

14.一种产生抗玉米根虫的玉米植物的方法，所述方法包括：

a)培育两种不同玉米植物，其中所述两种不同玉米植物中的至少一种包含玉米事件MON95275 DNA，以产生后代；

b)确认在所述后代中存在可诊断玉米事件MON95275 DNA的DNA区段；以及

c)选择包含玉米事件MON95275 DNA的所述后代；

其中步骤c)的所述后代抗玉米根虫。

15.一种玉米种子，所述玉米种子包含可检测量的选自由以下组成的组的核苷酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10，或其完整互补序列。

16.一种无生命的玉米植物材料，所述玉米植物材料包含可检测量的如权利要求1所述的DNA分子。

17.一种微生物，所述微生物包含可检测量的如权利要求1所述的DNA分子。

18.如权利要求17所述的微生物，其中所述微生物选自由细菌细胞和植物细胞组成的组。

19.一种商品产品，所述商品产品包含可检测量的玉米事件MON95275所特有的DNA分子，其中所述分子包含如权利要求1所述的DNA分子。

20.如权利要求19所述的商品产品，所述商品产品进一步选自由以下组成的组：完整或加工过的玉米种子、包含玉米的动物饲料、玉米油、玉米面、玉米粉、玉米片、玉米糠、玉米生物质和使用玉米或玉米部分生产的燃料产品。

21.一种玉米植物、玉米植物部分或玉米种子，其包含在DNA扩增方法中充当模板，从而产生可诊断玉米事件MON95275 DNA的扩增子的DNA。

22.一种确定包含玉米事件MON95275的玉米植物或玉米种子的接合性的方法，所述方法包括：

a)使包含玉米DNA的样品与第一引物对接触，所述第一引物对能够产生可诊断对应于玉米事件MON95275 DNA的等位基因的扩增子；

b)使所述样品与第二引物对接触，所述引物对能够使用热扩增反应产生所述玉米植物中已知为单拷贝且纯合的内标玉米基因组DNA的扩增子；

c)使所述样品与探针组接触，所述探针组至少含有特异性杂交玉米事件MON95275的等位基因DNA (或与其杂交)的第一探针，和特异性杂交所述玉米植物中已知为单拷贝且纯合的所述内标玉米基因组DNA的第二探针；

d)使用实时PCR进行DNA扩增反应并确定对应于玉米事件MON95275的所述等位基因DNA

和所述单拷贝纯合内标的扩增子的循环阈值(Ct值)；

e)计算所述单拷贝纯合内标扩增子的Ct值与对应于玉米事件MON95275的所述等位基因DNA的扩增子的Ct值之差(ΔCt)；以及

f)确定接合性，其中约零(0)的ΔCt指示事件MON95275的插入T-DNA的纯合性，并且约一(1)的ΔCt指示玉米事件MON95275的插入T-DNA的杂合性。

23.如权利要求22所述的方法，其中所述引物对选自由以下组成的组：SEQ ID NO:15与SEQ ID NO:16的组合，以及SEQ ID NO:18与SEQ ID NO:19的组合；并且其中所述探针是SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:20。

24.如权利要求22所述的方法，其中约一(1)的ΔCt指示MON95275的所述插入T-DNA的杂合性在0.75至1.25范围内。

25.一种确定包含玉米事件MON95275的玉米植物或玉米种子的接合性的方法，所述方法包括：

a)使包含玉米DNA的样品与一组引物对接触，所述组的引物对包含至少两个不同的引物对，其能够产生可诊断玉米事件MON95275的第一扩增子和可诊断缺乏玉米事件MON95275 DNA的天然玉米基因组DNA的第二扩增子；

b)用所述样品和所述组的引物对进行核酸扩增反应；以及

c)在所述核酸扩增反应中检测可诊断是否存在玉米事件MON95275 DNA的所述第一扩增子，或可诊断缺乏玉米事件MON95275的天然玉米基因组DNA的所述第二扩增子，其中仅存在所述第一扩增子可诊断就玉米事件MON95275 DNA来说是纯合的玉米植物或玉米种子，并且存在所述第一扩增子和所述第二扩增子两者可诊断就玉米事件MON95275 DNA来说是杂合的玉米植物或玉米种子；或

d)使包含玉米DNA的样品与探针组接触，所述探针组至少含有与玉米事件MON95275 DNA特异性杂交的第一探针且至少含有与因插入玉米事件MON95275的异源DNA而被破坏的玉米基因组DNA特异性杂交并且不与玉米事件MON95275 DNA杂交的第二探针；以及

e)在严格杂交条件下将所述探针组与所述样品杂交，

其中在所述杂交条件下仅检测到所述第一探针的杂交可诊断玉米事件MON95275 DNA的纯合等位基因，并且其中在所述杂交条件下检测到所述第一探针和所述第二探针两者的杂交可诊断就玉米事件MON95275 DNA来说是杂合的玉米植物或种子。

26.如权利要求25所述的方法，其中所述组的引物对包含SEQ ID NO:15与SEQ ID NO:16的组合，以及SEQ ID NO:21与SEQ ID NO:22的组合。

27.如权利要求26所述的方法，其中所述探针组包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:23。

转基因玉米事件MON95275以及其检测方法和用途

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2020年4月24日提交的美国临时申请第63/014,771号的权益,所述申请以引用方式整体并入本文中。

[0003] 序列表的并入

[0004] 包含于名为MONS480WO_ST25.txt的文件中的序列表为83,283字节(在Microsoft Windows®中测量),创建于2021年4月20日,通过电子提交随此提交,并以引用方式并入。

技术领域

[0005] 本发明涉及存在于玉米事件MON95275中和/或从中分离的重组DNA分子。本发明还涉及含有玉米事件MON95275的转基因玉米植物、植物部分和种子、花粉、细胞和农产品,以及使用它们和检测含有玉米的样品中玉米事件MON95275的存在的方法。含有玉米事件MON95275 DNA的转基因玉米植物、植物部分、种子和细胞表现出对鞘翅目昆虫侵染的抗性。

背景技术

[0006] 玉米(玉蜀黍(zea mays))是一种重要的作物,并且是世界许多地区的主要食物来源。生物技术方法已应用于玉米以改良农艺性状和产品质量。一种这样的农艺性状是通过将重组DNA区段插入玉米植物的基因组中表现出来的抗虫性。

[0007] 玉米中有许多不同的转基因事件已在本领域中描述,所述事件提供各种类型的昆虫抗性,特别是对鳞翅目或鞘翅目物种,并且这些事件包括赋予鳞翅目抗性的事件中的MON810、TC1507、MON89034、MON95379和MIR162,以及赋予鞘翅目抗性,特别是对玉米根虫侵染的抗性的事件中的MON863、MON88017、DAS-59122-7、DP-004114-3和DP23211以及MIR604。这些转基因事件已在全球多个地区商业化使用了很长时间,通常使用与早期部署的转基因事件中所使用相同或相似的毒素,并且在已部署这些事件的许多地理区域观察到目标害虫对这些事件中表达的毒素的抗性。

[0008] 因此,本领域持续需要在玉米中提供表现出对昆虫侵染的抗性的新型转基因事件,并且优选地,新型转基因事件赋予对目标昆虫的抗性,包括使用不与先前在早期商业实施方案中部署的动作模式重叠或相似的动作模式,已经进化出对现有商业部署性状的抗性的那些小种。本文所述的发明是赋予对玉米根虫侵染的抗性,包括对已进化出对先前已部署的商业实施方案的抗性的根虫的抗性的这种新型转基因事件的一个实例。

发明内容

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供一种新型转基因玉米事件MON95275,它提供了对玉米鞘翅目害虫的杀虫控制。在另一实施方案中,本发明还提供了转基因植物、植物细胞、种子、植物部分、花粉和商品产品,其含有在玉米事件MON95275中特异性且可识别地存在并且不存在于不含此特定事件的玉米中的DNA。此事件特异性DNA是插入的转基因DNA和新型DNA区段,在本文中描述为在插入的DNA被引入的染色体断点处形成的接头序列。在另一实

施方案中，本发明提供了对玉米事件MON95275和包含事件MON95275DNA的植物、植物细胞、种子、植物部分、花粉、后代植物和商品产品具有特异性的多核苷酸。在另一实施方案中，提供了与能够选择和检测样品中玉米事件MON95275的存在(或不存在)相关的方法，此类方法使研究人员能够确认事件DNA是否存在于经受所述方法的特定样品中。

[0010] 因此，在一个方面，本发明提供了一种重组DNA分子，其包含选自由以下组成的组的核苷酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10，以及它们的完整互补序列。

[0011] 在一个实施方案中，重组DNA分子来自在种子样品中含有玉米事件MON95275的玉米，所述种子已保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)并以登录号PTA-126049命名。

[0012] 本发明的另一方面提供了一种DNA分子，其包含长度足以充当DNA探针的多核苷酸区段，所述DNA探针在严格杂交条件下与样品中的玉米事件MON95275 DNA特异性杂交，其中在严格条件下检测探针与玉米事件DNA的杂交可诊断确认样品中存在玉米事件MON95275 DNA。在某些实施方案中，样品包含玉米植物、玉米植物细胞、玉米种子、玉米植物部分、玉米花粉、前述任一者的后代、加工过的玉米种子、包含玉米的动物饲料、玉米油、玉米面、玉米粉、玉米片、玉米糠、用玉米制成的面食和其它食品、玉米生物质和使用玉米和玉米部分生产的燃料产品，条件是此类玉米和玉米产品含有可检测量的玉米事件MON95275 DNA或可检测量的由含有玉米事件MON95275 DNA的玉米植物、细胞等产生的新型毒素蛋白或双链DNA。

[0013] 本发明的另一方面提供了第一DNA分子和不同于第一DNA分子的第二DNA分子，即一种DNA分子对，其在与含有玉米事件MON95275模板DNA的样品一起用于含有进行DNA扩增程序所需的适当试剂的扩增反应中时用作引物，以产生可诊断所述样品中是否存在所述玉米事件MON95275 DNA的扩增子。产生的扩增子可至少含有选自由以下组成的组的核苷酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

[0014] 本发明的另一实施方案是检测DNA区段的存在的方法，所述DNA区段可诊断确认样品中存在或不存在玉米事件MON95275DNA。在某个实施方案中，方法如下地进行：通过使样品与探针DNA分子接触，所述分子特异性杂交与玉米事件MON95275独特相关的DNA，接着使样品和探针DNA分子经受严格杂交条件以允许探针结合至玉米事件MON95275特异性DNA的适当互补区段。检测探针DNA分子与样品中DNA的杂交将是决定性的，意味着检测这种杂交将是诊断性的，即样品中的DNA含有可检测量的玉米事件MON95275 DNA。

[0015] 本发明的另一实施方案是检测含有玉米DNA的样品中是否存在诊断玉米事件MON95275 DNA的DNA区段的方法。在一个实施方案中，方法包括以下步骤：使样品与用作特异性针对玉米事件MON95275 DNA区段的扩增的热扩增引物的DNA分子对接触，并进行足以产生DNA扩增子的扩增反应，接着检测反应中是否存在DNA扩增子。DNA扩增子的检测可诊断样品中是否存在可检测量的玉米事件MON95275 DNA，并且所述扩增子可含有选自由以下组成的组的核苷酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

[0016] 本发明的另一实施方案是包含重组多核苷酸分子的玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分，所述重组多核苷酸分子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列：SEQ ID

NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。此玉米植物、玉米植物部分、玉米细胞或其部分当在鞘翅目害虫的饮食中提供时是杀虫的。拟控制的鞘翅目昆虫目标害虫包括但不限于西方玉米根虫(玉米根萤叶甲(Diabrotica virgifera virgifera))和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲(Diabrotica barberi))。另外,玉米植物可进一步定义为包含玉米事件MON95275的任何一代玉米植物的后代,条件是所述后代含有玉米事件MON95275 DNA。

[0017] 本发明的另一实施方案是保护玉米植物免受昆虫侵染的方法,其中所述方法包括在鞘翅目害虫的饮食中提供杀虫有效量的包含玉米事件MON95275的玉米植物细胞或组织。预期的鞘翅目害虫包括西方玉米根虫(玉米根萤叶甲)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲)。

[0018] 本发明的另一实施方案是一种产生抗虫玉米植物的方法,所述方法包括:a)培育两种不同的玉米植物以产生后代,其中两种不同的玉米植物中的至少一种含有玉米事件MON95275 DNA;b)确认后代中存在可诊断玉米事件MON95275 DNA的DNA区段;以及c)选择包含玉米事件MON95275 DNA的后代。在某些实施方案中,这些后代是抗玉米根虫的玉米植物。

[0019] 本发明的另一实施方案是玉米种子、无生命植物材料或微生物,其包含可检测量的选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10,或其完整互补序列。

[0020] 另一实施方案是商品玉米产品,其包含可检测量的对描述玉米事件MON95275的DNA独特的DNA分子,其中所述分子包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。预期的商品玉米产品包括但不限于完整或加工过的玉米种子、包含玉米的动物饲料、玉米油、玉米面、玉米粉、玉米片、玉米糠、玉米生物质和使用玉米和玉米部分生产的燃料产品。

[0021] 本发明的另一实施方案是玉米植物、玉米植物部分或其玉米种子,其包含当在DNA扩增方法中测试时充当模板的DNA,产生可诊断是否存在玉米事件MON95275 DNA的扩增子。

[0022] 本发明的另一实施方案是确定包含描述玉米事件MON95275的DNA的玉米植物或玉米种子的基因组的接合性的方法。接合性是在一系列连续步骤中确定的。在第一步中,使包含玉米DNA的样品与第一引物对接触,所述第一引物对能够产生诊断描述玉米事件MON95275并且仅存在于所述玉米事件中的DNA的扩增子。接着使包含玉米DNA的样品与第二引物对接触,所述引物对被设计用于产生玉米植物中已知为单拷贝且纯合的内标的扩增子。所述方法另外包括使DNA样品与探针组接触,所述探针组至少含有与玉米事件MON95275的等位基因特异性杂交的第一探针和与玉米植物中已知为单拷贝且纯合的内标基因组DNA特异性杂交的第二探针。所述方法还包括使用实时PCR进行DNA扩增反应并确定对应于玉米事件MON95275的等位基因和单拷贝纯合内标的扩增子的循环阈值(Ct值)。扩增后,可计算单拷贝纯合内标扩增子的Ct值与玉米事件MON95275扩增子的等位基因的Ct值之差(ΔCt)。在一个实施方案中,确定接合性,其中约零(0)的ΔCt指示玉米事件MON95275的插入T-DNA的纯合性,并且约一(1)的ΔCt指示玉米事件MON95275的插入T-DNA的杂合性。在此方法的某些实施方案中,引物对选自由以下组成的组:SEQ ID NO:15与SEQ ID NO:16的组合,以及SEQ ID NO:18与SEQ ID NO:19的组合;并且其中探针是SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:20。在

本发明的另一实施方案中,约一(1)的ΔCt指示玉米事件MON95275的插入T-DNA的杂合性在0.75至1.25范围内。在某些实施方案中,约零(0)的ΔCt可为约0、0.05、0.1、0.15、0.2或0.25,在其它实施方案中,约一(1)的ΔCt可为约0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.05、1.1、1.15、1.2或1.25。在另一实施方案中,约一(1)的ΔCt可在以下范围内:0.75至1.25、0.8至1.25、0.85至1.25、0.9至1.25、0.95至1.25、1.0至1.25、1.05至1.25、1.1至1.25、1.15至1.25、1.2至1.25、0.75至1.2、0.8至1.2、0.85至1.2、0.9至1.2、0.95至1.2、1.0至1.2、1.05至1.2、1.1至1.2、1.15至1.2、0.75至1.15、0.8至1.15、0.85至1.15、0.9至1.15、0.95至1.15、1.0至1.15、1.05至1.15、1.1至1.15、0.75至1.1、0.8至1.1、0.85至1.1、0.9至1.1、0.95至1.1、1.0至1.1、1.05至1.1、0.75至1.05、0.8至1.05、0.85至1.05、0.9至1.05、0.95至1.05、1.0至1.05、0.75至1.0、0.8至1.0、0.85至1.0、0.9至1.0、0.95至1.0、0.75至0.95、0.8至0.95、0.85至0.95、0.9至0.95、0.75至0.9、0.75至0.85、0.75至0.8、0.8至0.9、0.8至0.85、或0.85至0.9。

[0023] 本发明的另一实施方案是确定包含玉米事件MON95275的玉米植物或玉米种子的接合性的方法,所述方法包括:a)使包含玉米DNA的样品与一组引物对接触,所述引物对包含至少两个不同的引物对,其能够产生可诊断玉米事件MON95275的第一扩增子和可诊断不包含玉米事件MON95275的天然玉米基因组DNA的第二扩增子;i)用样品和所述组的引物对进行核酸扩增反应;ii)在核酸扩增反应中检测可诊断玉米事件MON95275的第一扩增子,或可诊断不包含玉米事件MON95275的天然玉米基因组DNA的第二扩增子,其中仅存在第一扩增子可诊断样品中的纯合事件MON95275 DNA,并且存在第一扩增子和第二扩增子两者可诊断就玉米事件MON95275等位基因来说是杂合的玉米植物;或b)使包含玉米DNA的样品与探针组接触,所述探针组至少含有与玉米事件MON95275 DNA特异性杂交的第一探针且至少含有与因插入玉米事件MON95275 DNA的异源DNA而被破坏的玉米基因组DNA特异性杂交并且不与玉米事件MON95275 DNA杂交的第二探针;i)在严格杂交条件下将探针组与样品杂交,其中在杂交条件下仅检测到第一探针的杂交可诊断样品中玉米事件MON95275 DNA的纯合等位基因,并且其中在杂交条件下检测到第一探针和第二探针两者可诊断所述样品中玉米事件MON95275的杂合等位基因。在此方法的一个实施方案中,所述组的引物对包含SEQ ID NO:15与SEQ ID NO:16的组合,其可用于产生可使用SEQ ID NO:17中阐述的探针序列检测的扩增子,和SEQ ID NO:21与SEQ ID NO:22的组合,其可用于产生可使用SEQ ID NO:23中阐述的探针序列检测的扩增子。

[0024] 本发明的前述和其它方面将从以下详细描述中变得更显而易见。

附图说明

[0025] 图1是存在于SEQ ID NO:10中所示的核苷酸序列内的DNA元件/区段的方向和比对的图形描绘,所述核苷酸序列是插入的转基因DNA的序列和存在于玉米事件MON95275内的玉米基因组的对应相邻5'和3'序列。[1](SEQ ID NO:1)和[2](SEQ ID NO:2)各自图形表示50个连续核苷酸区段的序列的大致位置,分别称为5'或3'接头序列,分别是[9]的任意指定的左5'端和右3'端接头序列,分别由玉米基因组DNA的25个连续核苷酸([10]的浅灰色阴影区段的末端)和相邻插入的转基因DNA的25个连续核苷酸([10]的深灰色阴影区段)组成;[3](SEQ ID NO:3)和[4](SEQ ID NO:4)各自图形表示DNA在5'和3'接头位置的100个连续

核苷酸区段,分别是5'或3'接头序列,并且各自含有玉米基因组DNA的50个连续核苷酸和相邻插入转基因DNA的50个连续核苷酸;[5](SEQ ID NO:5)和[6](SEQ ID NO:6)各自图形表示DNA在接头位置的200个连续核苷酸区段,分别是5'或3'接头序列,并且各自含有玉米基因组DNA的100个连续核苷酸和相邻插入转基因DNA的100个连续核苷酸;[7](SEQ ID NO:7)代表玉米基因组DNA和插入转基因DNA的5'接头区,且含有玉米基因组DNA的1,073个连续核苷酸和相邻插入转基因DNA的153个连续核苷酸;[8](SEQ ID NO:8)代表玉米基因组DNA和插入转基因DNA的3'接头区,且含有插入转基因DNA的101个连续核苷酸和相邻玉米基因组DNA的1,006个连续核苷酸;[9](SEQ ID NO:9)代表插入DNA的长度和结构,并且箭头和每个箭头下方的标签代表插入DNA内三个盒中的表达元件,其中RB/LB代表农杆菌双边界介导的转化载体的右边界和左边界的位置,LoxP代表标记切除后的插入DNA中剩余的Cre重组酶识别位点的位置,三个字母E代表对应构建体中增强子元件的位置,三个字母P代表对应构建体中启动子元件的位置,三个字母L代表对应构建体中前导序列(5'非翻译区,5'UTR)的位置,三个字母I代表对应构建体中内含子序列的位置,三个字母T代表对应构建体中转录终止序列(3'非翻译区,3'UTR)的位置,并且ISR代表基因间序列区(ISR4)的位置。图纸页面从右到左的三个构建体编码鞘翅目害虫毒性Vip4Da2和Cry75Aa1毒素,以及编码能够折叠成发夹形双链分子的RNA分子的区段,所述双链分子设计用于抑制来自翻译的蛋白质Snf7的转录物且从而减少所述蛋白质,所述蛋白质是一种对玉米根虫幼虫生存至关重要的蛋白质。[11](SEQ ID NO:11)代表侧接插入DNA的5'端的玉米基因组DNA的位置,并且[12](SEQ ID NO:12)代表侧接插入DNA的3'端的玉米基因组DNA的位置。[15](SEQ ID NO:15,引物SQ51355)和[16](SEQ ID NO:16,引物SQ51355)代表可用于热扩增反应以产生含有正确的插入物/基因组接头的74个核苷酸的扩增子的引物对的位置,箭头显示扩增将继续从[10]内的对应位置形成扩增子的方向。[17](SEQ ID NO:17,PB10263)代表探针和探针将结合(或杂交)使用引物[16]和[17]产生的扩增子,以检测样品中是否存在MON95275事件的位置。

[0026] 图2说明了用于转化玉米的质粒载体中的T-DNA盒。一个插入事件在进行Cre重组酶标记切除时产生事件MON95275。[13](SEQ ID NO:13)说明整合前质粒载体中的DNA("整合前的T-DNA")。[13]下面的箭头代表包含在三个转基因盒中的单个遗传元件,所述转基因盒被设计成表达结果有效的鞘翅目毒剂。CP4 EPSPS可选择标记盒位于两个LoxP区段之间,所述两个片段被Cre重组酶识别,并且能够从含有[13]的插入事件中切除可选择标记。插入事件DNA表示为[14],与[13]的不同之处仅在于区段[13]已被插入玉米基因组中,并且现在被描绘为在5'和3'被标记为5'Flank和3'Flank的玉米基因组区段侧接。[18]表示在图1中显示为[10]的区段。

[0027] 图3是赖以选择玉米事件MON95275的研究、测试和开发的时间表的图形表示。

[0028] 序列简述

[0029] SEQ ID NO:1是50个核苷酸的序列,其代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区(在SEQ ID NO:1的5'端的25个核苷酸的玉米基因组DNA,在SEQ ID NO:1的3'端的25个核苷酸的转基因插入DNA),且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置1,049-1,098中鉴定。

[0030] SEQ ID NO:2是50个核苷酸的序列,其代表整合的转基因表达盒和玉米基因组DNA的3′接头区(在SEQ ID NO:2的5'端的25个核苷酸的转基因插入DNA,在SEQ ID NO:2的3'端

的25个核苷酸的玉米基因组DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,731-15,780中鉴定。

[0031] SEQ ID NO:3是100个核苷酸的序列，其代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区(在SEQ ID NO:3的5’端的50个核苷酸的玉米基因组DNA，在SEQ ID NO:3的3’端的50个核苷酸的转基因插入DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置1,024-1,123中鉴定。

[0032] SEQ ID NO:4是100个核苷酸的序列，其代表整合的转基因表达盒和玉米基因组DNA的3′接头区(在SEQ ID NO:4的5’端的50个核苷酸的转基因插入DNA，在SEQ ID NO:4的3’端的50个核苷酸的玉米基因组DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,706-15,805中鉴定。

[0033] SEQ ID NO:5是200个核苷酸的序列，其代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区(在SEQ ID NO:5的5’端的100个核苷酸的玉米基因组DNA，在SEQ ID NO:5的3’端的100个核苷酸的转基因插入DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置974-1,173中鉴定。

[0034] SEQ ID NO:6是200个核苷酸的序列，其代表整合的转基因表达盒和玉米基因组DNA的3′接头区(在SEQ ID NO:6的5’端的100个核苷酸的转基因插入DNA，在SEQ ID NO:6的3’端的100个核苷酸的玉米基因组DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,656-15,855中鉴定。

[0035] SEQ ID NO:7是1,226个核苷酸的序列，其代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区(在SEQ ID NO:5的5’端的1,073个核苷酸的玉米基因组DNA，在SEQ ID NO:5的3’端的153个核苷酸的转基因插入DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置1-1,226中鉴定。

[0036] SEQ ID NO:8是1,207个核苷酸的序列，其代表整合的转基因表达盒和玉米基因组DNA的3′接头区(在SEQ ID NO:8的5’端的101个核苷酸的转基因插入DNA，在SEQ ID NO:8的3’端的1,106个核苷酸的玉米基因组DNA)，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,655-16,861中鉴定。

[0037] SEQ ID NO:9是对应于玉米事件MON95275的转基因插入T-DNA的14,682个核苷酸的序列，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置1,074-15,755中鉴定。

[0038] SEQ ID NO:10是16,861个核苷酸的序列，对应于5′基因组侧接DNA核苷酸序列、事件MON95275中的插入T-DNA核苷酸序列和3′基因组侧接DNA核苷酸序列的连续核苷酸序列；且包括SEQ ID NO:11(核苷酸1-1,073)、SEQ ID NO:9(核苷酸1,074-15,755)和SEQ ID NO:12(核苷酸15,756-16,861)。

[0039] SEQ ID NO:11是1,073个核苷酸的序列，其代表侧接插入T-DNA的5’端的玉米基因组DNA，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置1-1,073中鉴定。

[0040] SEQ ID NO:12是1,106个核苷酸的序列，其代表侧接插入T-DNA的3’端的玉米基因组DNA，且可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,756-16,861中鉴定。

[0041] SEQ ID NO:13是19,612个核苷酸的序列，其代表包含在用于转化玉米以产生玉米事件MON95275的二元植物转化质粒载体中的转基因盒。

[0042] SEQ ID NO:14是35个核苷酸的LoxP序列，其代表用于Cre介导的切除和重组，并且

剩余序列可在SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,444-15,478中鉴定。

[0043] SEQ ID NO:15是对应于称为SQ20267的热扩增引物的27个核苷酸的序列,所述热扩增引物可用于鉴定样品中的玉米事件MON95275 DNA或可用于检测当进行Cre重组酶标记切除时产生事件MON95275 DNA的插入事件。SEQ ID NO:15与对应于SEQ ID NO:10的位置15,706-15,732的核苷酸序列相同。

[0044] SEQ ID NO:16是对应于称为SQ51355的热扩增引物的24个核苷酸的序列,所述热扩增引物用于鉴定样品中的玉米事件MON95275DNA或可用于检测当进行Cre重组酶标记切除时产生事件MON95275 DNA的插入事件。SEQ ID NO:16与对应于SEQ ID NO:10的位置15,756-15,779的核苷酸序列的反向互补序列相同。

[0045] SEQ ID NO:17是对应于称为PB10263的探针的19个核苷酸的序列,所述探针用于鉴定样品中的玉米事件MON95275 DNA或可用于检测当进行Cre重组酶标记切除时产生事件MON95275 DNA的插入事件。SEQ ID NO:17与对应于SEQ ID NO:10的位置15,734-15,752的核苷酸序列相同,并且作为探针可结合至在此位置具有核苷酸的反向互补序列的多核苷酸区段。

[0046] SEQ ID NO:18是对应于称为SQ20222的热扩增引物的24个核苷酸的序列,所述热扩增引物用作玉米事件MON95275的事件和接合性分析的内部对照,并与玉米基因组的区域杂交。

[0047] SEQ ID NO:19是对应于称为SQ20221的热扩增引物的28个核苷酸的序列,所述热扩增引物用作玉米事件MON95275的事件和接合性分析的内部对照,并与玉米基因组的区域杂交。

[0048] SEQ ID NO:20是对应于称为PB50298的探针的17个核苷酸的序列,所述探针用作玉米事件MON95275的事件和接合性分析的内部对照,并与玉米基因组的区域杂交。

[0049] SEQ ID NO:21是对应于称为PNEG95275_F的热扩增引物的20个核苷酸的序列,所述热扩增引物用于玉米事件MON95275的接合性分析,并与当用于产生事件MON95275的T-DNA插入玉米基因组时被删除的玉米基因组DNA区域杂交。使用引物PNEG95275_F和PNEG95275_R(SEQ ID NO:22)的组合和作为模板的天然玉米DNA在热扩增反应中产生的扩增子可诊断缺乏MON95275插入的T-DNA的野生型等位基因。

[0050] SEQ ID NO:22是对应于称为PNEG95275_R的热扩增引物的20个核苷酸的序列,所述热扩增引物用于玉米事件MON95275的接合性分析,并与当用于产生事件MON95275的T-DNA插入玉米基因组时被删除的玉米基因组DNA区域杂交。使用引物PNEG95275_F(SEQ ID NO:21)和PNEG95275_R的组合和作为模板的天然玉米DNA在热扩增反应中产生的扩增子可诊断缺乏MON95275插入的T-DNA的野生型等位基因。

[0051] SEQ ID NO:23是对应于称为PRBNEG95275的探针的17个核苷酸的序列,所述探针用于确认存在玉米事件MON95275的接合性分析,并与当用于产生事件MON95275的T-DNA插入玉米基因组时被删除的天然玉米基因组DNA区域杂交。

[0052] SEQ ID NO:24是在植物中充当表达增强子区段的DNA序列。

[0053] SEQ ID NO:25是与未翻译前导序列可操作连接的植物功能启动子。

[0054] SEQ ID NO:26是在植物中充当表达增强子区段的DNA序列。

具体实施方式

[0055] 本发明提供了转基因玉米事件MON95275,其通过表达Cry75Aa1、Vip4Da2和靶向抑制天然和必需玉米根虫DvSnf7的dsRNA来实现对玉米鞘翅目害虫的杀虫控制。具体来说,玉米事件MON95275提供了对鞘翅目害虫西方玉米根虫(玉米根萤叶甲,WCR)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲,NCR)的抗性。玉米事件MON95275将满足在存在玉米根虫的玉米农业生产中控制这些昆虫的巨大需求,因为化学杀虫剂通常不能对这些昆虫提供足够的控制,或者因为需要在整个生长季节中多次应用此类化学物质,增加了劳动力需求、碳足迹和环境中化学杀虫剂的投入,并显著增加了玉米生产成本。本文提及玉米事件MON95275意欲等同于提及MON 95275、事件MON95275、事件MON 95275、MON95275事件、MON 95275事件;所述提及是可互换的。

[0056] 对事件MON95275提供的鞘翅目物种侵染的抗性的产生与编码两种杀虫蛋白的DNA区段和能够干扰玉米根虫必需基因的双链RNA(dsRNA)的表达有关,所述DNA区段和所述dsRNA可操作且共价地连接于部分定义玉米事件MON95275的插入转基因DNA内。MON95275事件中的两种杀虫蛋白是Cry75Aa1蛋白(美国专利申请公开案第2016-0319302A2号,SEQ ID NO:25,编码序列,SEQ ID NO:37)和Vip4Da2蛋白(美国专利第10,100,330号,SEQ ID NO:2,编码序列,SEQ ID NO:3)。在被根虫摄入时,MON95275事件中产生的dsRNA靶向抑制西方玉米根虫(Western Corn Rootworm,玉米根萤叶甲)中称为DvSnf7的基因(参见例如美国专利第7,943,818号,SEQ ID NO:818)。这两种杀虫蛋白和dsRNA从插入的转基因DNA构建体中的三个表达盒表达,如SEQ ID NO:9中所阐述以及图1中所说明。

[0057] 玉米事件MON95275中的Cry75Aa1蛋白由以下各者表达:可操作地连接至源自大丽花花叶病毒启动子,Genbank登录号EF513491,核苷酸1至322的增强子的摩擦禾(Tripsacum dactyloides)RCc3启动子(美国专利第9,617,553号,SEQ ID NO:13)和前导子;和谷子14-3-3C蛋白基因内含子(美国专利申请公开案第2013-0031672A2号,SEQ ID NO:151)。

[0058] 玉米事件MON95275中的Vip4Da2蛋白由以下各者表达:用源自多个公共大丽花花叶病毒启动子的重排增强子增强的玉蜀黍脂质转移蛋白启动子和前导子,以及谷子肌动蛋白4基因内含子(美国专利申请第2013-0031672A2号,SEQ ID NO:627)。与玉蜀黍脂质转移蛋白启动子和前导子可操作连接的大丽花花叶病毒(DaMV)增强子是源自几个公共DaMV Genbank登录号的片段的重排复合物,并呈现为SEQ ID NO:24。第一片段源自DaMV-Holland(DaMV-H)菌株,Genbank登录号EU090957,核苷酸1177-1494的启动子。此片段可操作地连接至源自DaMV-H启动子,核苷酸1003-1176的第二片段。在第一片段内,相对于SEQ ID NO:24,核苷酸287至288和核苷酸319至322被改变为Genbank登录号JX272320中DaMV启动子的类似位置的序列。在天然DaMV启动子配置中,第二片段将在第一片段之前。这两个片段的重排导致相对于天然片段更高的表达,且因此被选择用于事件MON95275。

[0059] 玉米事件MON95275中编码DvSnf7特异性dsRNA的序列由以下各者驱动:源自花椰菜花叶病毒(CaMV)分离株NY8153的启动子和前导子(呈现为SEQ ID NO:25),所述启动子和前导子由源自编码来自玉蜀黍的物理阻抗诱导蛋白的pIIG基因的启动子的增强子增强;和玉蜀黍hsp70内含子。CaMV启动子/前导子来源于Genbank登录号M90541,核苷酸6,907至7,482。相对于SEQ ID NO:25,第二核苷酸从苏氨酸(T)变为腺嘌呤(A)以去除可操作连接的盒构型中的潜在起始密码子。此CaMV启动子/前导子包含相对于玉米事件MON87411中的CaMV

启动子和前导子更长的前导序列。相对于MON87411,此更长的前导子增加了MON95275中DvSNF7 dsRNA的表达水平。

[0060] MON95275中Cry75Aa1和Vip4Da2转基因盒的表达以收敛方式定向,如图1中所示。MON95275中的DvSnf7转基因盒相对于Cry75Aa1转基因盒以不同方向定向,如图1中所示。DvSnf7和Cry75Aa1转基因盒由一个基因间序列区(ISR4,美国临时申请序号62/875,752)彼此分开。图1显示了每个元件的相对位置-增强子(E)、启动子(P)、5′UTR或前导子(L)、内含子(I)、3′UTR(T)、ISR4(ISR)、DvSnf7、Cry75Aa1和Vip4Da2-包含于SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中。

[0061] 如本文所述,评估了在使用表达元件、毒素编码序列和方向方面不同的许多构建体。用于产生玉米事件MON95275的构建体如图2所示并呈现为SEQ ID NO:13,在评估对鞘翅目害虫侵染的抗性时提供了相对于其它构建体的优异性能。另外,玉米事件MON95275由于使用Cre重组酶切除而不含用于选择转化植物细胞的标记。CP4选择盒示于图2中,且包含于SEQ ID NO:13中。CP4选择盒的两侧是两个LoxP位点。在与表达Cre的转基因玉米事件育种后,使用Cre重组酶的切除导致CP4选择盒的丢失。评估所得后代是否缺乏选择盒以及缺乏Cre重组酶表达盒,并且选择缺乏两者的后代进行进一步评估,从而选择无标记玉米事件MON95275。

[0062] 基于与数千个不同独立转基因事件的比较选择事件MON95275,每个转基因事件都用包含呈现为SEQ ID NO:13的转基因盒的构建体,或包含相同或不同毒素的其它构建体转化。将产生的表达昆虫毒素的事件与相同品种的非转基因玉米对照植物进行比较。实施例中所示的结果表明,由于Cry75Aa1和Vip4Da2蛋白以及DvSnf7特异性dsRNA的表达,事件MON95275显示出优异的特性。使用用于产生事件MON95275的构建体产生的多个转基因事件各自比用其它构建体产生的其它事件更可能表现出对鞘翅目害虫的有效控制。

[0063] MON95275通过植物转化技术产生,所述技术用于将异源DNA(也称为转基因DNA)随机插入玉米细胞基因组的染色体中以产生遗传工程化玉米细胞,也称为“转基因”或“重组”玉米细胞。使用此技术,许多单个细胞被转化,由于外来DNA随机插入基因组,每个细胞都导致独特的“转基因事件”或“事件”。接着从每个单个的转基因细胞再生出转基因植物。这导致转基因植物的每个细胞都含有独特插入的转基因事件作为其基因组的稳定部分。接着可使用此转基因植物来产生种子,其接着被种植并长成后代植物,每个后代植物都含有独特的转基因事件。

[0064] 玉米事件MON95275是由采用单一T-DNA二元系统的农杆菌介导的玉米未成熟胚的转化过程产生的。在此系统中,使用了一种农杆菌菌株,所述菌株采用一种具有单一T-DNA的二元质粒载体。T-DNA构建体包含三个转基因盒,用于表达编码Cry75Aa、Vip4Da2的昆虫毒素编码序列和编码DvSnf7的dsRNA编码序列,以及一个用于使用草甘膦选择(CP4)来选择转化的玉米细胞的转基因盒。T-DNA构建体是SEQ ID NO:13并在图2中说明(“整合前的T-DNA”)。在整合过程中,在一个不处于任何编码序列或表达元件内的区域中,单个核苷酸在SEQ ID NO:13的核苷酸(nt)位置5,300(SEQ ID NO:9的nt 4,986和SEQ ID NO:10的nt 6,059)处从鸟嘌呤(G)变为苏氨酸(T)。此外,在整合过程中,在插入的T-DNA与3′基因组侧接DNA之间插入了六(6)个核苷酸,并从野生型基因组DNA中删除了七百四十六(746)个核苷酸。草甘膦选择盒的两侧都是LoxP识别位点,所述位点被源自肠杆菌噬菌体P1的Cre重组酶

识别(Larry Gilbertson(2003)Cre-lox recombination:Cre-active tools for plant biotechnology.TRENDS in Biotechnology,21:12,550-555)。

[0065] 如本文具体所述,玉米事件MON95275是通过复杂的研究和开发过程产生的,其中:(1)超过一百六十(160)个质粒载体构建体(其在杀虫蛋白的编码序列、转录调控元件的编码序列以及构建体中盒的数量和方向方面有所不同)被开发并转化至玉米细胞中以产生数千个事件,所述事件经过测试和分析,从而选择用于生成事件MON95275的构建体;(2)用用于生成事件MON95275的构建体转化数千个玉米细胞,产生转基因植物群,其中每株植物都含有一个被再生和测试的独特转基因事件;(3)最终事件MON95275在严格的多年事件选择过程,包括在多种遗传背景下对分子特征、功效、蛋白质表达和农艺特性进行测试和分析后选定;以及(4)通过体内Cre切除去除玉米事件MON95275中的草甘膦选择盒以产生"无标记"最终事件MON95275。因此,产生玉米事件MON95275并选择其作为可用于大规模农艺目的的独特优异事件。

[0066] 插入玉米事件MON95275基因组中的质粒DNA通过详细的分子分析进行了表征。此分析包括:插入数(玉米基因组中整合位点的数量)、基因组插入位置(玉米基因组中发生插入的特定位点)、拷贝数(一个基因座内的T-DNA的拷贝数)以及转基因插入DNA的完整性。详细的分子分析表明,在草甘膦(CP4)选择盒的整合和Cre切除后,含有Cry75Aa1、Vip4Da2和DvSnf7表达盒的整合T-DNA保持完整。如本文所用,"表达盒"或"盒"是重组DNA分子,其包含将由转化细胞表达的不同元件的组合。表1提供了对应于玉米事件MON95275的DNA序列SEQ ID NO:10中所含的元件的列表。

[0067] 表1.玉米事件MON95275的描述

[0068]

元件	在 SEQ ID NO:10 中的位置	描述
5'侧接 DNA	1-1073	侧接转基因插入物的 5'端的 DNA 序列。
右边界区域	1074-1090	含有右边界序列的根癌农

[0069]

元件	在 SEQ ID NO:10 中的位置	描述
		*杆菌(Agrobacterium tumefaciens)*的 DNA 区域。
T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6	1196-1828	来自*豌豆(Pisum sativum)*的核酮糖二磷酸羧化酶小亚基基因的 3'非翻译区。
DvSnf7	1858-2478	*Snf7* 基因的部分编码序列经设计以与编码 ESCRT-III 复合物的 SNF7 亚基，形成 dsRNA 以抑制 Snf7 基因转录物的*西方玉米根虫*的部分编码序列匹配。
I-Zm.DnaK:1	2524-3327	来自*玉蜀黍*的编码热休克蛋白 70 (HSP70)的 hsp70 基因的内含子和侧接外显子序列。
L-CaMV.35S-1:1:14	3334-3384	源自花椰菜花叶病毒分离株 NY8153 的 35S RNA 的 5'非翻译区。
P-CaMV.35S-1:1:67	3385-3909	源自花椰菜花叶病毒分离株 NY8153 的 35S RNA 的启动子。
E-Zm.PIIG-1:1:1	3910-4824	源自编码*玉蜀黍*物理阻抗诱导蛋白的 *pIIG* 基因启动子的增强子。
IG-Des.Isr4:1	4832-6050	基因间序列区
E-DaMV.FLT-1:1:2	6072-6393	源自大丽花花叶病毒启动子的增强子序列，Genbank 登录号 EF513491，核苷酸

[0070]

元件	在 SEQ ID NO:10 中的位置	描述
		1 至 322。
P-Td.RCc3_1:1	6407-7146	源自*摩擦禾* RCc3 基因的启动子。
L-Td.RCc3_1:1	7147-7237	源自*摩擦禾* RCc3 基因的 5'非翻译区。
I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	7238-7342	源自谷子的 14-3-3C 蛋白基因的内含子。
Cry75Aa1	7364-8521	Cry75Aa1 昆虫毒素的编码序列。
T-Cl.Hsp16.9_2:1	8269-8829	源自*薏苡(Coix lacryma-jobi)*热休克蛋白 16.9 基因的 3'非翻译区。
T-SETit.Ams1:1	8856-9290	源自谷子 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 1 基因的 3'非翻译区。
Vip4Da2	9298-12111	Vip4Da2 昆虫毒素的编码序列。
I-SETit.Act4-1:1:2	12138-13502	源自谷子的肌动蛋白 4 基因的内含子。
L-Zm.Ltp-1:1:3	13511-13603	源自*玉蜀黍*脂质转移蛋白基因的 5'非翻译区。
P-Zm.Ltp-1:1:2	13604-14804	源自*玉蜀黍*脂质转移蛋白基因的启动子。
E-DaMV.H-Flt:1	14805-15300	源自大丽花花叶病毒分离株的多个 ORF6 启动子的增强子序列。

[0071]

元件	在 SEQ ID NO:10 中的位置	描述
Lox-P	15444-15478	来自*肠杆菌噬菌体*P1 的位点特异性重组酶的识别序列。
左边界区域	15514-15755	含有左边界序列的*根癌农杆菌*的 DNA 区域
3'侧接 DNA	15756-16861	侧接转基因插入物的 3'端的 DNA 序列。

[0072] 玉米事件MON95275被表征为插入玉米基因组中的单个基因座,在插入DNA与玉米基因组DNA之间产生两个新的基因座或接头序列(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中阐述的序列),已知所述基因座或接头序列不天然存在于玉米基因组或其它转基因玉米事件中,它们是事件MON95275所特有的。这些接头序列可用于检测玉米细胞、玉米组织、玉米种子和玉米植物或玉米植物产品,例如玉米商品产品中是否存在事件MON95275。本文描述了DNA分子探针和引物对,它们已被开发用于鉴定生物样品中这些不同接头区段的存在,所述生物样品含有或疑似含有含MON95275事件的玉米细胞、玉米种子、玉米植物部分或玉米植物组织。

[0073] 样品旨在指一种组合物,所述组合物或者是基本上纯的玉米DNA,或者是含有玉米DNA的组合物。在任何一种情况下,样品都是生物样品,即其含有生物材料,包括但不限于直接或间接获自或源自玉米事件MON95275的基因组的DNA。“直接”是指技术人员通过破碎玉米细胞(或通过获得含有破碎玉米细胞的玉米样品)并出于检测目的暴露基因组DNA而直接从玉米基因组获得DNA的能力。“间接”是指技术人员通过直接除破碎玉米细胞或获得含有破碎玉米细胞的玉米样品以外的其它方式获得目标或特定参考DNA,即本文描述为可诊断特定样品中是否存在事件MON95275的新型和独特接头区段的能力。此类间接方式包括但不限于扩增含有特定探针靶向的DNA序列的DNA区段,所述特定探针被设计成与靶序列特异性结合,或扩增可测量和表征的DNA区段,即,通过一些有效基质(例如琼脂糖或丙烯酰胺凝胶等)与其它DNA区段分离来测量,或通过扩增子的直接序列分析,或将扩增子克隆至载体中并对存在于此类载体中的插入扩增子进行直接测序。

[0074] 详细的分子分析还表明,事件MON95275含有单个T-DNA插入,每个Cry75Aa1、Vip4Da2和DvSnf7特异性dsRNA表达盒都有一个拷贝。在事件MON95275中,除了用于将转基因DNA从植物转化质粒转移至玉米基因组的根癌农杆菌左右边界区域的部分之外,没有从转化构建体中鉴定出其它元件。此外,产生特定扩增子的热扩增可诊断样品中是否存在事件MON95275,并进行DNA序列分析以确定任意指定的5′和3′插入物与植物基因组接头,确认插入物中元件的组织,并确定插入的转基因DNA的完整DNA序列(SEQ ID NO:9)。SEQ ID NO:11是代表侧接呈现为SEQ ID NO:9的插入T-DNA序列的一千零七十三(1,073)个碱基对(bp)

5′LH244玉米基因组DNA序列的序列。SEQ ID NO:12是代表侧接呈现为SEQ ID NO:9的插入T-DNA序列的一千一百零六(1,106)bp 3′LH244玉米基因组DNA序列的序列。SEQ ID NO:7是代表侧接插入T-DNA序列的一千二百二十六(1,226)个碱基对(bp)5′LH244玉米基因组DNA序列与一百五十三(153)bp呈现为SEQ ID NO:9的插入T-DNA序列的组合的序列。SEQ ID NO:8是代表一百零一(101)bp插入T-DNA序列与侧接呈现为SEQ ID NO:9的插入T-DNA序列的一千一百零六(1,106)bp 3′LH244玉米基因组DNA序列的序列。SEQ ID NO:10对应于玉米事件MON95275并且含有包含5′LH244侧接序列、MON95275的转基因插入物和3′LH244侧接序列的连续序列(contig),且因此含有插入物-植物基因组接头序列。

[0075] 除非本文另有说明,否则相关领域的普通技术人员将根据常规用法来理解术语。分子生物学中常用术语的定义可在Rieger等人,Glossary of Genetics:Classical and Molecular,第5版,Springer-Verlag:New York,1991;和Lewin,Genes V,Oxford University Press:New York,1994,以及本领域普通技术人员已知的其它来源中找到。如本文所用,术语“玉米”是指属于玉蜀黍属的物种,优选玉蜀黍,并且包括可与含有事件MON95275的玉米植物杂交的所有植物品种,包括野生玉米物种以及允许种间培育的属于玉蜀黍属的那些植物。

[0076] 提供了已用含有表达盒的DNA构建体转化的转基因植物,所述表达盒表达毒性量的杀虫蛋白Cry75Aa1和Vip4Da2,以及毒性量的特异性抑制DvSnf7的杀虫dsRNA。毒性量是指有效量、杀虫量、杀虫有效量、目标昆虫抑制量、有效杀虫量、在鞘翅目昆虫饮食中杀虫的量,以及相关领域的普通技术人员根据常规用法理解的其它类似术语。根据所述方法和用本文公开的DNA构建体转化的玉米植物对鞘翅目害虫具有抗性。

[0077] 转基因“植物”是如下产生的:通过用异源DNA,即包括许多感兴趣的有效特征的多核酸构建体转化植物细胞;由将转基因插入植物细胞基因组中产生的植物再生;以及选择以插入特定基因组位置和再生转基因植物的有效特征的数量为特征的特定植物。术语“事件”是指来自原始转化体的DNA,其包含插入的DNA和紧邻插入的DNA的侧接基因组序列。此类DNA是独特的,并且由于包括插入DNA的亲本系(例如,原始转化体和自交产生的后代)和第二亲本系,例如不包含插入DNA的亲本系的有性杂交而预期会转移到接受插入DNA的后代,包括感兴趣的转基因。本发明还提供原始转化体植物和包括异源DNA的转化体后代。这样的后代可通过包含所述事件的植物与其中后代包括异源DNA的另一种植物之间的有性异交来产生。即使在与轮回亲本反复回交后,所述事件仍存在于杂交后代的同一染色体位置。

[0078] 如本文所用,术语“重组”是指非天然DNA、蛋白质或生物体,其通常在自然界中不存在并且是通过人为干预产生的。“重组DNA分子”是包含不会天然一起存在的DNA分子组合的DNA分子,并且是人为干预的结果。例如,由至少两种相互异源的DNA分子的组合构成的DNA分子,例如包含转基因和与转基因相邻的植物基因组DNA的DNA分子是重组DNA分子。

[0079] 本文提及的术语“DNA”和“DNA分子”是指脱氧核糖核酸(DNA)分子。DNA分子可为基因组或合成来源的,并且按照惯例是从5’(上游)端至3’(下游)端。如本文所用,术语“DNA序列”是指DNA分子的核苷酸序列。按照惯例,本发明的DNA序列和其片段仅参考双链互补DNA序列链中的一条链来公开。通过暗示和意图,本文提供的序列的互补序列(互补链的序列)在本领域中也称为反向互补序列,在本发明的范围内,并且明确地意图在所要求保护的主题的范围内。

[0080] 如本文所用,术语“片段”是指整体的较小部分。例如,SEQ ID NO:10的片段将包括SEQ ID NO:10的完整序列的至少约12个连续核苷酸、至少约13个连续核苷酸、至少约14个连续核苷酸、至少约15个连续核苷酸、至少约16个连续核苷酸、至少约17个连续核苷酸、至少约18个连续核苷酸、至少约19个连续核苷酸、至少约20个连续核苷酸、至少约25个连续核苷酸、至少约30个连续核苷酸、至少约35个连续核苷酸、至少约40个连续核苷酸、至少约45个连续核苷酸、至少约50个连续核苷酸、至少约60个连续核苷酸、至少约70个连续核苷酸、至少约80个连续核苷酸、至少约90个连续核苷酸、或至少约100个连续核苷酸。

[0081] 在本申请中,提及“分离的DNA分子”或者等同术语或短语旨在意指一种DNA分子,其单独存在或与其它组合物组合存在,但不在其天然环境中存在。例如,在生物体的基因组的DNA中天然存在的核酸元件(诸如编码序列、内含子序列、非翻译前导序列、启动子序列、转录终止序列等),只要所述元件位于生物体的基因组内并且在其天然存在的基因组内的位置处,就不被认为是“分离的”。然而,只要所述元件不在生物体的基因组内并且不在其天然存在的基因组内的位置处,这些元件中的每一个以及这些元件的子部分在本公开的范围内就将会是“分离的”。类似地,编码杀虫蛋白或所述蛋白的任何天然存在的杀虫变体的核苷酸序列将是分离的核苷酸序列,只要所述核苷酸序列不在天然发现编码所述蛋白的序列的细菌的DNA内。出于本公开的目的,编码天然存在的杀虫蛋白的氨基酸序列的合成核苷酸序列将被认为是分离的。为了本公开的目的,任何转基因核苷酸序列,即插入植物或细菌细胞基因组中或存在于染色体外载体中的DNA的核苷酸序列将被视为分离的核苷酸序列,无论其存在于用于转化细胞的质粒载体或类似结构中、植物或细菌的基因组中或以可检测的量存在于源自植物或细菌的组织、后代、生物样品或商品产品中。在任何情况下,分离的DNA分子是化学分子,不管它是否被称为核酸、核酸序列、多核苷酸序列、构建体、盒等。它是一种新颖的、创造性的分子,当存在于植物细胞或植物基因组中时,以及当存在于植物细胞外时都表现出工业实用性,且因此,无论分子位于哪里,都表现出并打算表现出此类效用。

[0082] 跨越转基因插入物的一端与侧接玉米基因组DNA通过磷酸二酯键联进行的连接的区域的DNA序列被称为“接头”。接头是转基因插入物和侧接DNA作为一个连续分子的连接点。在转基因插入物的5’端发现一个接头,并且在转基因插入物的3’端发现另一个接头,本文分别称为5’和3’接头。“接头序列”是指跨越事件的5’或3’接头的任何长度的DNA序列。使用SEQ ID NO:10,玉米事件MON95275的接头序列对本领域技术人员是显而易见的。MON95275的接头序列的实例提供为SEQ ID NO:1-8。图1说明了相对于SEQ ID NO:10,从5’到3’排列的接头序列的物理排列。MON95275的接头序列可作为含有MON95275的植物、种子或细胞的基因组的一部分存在。在含有来自玉米植物、玉米植物部分、玉米种子或玉米细胞的DNA的样品中鉴定出任何一个或多个接头序列表明所述DNA是从含有事件MON95275的玉米中获得的,并且可诊断是否存在玉米事件MON95275。

[0083] MON95275的接头序列可由选自由以下组成的组的序列表示:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10。例如,接头序列可由作为SEQ ID NO:1(5’接头序列)和SEQ ID NO:2(3’接头序列)提供的核苷酸序列任意表示。或者,接头序列可由作为SEQ ID NO:3(5’接头序列)和SEQ ID NO:4(3’接头序列)提供的核苷酸序列任意表示。或者,接头序列可由作为SEQ ID NO:5(5’接头序列)和SEQ ID NO:6(3’接头序列)提供的核苷酸序列任意表示。或者,接头序

列可由作为SEQ ID NO:7(5'接头序列)和SEQ ID NO:8(3'接头序列)提供的核苷酸序列任意表示。这些核苷酸序列通过磷酸二酯键连接,且在玉米事件MON95275中作为重组植物细胞基因组的一部分存在。

[0084] 这些接头序列可诊断是否存在事件MON95275或其中包含的构建体。因此,在源自玉米植物、玉米种子或玉米植物部分的样品中鉴定出SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10中的一者或多者可诊断DNA是从玉米事件MON95275中获得的。因此,本发明提供一种DNA分子,所述分子含有至少一个作为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10提供的核苷酸序列。足以包括至少一个作为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10提供的核苷酸序列的源自转基因玉米事件MON95275的任何DNA区段在本发明的范围内。另外,包含与本段中描述的任何序列互补的序列的任何多核苷酸都在本发明的范围内。

[0085] 本发明提供可用作引物或探针的示例性DNA分子,用于检测样品中是否存在包含事件MON95275 DNA的源自玉米植物的DNA。此类引物或探针对靶核酸序列具有特异性,因此可用于通过本文所述的本发明方法鉴定玉米事件MON95275核酸序列。

[0086] 使用"来源"一词旨在表示特定DNA分子位于玉米植物基因组中,或能够在玉米植物DNA中被检测到。"能够被检测到"是指特定DNA区段被扩增以及其大小或序列通过DNA序列分析来表征或阐明的能力,即靶DNA区段,以及随后检测探针与靶标结合的能力。本发明的特定DNA区段或靶DNA区段存在于含有插入事件MON95275的玉米中。

[0087] "探针"是与靶核酸链互补(反向互补)的核酸分子,并且可用于杂交方法。探针可连接至常规的可检测标记或报告分子,例如放射性同位素、配体、化学发光剂或酶。此类探针与靶核酸链互补,并且在本发明的情况下,与来自MON95275的DNA链互补,无论来自含有MON95275的植物还是来自包括MON95275 DNA的样品。因此,用于本文的探针可包含长度足以在本文定义的严格杂交条件下发挥作用的DNA分子或多核苷酸区段,以结合至存在于样品中的特定独特DNA区段并诊断样品中的事件MON95275。此类探针可设计成仅结合至单一接头或仅存在于玉米事件MON95275中的其它新型序列,或两个或更多个此类单一接头区段。根据本发明的探针不仅包括脱氧核糖核酸或核糖核酸,而且还包括与靶DNA序列特异性结合的聚酰胺和其它探针材料,并且可用于检测所述靶DNA序列是否存在。可用作检测玉米事件MON95275的探针的示例性DNA序列提供为SEQ ID NO:17(PB10263)。

[0088] "引物"典型地是被设计用于参与热扩增的特定退火或杂交方法中的DNA分子。引物可包含成对的不同寡核苷酸或多核苷酸区段,用于扩增特定DNA靶区段的热扩增反应。所述对中的每个引物都被设计成与感兴趣的DNA区段内或附近的相当特定的DNA区段结合以进行扩增。引物以使得这些引物接着充当核酸序列聚合的局部区域,从而产生一个或多个扩增子(DNA的扩增靶区段)的方式结合。由此类反应产生的扩增子将具有对应于位于引物与模板杂交的两个位点之间的模板DNA序列的DNA序列。在某些实施方案中,使用设计用于结合至玉米事件MON95275的独特区段并扩增含有一个或多个本文所述的接头序列的特定扩增子的引物,以及在聚合酶反应完成或终止时对此类扩增子的检测和/或表征可诊断特定样品中是否存在玉米事件MON95275。熟练的技术人员非常熟悉这种扩增方法,并且这里

不需要陈述扩增的细节。

[0089] 引物典型地被设计成与互补的靶DNA链杂交以在引物与靶DNA链之间形成杂合体，并且引物的存在是使用靶DNA链作为模板，聚合酶开始延伸引物(即，将额外核苷酸聚合成延长的核苷酸分子)的识别点。引物对是指使用结合双链核苷酸区段的相反链的两个引物，用于线性扩增引物对的单个成员结合的目标位置之间的多核苷酸区段，典型地在热扩增反应或其它常规反应核酸扩增方法中。可用作引物的示例性DNA分子提供为SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22。

[0090] 引物对SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16可用作第一DNA分子和不同于第一DNA分子的第二DNA分子，且两者均为SEQ ID NO:10的连续核苷酸，其长度足以在与源自玉米事件MON95275的模板DNA一起用于热扩增反应时充当DNA引物，以产生可诊断样品中的玉米事件MON95275 DNA的扩增子。引物对SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19可用作第一DNA分子和不同于第一DNA分子的第二DNA分子，且两者均为玉米基因组内的基因座的连续核苷酸，其长度足以在与源自玉米事件MON95275的模板DNA一起用于热扩增反应时充当DNA引物，以产生用作玉米事件MON95275诊断以及样品中玉米事件MON95275 DNA接合性的内部对照的扩增子。引物对SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22可用作第一DNA分子和不同于第一DNA分子的第二DNA分子，且两者均为玉米基因组内的基因座的连续核苷酸，其长度足以在与源自玉米事件MON95275的模板DNA一起用于热扩增反应时充当DNA引物，以产生可诊断不包含事件MON95275的非插入野生型玉米基因组DNA的扩增子。

[0091] DNA探针和DNA引物的长度一般为十一(11)个多核苷酸或更长，通常为十八(18)个多核苷酸或更长、二十四(24)个多核苷酸或更长、或三十(30)个多核苷酸或更长。选择这样的探针和引物，以使其长度足以在高严格性杂交条件下与靶序列特异性杂交。优选地，根据本发明的探针和引物与靶序列具有完全的序列相似性，尽管可通过常规方法设计与靶序列不同但保留与靶序列杂交的能力的探针。

[0092] 本发明的核酸探针和引物在严格条件下与靶DNA分子杂交。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可用于鉴定样品中来自转基因植物的DNA的存在。也称为核酸区段的多核酸分子或其片段在某些情况下能够与其它核酸分子特异性杂交。

[0093] 如本文所用，如果两个多核苷酸分子能够形成反平行的双链核酸结构，则称所述两个分子能够彼此特异性杂交。如果两个核酸分子表现出完全的互补性，则称一个核酸分子与另一个核酸分子“互补”。如本文所用，当分子之一的每个核苷酸与另一分子的核苷酸互补时，分子被称为表现出“完全互补性”。如果两个分子能够以足够的稳定性彼此杂交，以使它们在至少常规的“低严格性”条件下保持彼此结合，则称它们是“最小互补”的。类似地，如果分子能够以足够的稳定性彼此杂交，以使它们在常规的“高严格性”条件下保持彼此结合，则称它们是“互补的”。Sambrook等人，1989和Hames等人，Nucleic Acid Hybridization,A Practical Approach,IRL Press,Washington,DC(1985)描述了常规严格性条件。因此允许偏离完全互补，只要此类偏离不完全排除分子形成双链结构的能力即可。为了使核酸分子用作引物或探针，仅需核酸分子在序列上充分互补以在所用的特定溶剂和盐浓度下能够形成稳定的双链结构即可。

[0094] 如本文所用，基本上同源的序列是在高严格性条件下将与其所比较的核酸序列的互补序列特异性杂交的核酸序列。促进DNA杂交的适当严格性条件是本领域技术人员已知

的或可在Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6中找到,例如在约45℃下6.0×氯化钠/柠檬酸钠(SSC),接着在50℃下2.0×SSC洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可选自在50℃下约2.0×SSC的低严格性至在50℃下约0.2×SSC的高严格性。另外,洗涤步骤中的温度可从室温约22℃的低严格性条件增加至约65℃的高严格性条件。温度和盐都可变化,或者温度或盐浓度可保持恒定,而其它变量可改变。在一个优选的实施方案中,本发明的多核酸将与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10中阐述的一个或多个核酸分子或其互补序列或任一者的片段在中等严格条件下,例如在约2.0×SSC和约65℃下特异性杂交。在一个特别优选的实施方案中,本发明的核酸将与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10中阐述的一个或多个核酸分子或任一者的互补序列或片段在高严格性条件下特异性杂交。在本发明的一方面,本发明优选的标记核酸分子具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10中阐述的核酸序列或其互补序列或任一者的片段。探针与靶DNA分子的杂交可通过本领域技术人员已知的许多方法来检测,这些方法可包括但不限于荧光标签、放射性标签、基于抗体的标签和化学发光标签。

[0095] 关于使用特定扩增引物对扩增靶核酸序列(例如通过PCR),“严格条件”是允许引物对仅与具有对应野生型序列(或其互补序列)的引物将结合的靶核酸序列杂交并优选在DNA热扩增反应中产生独特扩增产物,即扩增子的条件。

[0096] 术语“特异于(靶序列)”表示探针或引物在严格杂交条件下仅与包含靶序列的样品中的靶序列杂交。

[0097] 如本文所用,“扩增的DNA”或“扩增子”是指针对作为多核酸模板的一部分的靶多核酸分子的多核酸扩增方法的产物。例如,为了确定由有性杂交产生的玉米植物是否含有来自包含本发明的事件MON95275的玉米植物的转基因植物基因组DNA,从玉米植物组织样品中提取的DNA可使用引物对进行多核酸扩增方法,所述引物对包括第一引物,其源自侧接事件MON95275的异源插入DNA的区域中的基因组DNA序列,并由聚合酶在插入DNA的方向上5′至3′延长。第二引物源自异源插入DNA分子,由聚合酶在第一引物所来源的侧接基因组DNA方向上5′至3′延长。扩增子的长度范围可为引物对的组合长度加上一个核苷酸碱基对,或加上约五十个核苷酸碱基对,或加上约二百五十个核苷酸碱基对,或加上约四百五十个核苷酸碱基对,或更多。或者,引物对可源自插入的异源DNA两侧上的基因组序列,以产生包括整个插入多核苷酸序列的扩增子(例如,从SEQ ID NO:10的5′端上的基因组部分分离的正向引物以及从SEQ ID NO:10的3′端上的基因组部分分离的反向引物,所述扩增子扩增事件MON95275基因组中的包含本文鉴定的插入DNA序列(SEQ ID NO:9)的DNA分子)。源自与插入的转基因DNA相邻的植物基因组序列的引物对的成员位于距插入的DNA序列一定距离处,此距离的范围可从一个核苷酸碱基对到多达约两万个核苷酸碱基对。术语“扩增子”的使用特别排除了可能在DNA热扩增反应中形成的引物二聚体。

[0098] 出于实际目的,应设计产生有限大小范围,例如在100至1000个碱基之间的扩增子的引物。较小(较短多核苷酸长度)大小的扩增子通常在热扩增反应中更可靠地产生,允许

更短的循环时间,并且可在琼脂糖凝胶上轻松分离和可视化或适用于终点TAQMAN®样分析。可通过DNA扩增子检测领域已知的方法产生和检测较小的扩增子。另外,可将使用引物对产生的扩增子克隆至载体中,进行繁殖、分离和测序,或者可直接使用本领域公认的方法进行测序。任何源自可用于DNA扩增方法以产生诊断MON95275或其后代的扩增子的SEQ ID NO:11与SEQ ID NO:9的组合或SEQ ID NO:12与SEQ ID NO:9的组合的引物对都是本发明的一个方面。可用于DNA扩增方法以产生诊断MON95275或其后代的扩增子的SEQ ID NO:11或其互补序列的至少15个连续核苷酸的任何单个分离的DNA多核苷酸引物分子都是本发明的一个方面。可用于DNA扩增方法以产生诊断包含MON95275或其后代的植物的扩增子的SEQ ID NO:12或其互补序列的至少15个连续核苷酸的任何单个分离的DNA多核苷酸引物分子都是本发明的一个方面。可用于DNA扩增方法以产生诊断MON95275或其后代的扩增子的SEQ ID NO:9或其互补序列的至少15个连续核苷酸的任何单个分离的DNA多核苷酸引物分子都是本发明的一个方面。

[0099] 多核酸扩增可通过本领域已知的各种多核酸扩增方法中的任一种,包括聚合酶链反应(PCR)来完成。扩增方法在本领域中是已知的并且尤其描述于美国专利第4,683,195号和第4,683,202号以及PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis等人编,Academic Press,San Diego,1990中。PCR扩增方法已被开发用于扩增至多22kb(千碱基)的基因组DNA和至多42kb的噬菌体DNA(Cheng等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5695-5699,1994)。这些方法以及DNA扩增领域已知的其它方法可用于本发明的实践。来自玉米事件MON95275的异源DNA插入物或侧接基因组DNA序列的序列可如下地验证(并在必要时进行校正):通过使用源自本文提供的序列的引物扩增来自含有事件MON95275 DNA的玉米种子或从含有事件MON95275DNA的玉米种子生长的玉米植物的此类DNA分子,所述玉米种子以登录号PTA-126049保藏于ATCC,接着对PCR扩增子或其克隆的DNA片段进行标准DNA测序。

[0100] 通过这些方法产生的诊断扩增子可通过多种技术检测。一种这样的方法是遗传位分析(Nikiforov等人.Nucleic Acid Res.22:4167-4175,1994),其中设计了一种DNA寡核苷酸,其与相邻的侧接基因组DNA序列和插入的DNA序列都重叠。寡核苷酸固定在微量滴定板的孔中。在感兴趣区域的PCR(使用插入序列中的一个引物和相邻的侧接基因组序列中的一个引物)之后,单链PCR产物可与固定的寡核苷酸杂交,并作为使用对预期的下一碱基特异的DNA聚合酶和标记的双脱氧核苷酸三磷酸(ddNTP)进行单碱基延伸反应的模板。读数可为萦光的或基于ELISA的。信号表明由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸而存在转基因/基因组序列。

[0101] 另一种方法是焦磷酸测序技术,如由Winge(Innov.Pharma.Tech.00:18-24,2000)所描述。在此方法中,设计了一种寡核苷酸,其与相邻的基因组DNA和插入DNA接头重叠。寡核苷酸与来自感兴趣区域的单链PCR产物(插入序列中的一个引物和侧接基因组序列中的一个引物)杂交,并在DNA聚合酶、ATP、硫酸化酶、萦光素酶、腺苷三磷酸双磷酸酶、5'磷酸硫酸腺苷和萦光素存在下培育。DNTP被单独添加,并且掺入会产生可测量的光信号。光信号表明由于成功的扩增、杂交和单碱基或多碱基延伸而存在转基因/基因组序列。

[0102] Chen等人(Genome Res.9:492-498,1999)描述的萦光偏振是一种可用于检测本发明的扩增子的方法。使用此方法,设计了一种寡核苷酸,其与基因组侧接和插入的DNA接头重叠。寡核苷酸与来自感兴趣区域的单链PCR产物(插入DNA中的一个引物和侧接基因组DNA

序列中的一个引物)杂交,并在DNA聚合酶和荧光标记的ddNTP存在下培育。单碱基延伸导致ddNTP的掺入。可使用荧光计将掺入测量为偏振的变化。偏振的变化表明由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸而存在转基因/基因组序列。

[0103] 实时聚合酶链反应(PCR)是在PCR发生时(即实时)监测其进程的能力。数据在整个PCR过程中收集,而不是在PCR结束时收集。在实时PCR中,反应的特征在于循环期间首次检测到靶标扩增时的时间点,而不是固定循环次数后累积的靶标量。在实时PCR分析中,阳性反应是通过荧光信号的积累来检测的。核酸靶标的起始拷贝数越高,越早观察到荧光显著增加。循环阈值(Ct值)定义为荧光信号跨越阈值(即超过背景水平)所需的循环数。Ct水平与样品中的靶核酸的量成反比(即,Ct值越低,样品中的靶核酸的量越大)。

[0104] Taqman® (PE Applied Biosystems,Foster City,CA)被描述为一种使用实时PCR检测和量化DNA序列的存在的方法,并且在制造商提供的说明书中得到充分理解。简而言之,设计了一种FRET寡核苷酸探针,其与基因组侧接和插入DNA接头重叠。FRET探针和PCR引物(插入DNA序列中的一种引物和侧接基因组序列中的一种引物)在热稳定聚合酶和dNTP存在下循环。FRET探针的杂交导致荧光部分从FRET探针上的猝灭部分裂解和释放。荧光信号表明由于成功的扩增和杂交而存在转基因/基因组序列。

[0105] 分子信标已被描述用于序列检测,如Tyangi等人.(Nature Biotech.14:303-308,1996)中所述。简而言之,设计了一种FRET寡核苷酸探针,其与侧接基因组和插入DNA接头重叠。FRET探针的独特结构使其含有二级结构,使荧光和猝灭部分保持紧密接近。FRET探针和PCR引物(插入DNA序列中的一种引物和侧接基因组序列中的一种引物)在热稳定聚合酶和dNTP存在下循环。在成功的PCR扩增之后,FRET探针与靶序列的杂交导致探针二级结构的去除以及荧光和猝灭部分的空间分离。产生荧光信号。荧光信号表明由于成功的扩增和杂交而存在侧接/转基因插入序列。

[0106] 基于DNA扩增方法的DNA检测试剂盒含有与靶DNA特异性杂交并在适当反应条件下扩增诊断扩增子的DNA引物分子。试剂盒可提供基于琼脂糖凝胶的检测方法或本领域已知的检测诊断扩增子的任何数量的方法。DNA检测试剂盒可使用本文公开的组合物开发,并且可用于鉴定样品中的玉米事件MON95275 DNA,并且可应用于培育含有事件MON95275 DNA的玉米植物的方法。含有与SEQ ID NO:10中所示的玉米基因组区域的任何部分以及SEQ ID NO:10中所示的插入的转基因DNA的任何部分同源或互补的DNA引物的试剂盒是本发明的一个目标。DNA分子可用于DNA扩增方法(PCR)或作为多核酸杂交方法,即南方分析、北方分析中的探针。

[0107] 尽管可通过常规方法设计保留优先与靶序列杂交的能力的与靶序列不同的引物和探针,但是根据本发明的探针和引物可与靶序列具有完全的序列同一性。为了使核酸分子用作引物或探针,仅需核酸分子在序列上充分互补以在所用的特定溶剂和盐浓度下能够形成稳定的双链结构即可。任何常规的核酸杂交或扩增方法都可用于鉴定样品中来自玉米事件MON95275的转基因DNA的存在。探针和引物的长度一般为至少约11个核苷酸、至少约18个核苷酸、至少约24个核苷酸或至少约30个核苷酸或更长。此类探针和引物在严格的杂交条件下与靶DNA序列特异性杂交。Sambrook等人,1989和Hames等人,Nucleic Acid Hybridization,A Practical Approach,IRL Press,Washington,DC(1985)描述了常规严格性条件。

[0108] 本领域技术人员熟知的许多方法可用于分离和操纵本发明中公开的DNA分子或其片段，包括热扩增方法。还可通过其它技术来获得DNA分子或其片段，例如通过用化学手段直接合成片段，如通常通过使用自动寡核苷酸合成仪所实施。

[0109] 因此，本文提供的DNA分子和对应核苷酸序列尤其可用于鉴定玉米事件MON95275，检测样品中是否存在源自转基因玉米事件MON95275的DNA，以及监测样品存在和/或不存在玉米事件MON95275或源自包含事件MON95275的玉米植物的植物部分。

[0110] 提及玉米意指玉米植物、玉米植物细胞、玉米种子、玉米植物部分、玉米后代植物和玉米商品产品在本发明的范围内，只要每个实施方案含有可检测量的DNA，所述DNA对应于本文描述为可诊断是否存在玉米事件MON95275的任何一个、两个或更多个区段(例如具有至少一个提供为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的序列的多核苷酸)。本发明的玉米植物、植物细胞、种子、植物部分和后代植物也可含有一种或多种额外转基因。此类额外转基因可为编码赋予所需性状的蛋白质或RNA分子的任何核苷酸序列，所述所需性状包括但不限于增加的抗虫性、增加的水利用效率、增加的产量性能、增加的抗旱性、增加的种子质量和/或增加的除草剂耐受性。

[0111] 本发明提供源自含有MON95275 DNA的转基因玉米植物的玉米植物、玉米植物细胞、玉米种子、玉米植物部分(例如花粉、胚珠、丝、穗、花药、穗轴、根组织、茎组织、叶组织以及种子)、玉米后代植物。含有事件MON95275 DNA的玉米种子的代表性样品已根据布达佩斯条约保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC®)。ATCC储存库已将专利保藏名称PTA-126049分配给含有事件MON95275 DNA的种子。

[0112] 本发明提供了包含DNA分子的微生物，所述DNA分子具有存在于其基因组中的选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的至少一个序列。微生物意图包括任何微观细胞，无论是原核细胞或真核细胞或其它在基因组或染色体或更通常称为质粒或载体的染色体外DNA结构内含有DNA的细胞。微观生物包括细菌(原核生物)和对应于高级生命形式(真核生物)的细胞，它们低于普通人类的视觉范围。此类微生物的一个实例是转基因植物细胞。

[0113] 微生物，例如本发明的植物细胞可用于许多工业应用，包括但不限于：(i)用作科学探究或工业研究的研究工具；(ii)在培养中用于产生可用于后续科学研究或作为工业产品的内源性或重组碳水化合物、脂质、核酸或蛋白质产品或小分子；(iii)与现代植物组织培养技术一起用于产生转基因植物或植物组织培养物，其接着可用于农业研究或生产。例如转基因植物细胞等微生物的产生和使用利用现代微生物技术和人为干预来产生人造的、独特的微生物。在此过程中，将重组DNA插入植物细胞的基因组中，以产生与天然存在的植物细胞分离且独特的转基因植物细胞。接着可使用现代微生物学技术与细菌和酵母细胞很类似地培养此转基因植物细胞，且可以未分化的单细胞状态存在。转基因植物细胞的新遗传组成和表型是通过将异源DNA整合至细胞基因组中而产生的技术效果。本发明的另一方面是一种使用本发明的微生物的方法。使用本发明的微生物如转基因植物细胞的方法包括(i)通过将重组DNA整合至细胞基因组中且接着使用此细胞得到具有相同异源DNA的其它细胞来产生转基因细胞的方法；(ii)使用现代微生物学技术培养含有重组DNA的细胞的方法；

(iii)从培养细胞中产生和纯化内源性或重组碳水化合物、脂质、核酸或蛋白质产物的方法;以及(iv)使用现代植物组织培养技术与转基因植物细胞产生转基因植物或转基因植物组织培养物的方法。

[0114] 本发明的植物可将事件MON95275 DNA,包括插入玉米事件MON95275中的转基因传递给后代。如本文所用,“后代”包括任何以下植物、植物细胞、种子和/或可再生植物部分:含有源自祖先植物的事件MON95275 DNA和/或包含具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的至少一个序列的DNA分子。植物、后代和种子就事件MON95275的转基因来说可为纯合的或杂合的。后代可从由含有玉米事件MON95275的植物产生的种子和/或从用来自含有玉米事件MON95275的植物的花粉受精的植物产生的种子生长。

[0115] 后代植物可自花授粉(也称为“自交”)以产生真正的植物育种系,即就转基因来说是纯合的植物。适当后代的自交可产生就两种添加的外源基因来说都是纯合的植物。

[0116] 或者,后代植物可异交,例如与另一种不相关的植物杂交,以产生品种或杂种种子或植物。其它不相关的植物可为转基因的或非转基因的。因此,本发明的品种或杂种种子或植物可通过将缺乏玉米事件MON95275的特异和独特DNA的第一亲本与包含玉米事件MON95275的第二亲本有性杂交,从而产生包含玉米事件MON95275的特异和独特DNA的杂种而获得。每个亲本都可以是杂种或自交系/品种,只要杂交或育种产生本发明的植物或种子,即具有至少一个等位基因的种子,所述等位基因含有玉米事件MON95275的DNA和/或具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的至少一个序列的DNA分子。因此,两种不同的转基因植物可杂交以产生含有两个独立分离、添加的外源基因的杂交后代。例如,含有赋予玉米昆虫抗性的Cry75Aa1、Vip4Da2和DvSnf7特异性dsRNA的MON95275可与其它转基因玉米植物杂交以产生具有两种转基因亲本的特征的植物。这方面的一个实例是含有Cry75Aa1、Vip4Da2和DvSnf7特异性dsRNA介导的基因抑制,赋予玉米鞘翅目抗性的MON95275与具有一种或多种额外性状(例如除草剂耐受性、昆虫耐受性或干旱耐受性)的植物的杂交,从而产生对鞘翅目害虫具有抗性并具有至少一种或多种额外性状的后代植物或种子。还涵盖与亲本植物的回交以及与非转基因植物的异交,以及无性繁殖。常用于不同性状和作物的其它育种方法的描述可在一些参考文献中找到,例如,Fehr,Breeding Methods for Cultivar Development,Wilcox J.编,American Society of Agronomy,Madison WI (1987)。

[0117] 本发明的植物、后代、种子、细胞和植物部分还可含有一种或多种额外玉米性状或转基因事件,特别是通过使含有玉米事件MON95275的玉米植物与另一种含有所述额外性状或转基因事件的植物杂交而引入的那些。此类性状或转基因事件包括但不限于增加的抗虫性、除草剂耐性、增加的用水效率、增加的产量表现、增加的抗旱性、增加的种子质量、改善的营养质量、杂交种子产生或疾病或真菌抗性。玉米转基因事件是本领域技术人员已知的。例如,美国农业部(USDA)动植物卫生检验局(APHIS)提供了此类性状的列表,并且可在万维网上的网站aphis.usda.gov上找到。因此,可通过使各自包含一个或多个转基因事件的两个亲本植物杂交,收集后代种子并选择含有两个或更多个转基因事件的后代种子或植物来在后代种子或植物中组合两个或更多个转基因事件。可重复这些步骤,直至在后代中实现

所需的转基因事件组合。还涵盖与亲本植物的回交以及与非转基因植物的异交，以及无性繁殖。

[0118] 还提供了源自包含事件MON95275的玉米植物的植物部分。如本文所用，“植物部分”是指由源自包含事件MON95275的玉米植物的材料构成的植物的任何部分。植物部分包括但不限于种子、花粉、胚珠、丝、穗、花药、穗轴、根组织、茎组织和叶组织。植物部分可为有活力的、无活力的、可再生的和/或不可再生的。

[0119] 还提供了源自包含事件MON95275的玉米植物并且含有可检测量的对事件MON95275特异的核酸的商品产品。如本文所用，“商品产品”是指由源自含有玉米事件MON95275 DNA的玉米植物、完整或加工过的玉米种子、或一种或多种植物细胞和/或植物部分的材料构成的任何组合物或产品。无活力的商品产品包括但不限于无活力的种子、完整或加工过的种子、种子部分和植物部分；动物饲料，包含玉米、玉米油、玉米面、玉米粉、玉米片、玉米糠、用玉米制成的面食、玉米生物质以及使用玉米和玉米部分生产的燃料产品。有活力的商品产品包括但不限于种子、植物和植物细胞。包含事件MON95275的玉米植物因此可用于制造典型地从玉米获得的任何商品产品。源自包含事件MON95275的玉米植物的任何此类商品产品可含有至少可检测量的对应于玉米事件MON95275的特异和独特DNA，并且具体地可含有可检测量的包含DNA分子的多核苷酸，所述DNA分子具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的至少一个序列。可使用任何标准的核苷酸分子检测方法，包括本文公开的检测方法。如果在商品产品中存在任何可检测量的具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的至少一个序列的DNA分子，则商品产品属于本发明的范围。

[0120] 本发明的玉米植物、玉米植物细胞、玉米种子、玉米植物部分(例如花粉、胚珠、丝、穗、花药、穗轴、根组织、茎组织、叶组织)、玉米后代植物和商品产品因此尤其可用于种植植物以生产用于农业目的的包含玉米事件MON95275的种子和/或植物部分，生产用于植物育种和研究目的的包含玉米事件MON95275的后代，用于工业和研究应用的微生物技术，以及销售给消费者。

[0121] 提供了生产包含对本发明的事件MON95275特异和独特的DNA序列的抗虫玉米植物的方法。这些方法中使用的转基因植物就转基因来说可为纯合的或杂合的。通过这些方法产生的后代植物可为品种或杂交植物；可从由含有玉米事件MON95275的植物产生的种子和/或从用来自含有玉米事件MON95275的植物的花粉受精的植物产生的种子生长；并且就转基因来说可为纯合的或杂合的。后代植物可随后自花授粉以产生真正的植物育种系，即就转基因来说是纯合的植物，或者可异交，例如与另一种不相关的植物育种，以产生品种或杂种种子或植物。

[0122] 提供了检测样品中是否存在源自包含玉米事件MON95275的玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物的DNA的方法。一种方法包括(i)从至少一种玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品；(ii)使DNA样品与至少一种能够在适合DNA测序的条件下产生对事件MON95275 DNA特异的DNA序列的引物接触；(iii)进行DNA测序反应；且接着(iv)确认核苷酸序列在其中包含的构建体中包含对事件MON95275特异的核苷酸序列，例如选自

由以下组成的组中的一者:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。另一种方法包括(i)从至少一个玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品;(ii)将DNA样品与能够在适合DNA扩增的条件下从事件MON95275 DNA产生扩增子的引物对接触;(iii)进行DNA扩增反应;且接着(iv)检测扩增子分子和/或确认扩增子的核苷酸序列包含对事件MON95275特异的核苷酸序列,例如选自由以下组成的组中的一者:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。扩增子应该是对事件MON95275特异的扩增子,例如包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的扩增子。在扩增子中检测对事件MON95275特异的核苷酸序列可确定和/或诊断样品中是否存在玉米事件MON95275特异性DNA。能够在适合DNA扩增的条件下从事件MON95275 DNA产生扩增子的引物对的实例提供为SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。其它引物对可由本领域技术人员容易地设计并且将产生包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的扩增子,其中此类引物对包含至少一个侧接插入物的基因组区域内的引物和在插入物内的第二引物。检测样品中是否存在源自包含玉米事件MON95275的玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物的DNA的另一种方法由以下组成:(i)从至少一个玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品;(ii)使DNA样品与对事件MON95275 DNA特异的DNA探针接触;(iii)允许探针和DNA样品在严格杂交条件下杂交;且接着(iv)检测探针与靶DNA样品之间的杂交。对事件MON95275具有特异性的DNA探针序列的实例提供为SEQ ID NO:17。其它探针可由本领域技术人员容易地设计,并且将包含侧接插入物的基因组DNA的至少一个片段和插入DNA的至少一个片段,例如在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10中提供的序列。检测与DNA样品的探针杂交可诊断样品中是否存在玉米事件MON95275特异性DNA。不存在杂交可替代地诊断样品中不存在玉米事件MON95275特异性DNA。

[0123] 提供了DNA检测试剂盒,其可用于鉴定样品中的玉米事件MON95275 DNA,并且也可应用于培育含有适当事件DNA的玉米植物的方法。此类试剂盒含有包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的片段的DNA引物和/或探针。此类试剂盒的一个实例包含长度足以充当DNA探针的SEQ ID NO:10的连续核苷酸的至少一个DNA分子,所述DNA探针可用于检测样品中存在和/或不存在源自包含事件MON95275的转基因玉米植物的DNA。源自包含事件MON95275的转基因玉米植物的DNA将包含具有选自以下的至少一个序列的DNA分子:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。提供了足以用作DNA探针的DNA分子,所述分子可用于确定、检测或诊断样品中存在和/或不存在玉米事件MON95275 DNA,提供为SEQ ID NO:17。其它探针可由本领域技术人员容易地设计并且应包含SEQ ID NO:10的至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、或至少40个连续核苷酸,并且对于玉米事件MON95275 DNA足够独特,以便鉴定源自所述事件

的DNA。

[0124] 另一种类型的试剂盒包含可用于产生可用于检测样品中存在和/或不存在源自转基因玉米事件MON95275的DNA的扩增子的引物对。这种试剂盒将采用一种方法，所述方法包括使靶DNA样品与本文所述的引物对接触，接着进行足以产生包含DNA分子的扩增子的核酸扩增反应，所述DNA分子具有选自以下的至少一个序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10，且接着检测存在和/或不存在扩增子。这种方法还可包括对扩增子或其片段进行测序，这将确定，即诊断靶DNA样品中玉米事件MON95275特异性DNA的存在。其它引物对可由本领域技术人员容易地设计并且应包含至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个提供于但不限于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中的连续核苷酸，并且对于玉米事件MON95275 DNA足够独特，以便鉴定源自所述事件的DNA。

[0125] 本发明的试剂盒和检测方法尤其可用于鉴定玉米事件MON95275、选择包含玉米事件MON95275的植物品种或杂种、检测样品中是否存在源自包含事件MON95275的转基因玉米植物的DNA，以及监测样品存在和/或不存在包含事件MON95275的玉米植物，或源自包含事件MON95275的玉米植物的植物部分。

[0126] 来自玉米事件MON95275的异源DNA插入物、接头序列或侧接序列的序列可通过使用源自本文提供的序列的引物从事件中扩增此类序列，接着对扩增子或克隆的DNA进行标准DNA测序来验证(并在必要时进行校正)。

[0127] 提供了检测样品中源自包含玉米事件MON95275的玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物的DNA的转基因等位基因的接合性的方法。一种方法包括(i)从至少一个玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品；(ii)使DNA样品与能够产生可诊断事件MON95275的第一扩增子的引物对接触；(iii)使DNA样品与能够产生可诊断不包含事件MON95275的天然玉米基因组DNA的第二扩增子的引物对接触；(iv)进行DNA扩增反应；且接着(v)检测扩增子，其中仅存在第一扩增子可诊断样品中的纯合事件MON95275 DNA，并且存在第一扩增子和第二扩增子两者可诊断就事件MON95275等位基因来说是杂合的玉米植物。一组示例性引物对呈现为SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16，其产生可诊断事件MON95275的扩增子；以及SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22，其产生可诊断不包含事件MON95275的野生型玉米基因组DNA的扩增子。也可将一组探针并入此类扩增方法中，以使用上述引物对组呈实时PCR形式使用。一组示例性探针呈现为SEQ ID NO:17(诊断事件MON95275的扩增子)和SEQ ID NO:23(诊断不包含事件MON95275的野生型玉米基因组DNA的扩增子)。

[0128] 确定接合性的另一种方法包括(i)从至少一个玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品；(ii)使DNA样品与探针组接触，所述探针组含有至少与事件MON95275 DNA特异性杂交的第一探针和与因插入事件MON95275的异源DNA而被破坏的玉米基因组DNA特异性杂交并且不与事件MON95275 DNA杂交的第二探针；(iii)在严格杂交条件下将探针组与样品杂交，其中在杂交条件下仅检测到第一探针的杂交可诊断样品中事件MON95275 DNA的纯合等位基因；并且其中在杂交条件下检测到第一探针和第二探针两者的杂交可诊断DNA样品中事件MON95275的杂合等位基因。

[0129] 确定接合性的另一种方法包括(i)从至少一个玉米细胞、玉米组织、玉米种子或玉米植物中提取DNA样品;(ii)使DNA样品与能够产生可诊断事件MON95275的等位基因的扩增子的引物对接触;(iii)使DNA样品与能够产生玉米植物中已知为单拷贝且纯合的内标的扩增子的引物对接触;(iv)使DNA样品与探针组接触,所述探针组至少含有与事件MON95275的等位基因特异性杂交的第一探针,且至少含有与玉米植物中已知为单拷贝且纯合的内标基因组DNA特异性杂交的第二探针;(v)使用实时PCR进行DNA扩增反应,并确定对应于毒素编码序列和单拷贝纯合内标的扩增子的循环阈值(Ct值);(vi)计算单拷贝纯合内标扩增子的Ct值与毒素编码序列扩增子的Ct值之差(ΔCt);以及(vii)确定接合性,其中约零(0)的ΔCt表示插入T-DNA的纯合性,且约一(1)的ΔCt表示插入T-DNA的杂合性。杂合和纯合事件由大约一(1)的ΔCt值单位来区分。考虑到由于例如扩增效率和理想退火温度等多种因素导致实时PCR中观察到的正常变异性,“约一(1)”的范围定义为0.75至1.25的ΔCt。上述用于确定接合性的方法的引物对和探针可扩增和检测来自事件MON95275的等位基因和内标的扩增子。用于检测对应于事件MON95275的等位基因和内标的扩增子的示例性引物对呈现为SEQ ID NO:15与SEQ ID NO:16的组合(事件MON95275的等位基因)以及SEQ ID NO:18与SEQ ID NO:19的组合(内标)。随附的示例性探针呈现为SEQ ID NO:17(事件MON95275的等位基因)和SEQ ID NO:20(内标)。

[0130] 保藏信息

[0131] 根据与美国典型培养物保藏中心(ATCC)(地址为10801 University Boulevard,Manassas,Virginia USA,邮政编码20110)的布达佩斯条约,已在2019年8月21日保藏了含有事件MON95275的玉米种子的代表性样品。所述保藏物被接受并被分配了ATCC登录号PTA-126049。在申请未决期间,专利和商标局局长以及由局长确定有权享有所述保藏物的个人将可根据请求获得所述保藏物。专利发布后,对公众可用性的所有限制将不可撤销地取消。保藏物将在保藏处保存三十(30)年,或在最后一次请求后保存五(5)年,或在专利的有效期内,以较长者为准,并将在此期间根据需要更换。

[0132] 实施例

[0133] 包括以下实施例以更全面地描述本发明,所述实施例源自163个构建体的构建和测试、约2,300个事件的产生以及在6年内通过产生和选择玉米事件MON95275所需的严格分子、农艺和田间测试对数十万株个别植物的分析。

[0134] 根据本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可在已公开并仍获得类似或相似结果的特定实施方案中作出许多改变。

[0135] 实施例1

[0136] 表达盒测试、构建体设计、植物测试和构建体选择

[0137] 通常有必要产生和筛选大量基因表达构建体和转化事件,以鉴定构建体,且接着是一个事件,其表明引入的感兴趣的基因的最佳表达,同时也不产生农艺或表型异型。

[0138] 由于这些原因,转基因玉米植物的开发需要广泛的研究、开发和分析,所述转基因玉米植物产生对鞘翅目昆虫有效的杀虫蛋白,而不会对农艺学、产量或堆栈可行性产生任何负面影响。具体而言,在6年期间,开发、测试和分析了源自163种不同质粒载体构建体的超过4,531个概念验证和商业转基因事件。

[0139] 此实施例描述了163种不同构建体在玉米植物中的设计和测试,以鉴定用于事件

产生的优选构建体。每个构建体在杀虫蛋白和转录调控元件的编码序列方面有所不同，并且对这些进行了测试以选择优选构建体用于在植物中表达杀虫蛋白。每个构建体都有独特的配置，因表达盒组成(杀虫蛋白、dsRNA和表达元件)、方向以及蛋白质是否被靶向插入叶绿体而异。

[0140] 在最初的概念验证和开发阶段，160个包含26个不同启动子、14个不同增强子、14个不同内含子、16个不同昆虫毒素编码序列、16个不同dsRNA编码序列和14个不同3′UTR的不同组合的构建体用于生成超过2,000个转换事件。在对转基因的存在进行初步分子表征后，选择了1,875个单一转化的玉米事件进行进一步表征和功效测试。对这些事件的表型或农艺异型、昆虫毒素蛋白的表达水平以及对所选鞘翅目害虫物种的功效进行了评估。所得功效和蛋白质表达数据，以及有关表型和农艺异型的任何信息用于消除无效的蛋白质、表达元件和组合，并用于设计在下一阶段的开发中使用的较少数量的二元商业转化质粒构建体。MON95275开发中的此概念验证测试阶段在图3中所呈现的时间表中被确定为“POC转化和分析”。

[0141] 在下一阶段的开发中，产生了3个新构建体。这些构建体包含1至2个昆虫毒素转基因表达盒和1个不同方向(收敛或发散)的dsRNA表达盒的组合。这3个构建体用于生成转化事件(也称为“转化体”)。在培养中形成芽后，基于视觉特征和早期分子分析选择转化事件的子集。初始转化后，将2,531个转化体转移至土壤中。1,496个事件在初始分子表征后被丢弃。基于对植物健康状况的观察，在剩余的1,035个事件中，有427个被消除。将剩余的608个事件移植至盆中并在温室(GH)中生长以进行进一步分析。每个事件的叶子样品用于使用QuantiGene®分析来测量DvSnf7特异性dsRNA的表达，并表示为飞克DvSnf7 RNA/总微克RNA(fg DvSnf7/μg RNA)。1,000-3,000fg DvSnf7 dsRNA/μg RNA的表达范围用于选择事件以进行进一步研究。剩余的608个事件中，发现有425个事件表达DvSnf7 dsRNA，表达范围为1,000-3,000fg DvSnf7 dsRNA/μg核糖核酸。剩余的425个事件中的19个因昆虫毒素蛋白缺乏表达而被消除，使得总共406个事件用于进一步分析和表征。R_0事件被允许自花授粉并产生R_1种子。基于对植物健康状况和种子返回的观察，152个事件被丢弃，总共剩下254个事件供进一步研究。在进一步的分子表征之后，102个事件被丢弃，总共为R_1苗圃留下了152个事件，用于功效研究、额外分子表征、表达研究以及种子返回和分离分析。事件MON95275开发中的此商业转化和R_0筛选阶段被确定为图3中呈现的时间表上的“Comm.TFN R_0筛选”。

[0142] 由于玉米根虫植物分析是破坏性分析，需要将植物从盆中移出以评估整体根损害，R_0植物用于产生R_1种子，以便有足够的种子来继续每个所选事件的世代以进行进一步的功效和农艺评估，以及进一步的分子表征。分析了源自R_1种子的植物对西方玉米根虫(玉米根萤叶甲，WCR)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲，NCR)的功效。基于功效研究、额外的分子表征、表达研究以及种子返回和分离分析，来自3个构建体的57个事件被推进以供进一步分析。此R_1阶段功效/分子筛选在图3中被确定为“GH/Mol.筛选”。R_1阶段功效/分子筛选之后，基于有关构建体配置和毒素表达盒的决定，丢弃源自一个构建体(表2中的构建体-2)的事件。

[0143] 表2显示了对应于每个构建体的上述每个选择步骤的每个构建体的剩余事件数。质粒构建体pM95275是用于产生玉米事件MON95275的转化的构建体。

[0144] 表2.选择用于继续研究的每个构建体的事件。

[0145]

构建体	土壤事件	初始分子质量合格	R_0移植GH	DvSnf7 dsRNA Exp.	GOI	种子返回/植物健康状况	R_0分子后	R1 GH/Mol.筛选
构建体-1	1126	539	306	172	168	99	54	18
构建体-2	771	262	162	116	108	77	42	20
构建体pM95275	634	234	140	137	130	78	56	19
总计	2531	1035	608	425	406	254	152	57

[0146] 基于功效、表型观察和分子研究(例如插入位点整合),2017年美国田间功效试验将构建体-1和构建体pM95275的事件总数减少到14个。

[0147] 基于有关杀虫蛋白表达的决定,丢弃了源自表2中的构建体-1的事件。

[0148] 因此,各种构建体的多轮测试和比较揭示了使用作为SEQ ID NO:13,构建体pM95275提供的转基因盒产生的事件提供了对鞘翅目害虫物种西方玉米根虫(玉米根萤叶甲,WCR)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲,NCR)的优选功效,以及优选的分子表征和农艺性能。

[0149] 实施例2

[0150] 田间试验、分子测试和事件选择

[0151] 此实施例描述了在数年内在多个地点使用构建体pM95275产生的事件的田间试验中的分子表征、分析和测试,导致选择了最终事件MON95275。

[0152] 表3说明了用于选择事件MON95275的过程。在商业转化R_0筛选中,获得一百四十(140)个来自构建体pM95275的R_0转化事件并选择用于生长。量化DvSnf7表达后,丢弃不符合1,000-3,000fg DvSnf7 dsRNA/μg RNA表达范围标准的3个事件,总共留下137个事件用于进一步分析。对剩余的137个事件进行了Cry75Aa1和Vip4Da2毒素的表达分析,并基于所述分析丢弃了7个事件,总共留下130个事件用于R_0筛选。在R_0筛选后,由于种子返回或植物健康状况不佳而丢弃了52个事件,总共留下78个事件用于进一步的分子表征。在分子表征之后有56个剩余事件。

[0153] 剩余的56个事件被发送到R_1苗圃进行进一步测试。在R_1苗圃中,由于种子返回和分离分析不佳,另外8个事件被丢弃,并且21个事件由于对蛋白质表达和分子表征的担忧而被丢弃,留下19个事件。

[0154] 剩余的19个事件进入R2/F1 Cre杂交阶段,其中通过育种去除CP4标记盒。在R2/F1 Cre杂交阶段期间,12个事件被丢弃,7个由于额外的分子表征并且5个基于对农艺性能和其它分子研究的担忧。

[0155] 剩余的7个事件继续进行2017年美国田间试验。田间试验结束后,剩余的7个事件中的3个被丢弃,其中1个是由于在田间观察到的表型异常,并且2个在功效和农艺学方面的表现不如其它事件,留下4个事件用于2018年美国田间试验。在2018年美国田间试验期间,由于DvSnf7 dsRNA表达盒的转录模式不正确而丢弃了1个事件,并且由于农艺性能而丢弃

了1个事件，留下2个事件，即事件1和事件MON95275。在对美国和阿根廷多个田间试验事件的农艺学进行进一步分析后，事件MON95275被选为商业化事件，因为当比较每个事件的分子表征、蛋白质和DvSnf7 dsRNA表达、功效和农艺学的所有特征时，它的dsRNA排名高于事件1。

[0156] 表3.MON95275事件选择。

[0157]

			剩余事件
阶段	**分析**	**已去除事件**	140
Comm. TFN R_0 筛选	表达-RNAi	3	56
	表达-GOI	7	
	种子返回/植物健康状况	52	
	分子	22	
R_1 GH/Mol. 筛选	苗圃返回/分离	8	19
	功效	0	
	表达+分子	21	
R2/F1 Cre 杂交	功效	0	7
	GSS 前的分子	7	
	表达	0	
	农艺学+分子	5	
2017 年美国田间	农艺学	0	4
	表型	1	
	功效	0	
	GSS 表现较差	2	
2018 年美国田间	DvSnf7 dsRNA 转录问题	1	2
	农艺学	1	
2018-2019 年阿根廷田间	农艺学	0	2
	GSS	0	
	剩余事件	0	

[0158]

商业	多个田间试验的分子表征、蛋白质和DvSnf7 dsRNA表达、功效和农艺学的进一步分析	1	MON95275

[0159] 实施例3

[0160] 玉米事件MON95275中草甘膦选择盒的Cre切除

[0161] 此实施例描述了通过体内Cre切除从玉米事件MON95275中去除草甘膦选择盒。草甘膦选择盒用于选择转化事件。通过去除选择盒，产生了“无标记”事件，其中只有杀虫蛋白表达盒保留在最终事件中。

[0162] 玉米品种LH244未成熟胚使用农杆菌介导的转化过程用构建体pM95275(呈现为SEQ ID NO:13并如图2中所示)进行转化。构建体pM95275含有4个表达盒:2个用于表达杀虫蛋白Cry75Aa1和Vip4Da2的表达盒，1个用于表达DvSnf7 dsRNA的表达盒，以及单个用于使用草甘膦选择转化植物细胞的盒。选择盒的两侧均带有Cre重组酶LoxP识别序列。

[0163] 转化后，R_0转化体自花授粉2代，在此期间，许多事件基于各种分析，例如功效、DvSnf7表达、蛋白质表达、种子返回和植物健康状况以及分子表征而被去除。到R_2代，从最初的140个事件中剩余19个事件。19个纯合R_2代事件与用源自肠杆菌噬菌体P1的表达Cre重组酶的转化玉米植物的优良品系育种。

[0164] R_2代事件与表达Cre重组酶的植物育种的此阶段在图3中呈现的时间表中被确定为“Cre杂交”。具体来说，在此阶段，就SEQ ID NO:13来说是纯合的去雄(雌性)R_2代植物与就用于表达Cre重组酶的转基因盒来说是纯合的转基因玉米植物(雄性)异花授粉。表达Cre重组酶的雄性供体花粉在落在包含SEQ ID NO:13的雌性植物的丝组织上后发芽。一旦花粉管进入胚囊，花粉管就会破裂，释放出表达Cre重组酶的雄性供体的两个精子。一个精子的核与卵核融合，形成合子。另一个精子核与两个极核中的一个融合，后者又与另一个极核融合，从而形成初级胚乳核。

[0165] 因此，在使用表达Cre重组酶的植物作为雄性花粉供体时，所得杂交的胚胎和胚乳都将在细胞分裂和发育并成为玉米粒(即种子)时表达Cre重组酶。Cre重组酶与LoxP位点中的反向重复序列结合并催化侧接表达盒的两个LoxP位点的八个碱基对的间隔区的交叉，导致标记盒被切除，并且一个LoxP位点由于重组而保留在整合T-DNA中(参见图2，“Cre切除后的插入T-DNA”)。

[0166] 由Cre杂交产生的F_1后代因缺少CP4选择盒而被选择并允许自花授粉。F_1后代被允许自花授粉的此阶段在图3中所呈现的时间表上被确定为“F_1自花授粉”。通过此过程，两个等位基因(Cre重组酶等位基因和用于产生事件MON95275的T-DNA等位基因)在所得F_2群体中分离，产生就一个或两个等位基因来说是纯合或杂合的后代。

[0167] 选择了被证明不存在Cre重组酶等位基因和SEQ ID NO:9的纯合性、Cre切除后的转基因插入T-DNA的F_2后代。这些所选F_2后代是自花授粉的，产生就SEQ ID NO:9来说是纯合的F_3代。F_2后代被允许自花授粉的此阶段在图3所呈现的时间表上被确定为“F_2自花授粉”。

[0168] 进一步的自花授粉产生了F_3后代种子(F_4种子)，其被分析纯度并被指定为“黄金标

准种子”。F_4是第一代黄金标准种子。黄金标准种子是经过纯度分析以确保不存在除MON95275之外的事件的种子。F_3后代被允许自花授粉的此阶段在图3所示的时间表中被确定为“F_3自花授粉”。

[0169] 草甘膦选择标记盒的切除不影响Cry75Aa1、Vip4Da2和DvSnf7dsRNA的表达。通过Cre切除从玉米事件MON95275中去除草甘膦选择盒提供了对鞘翅目害虫具有抗性而不在最终事件中增加对草甘膦的耐受性的转基因玉米事件。这种“无标记”事件确保了在与其它玉米转基因事件建立玉米育种堆栈时的灵活性，以提供包含事件MON95275的多种产品，并允许在最终的商业育种堆栈中提供额外性状的多种选择。

[0170] 实施例4

[0171] 玉米事件MON95275展现对鞘翅目害虫西方玉米根虫和北方玉米根虫的抗性

[0172] 此实施例描述了玉米事件MON95275对鞘翅目害虫的活性。昆虫毒素蛋白Cry75Aa1和Vip4Da2以及DvSnf7 dsRNA在玉米事件MON95275中一起表达时提供对西方玉米根虫(玉米根萤叶甲，WCR)和北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲，NCR)的抗性。

[0173] MON95275在温室和田间展现对西方玉米根虫的抗性。

[0174] 在构建体pM95275的转化和插入之后，将R_0阶段事件转移至温室并使其自花授粉并产生种子。将所选R_1种子种植在盆中并在温室中生长。将西玉米根虫(WCR)的卵培育约10天，以便在接种后4天内孵化。对每个事件的6株植物进行了分析。植物在大约V2至V3阶段接种。每个盆中接种了约2,000个卵。植物在侵染后生长大约28天。接着将植物从盆中取出，并仔细清洗根部以除去所有土壤。使用0-3的损害评级量表评估每株植物的根损害，如表4中所示。对与转化体相同品种的阴性野生型对照进行比较。0-0.75的根损害评级(RDR)代表良好功效，0.76-1.5的RDR代表中等功效，且1.6-3.0的RDR代表低或差的功效。

[0175] 表4.R_1根损害评级评分。

[0176]

根损害评级(RDR)	描述

[0177]

根损害评级(RDR)	描述
0	没有明显的取食
0.01-0.09	取食斑和取食迹
0.1-0.9	根部修剪，但小于一个完整节
1.0-1.9	至少一个完整节(或等效物)被破坏到距植物 1.5英寸以内
2.0-2.9	两个或更多个节消失
3	三个或更多个节消失

[0178] 从表5中可以看出，与阴性对照相比，玉米事件MON95275表现出显著的功效。

[0179] 表5.玉米事件MON95275的平均R_1根损害(RDR)。

[0180]

事件	植物数量	平均RDR	标准偏差
野生型	6	2.33	0.23
MON95275	6	0.05	0.00

[0181] 在美国进行了田间效力试验以评估玉米事件MON95275对WCR的抗性。在已知有WCR侵染的8个不同地点进行了田间试验;Colesburg,IA、Fairbank,IA、Independence,IA、Leigh,NE、Pilger,NE、Roanoke,IL、Rowan,IA和Shelby,NE。通过将自交玉米事件MON95275(LH244)与玉米品种93IDI3杂交产生的杂交植物在WCR侵染的田间生长。在此田间试验中，玉米事件MON95275仍包含CP4标记盒。另外，还培养了两个阴性对照;(1)具有鳞翅目抗性的玉米杂种MON89034(93IDI3)x LH244，和(2)非转基因玉米杂种93IDI3 x LH244。

[0182] 每个地点的试验均采用随机完整区组设计。所述地块由rep函数进行区组设计，并且在所述区组内，地块位置是随机的。MON95275和对照在每个区组中都表示一次。区组尺寸，例如每行的列数(按深度范围数)因位置而异，具体取决于田地的大小和形状。每个条目均匀分布在整个田间，以补偿可能出现的WCR压力的任何差异。MON95275和对照在VT阶段左右各挖出大约10株植物。仔细清洗根部，并将0.1-3.00的根损害评级(RDR)分配给每株植物，并呈现于表6中。

[0183] 表6.田间根损害评级(RDR)量表。

[0184]

经济损失	根损害评级(RDR)	描述
非经济损失	0.01	没有明显的取食斑。
	0.05	可见的取食斑和/或取食迹。
	0.08	严重的取食斑。
	0.10	将单个节上10%的根修剪到距茎或土壤线1.5英寸(4厘米)以内。
	0.20	将单个节(或等效物*)上 20%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
可能是热胁迫和降雨减少造成的经济损失	0.30	将单个节(或等效物*)上 30%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	0.40	将单个节(或等效物*)上 40%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	0.50	将单个节(或等效物*)上 50%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
有可能是热胁迫和降雨减少造成的经济损失	0.60	将单个节(或等效物*)上 60%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	0.70	将单个节(或等效物*)上 70%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	0.80	将单个节(或等效物*)上 80%的根修剪到距茎或

[0185]

		土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	0.90	将单个节(或等效物*)上 90%的根修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
除非受损后根系生长条件有利，否则可能是经济的	1.00	将一个完整节(或等效物*)修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	1.25	将一个完整节加上另一个节的 25%修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	1.50	将一个完整节加上另一个节的 50%修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	1.75	将一个完整节加上另一个节的 75%修剪到距茎 1.5 英寸(4 厘米)以内。
经济损失	2.00	将两个完整节修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	2.25	将两个完整节加上另一个节的 25%修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
严重受损、倒伏和鹅颈现象(goose-necking)很常见	2.50	将两个完整节加上另一个节的 50%修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
	2.75	将两个完整节加上另一个节的 75%修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。
毁灭性的受损、倒伏和鹅颈现象几乎是肯定的	3.00	将三个完整节修剪到距茎或土壤线 1.5 英寸(4 厘米)以内。

[0186] *例如，如果两个节显示20％和30％的根修剪，则根将被评分为具有0.50的根损害评级，或者如果一个节显示10％而其它两个节各显示10％，则根将被评分为具有0.30的根损害评级，或者如果两个节各缺失50％的根，则根将被评分为具有1.00的根损害评级，依此类推。

[0187] 表7和表8显示了玉米事件MON95275和对应于每个田间位置的两个阴性对照的平均根损害评级。

[0188] 表7.MON95275和来自Colesburg,IA、Fairbank,IA、Independence,IA和Leigh,NE的对照的平均WCR根损害评级

[0189]

Colesburg	Fairbank	Independen	Leigh

[0190]

							ce					
事件	地块	N	RDR	地块	N	RDR	地块	N	RDR	地块	N	RDR
93IDI3 x LH244	3	29	1.79	3	28	1.75	3	30	0.98	3	28	1.48
MON 89034(93IDI3) x LH244	6	60	2.05	6	54	2.15	6	55	1.05	6	56	1.20
MON95275 (LH244) x 93IDI3 标记	3	27	0.08	3	28	0.06	3	30	0.10	3	29	0.08

[0191] 表8.MON95275和来自Pilger,NE、Roanoke,IL、Rowan,IA和Shelby,NE的对照的平均WCR根损害评级

[0192]

	Pilger			Roanoke			Rowan			Shelby		
事件	地块	N	RDR	地块	N	RDR	地块	N	RDR	地块	N	RDR
93IDI3 x LH244	3	30	0.88	3	29	0.28	3	28	0.62	3	30	0.61
MON 89034(93IDI3) x LH244	6	60	0.96	6	58	0.53	6	59	0.64	6	59	0.98
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	3	30	0.06	3	30	0.06	3	30	0.10	3	30	0.08

[0193] 从表7和表8中可以看出,与阴性对照相比,玉米事件MON95275提供了对WCR的抗性。虽然在大多数情况下,基于表6中列出的RDR量表,对照遭受的损害可能会导致经济损失,但玉米事件MON95275表现出对WCR的抗性,并且仅在所有地点遭受了被视为非经济的损害。

[0194] 2018年夏天,在已知有WCR侵染的5个美国地点进行了田间功效试验,以评估玉米事件MON95275对WCR的抗性:Dundee,IA、Leigh,NE、Oneida,IA、Pilger,NE和Kingsley,IA。如上所述地进行田间试验并进行根损害评级。与先前描述的两个阴性对照一起分析标记阳性和无标记玉米事件MON95275。表9和表10显示了标记和无标记玉米事件MON95275和对应于每个田间位置的两个阴性对照的平均根损害评级。

[0195] 表9.MON95275和来自Dundee,IA、Leigh,NE和Oneida,IA的对照的平均WCR根损害评级。

[0196]

事件	Dundee			Leigh			Oneida		
	地块	N	RDR	地块	N	RDR	地块	N	RDR
93IDI3 x LH244	3	29	1.17	3	25	1.86	3	29	1.37
MON 89034(93IDI3) x LH244	9	86	1.20	8	74	1.87	9	86	1.51
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	3	30	0.06	3	26	0.20	3	30	0.06
MON95275(LH244) x 93IDI3 无标记	3	30	0.08	3	27	0.15	3	29	0.11

[0197] 表10.MON95275和来自Pilger,NE和Kingsley,IA的对照的平均WCR根损害评级。

[0198]

事件	Pilger			Kingsley		
	地块	N	RDR	地块	N	RDR
93IDI3 x LH244	3	28	1.60	6	56	2.12
MON 89034(93IDI3) x LH244	9	89	1.24	18	172	2.17
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	3	22	0.59	6	60	0.07
MON95275(LH244) x 93IDI3 无标记	3	23	0.96	3	30	0.07

[0199] 从表9和表10中可以看出，相对于阴性对照，标记阳性和无标记玉米事件MON95275均表现出对WCR的抗性。在除一个地点以外的所有地点，对标记和无标记玉米事件MON95275的损害是不经济的。Pilger,NE的损害较高，但仍远低于所述地点的阴性对照的损害。

[0200] 玉米事件MON95275提供了对西方玉米根虫(玉米根萤叶甲)的抗性，如在温室和两个美国田间试验中所证明。

[0201] MON95275提供对田间北方玉米根虫的抗性

[0202] 2017年夏天，在Hawkeye,IA的已知有北方玉米根虫(NCR)的田间进行了单次田间试验。标记阳性杂交玉米事件MON95275和上述两个阴性对照以与对西方玉米根虫所进行类似的方式在田间的多个地块上生长。使用与表6中所呈现相同的量表，对事件MON95275和两个阴性对照的根损害评级进行了评估。表11显示了标记阳性玉米事件MON95275和阴性对照的平均根损害评级和RDR范围。

[0203] 表11.MON95275和来自Hawkeye,IA的对照的平均NCR根损害评级。

[0204]

	Hawkeye			
事件	地块	N	范围	RDR
93IDI3 x LH244	4	38	0.09-0.57	0.14
MON89034(93IDI3) x LH244	8	77	0.34-0.98	0.51
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	4	38	0.05-0.7	0.07

[0205] 从上表11中可以看出，标记阳性MON95275的平均RDR低于MON89034(93IDI3)x LH244阴性对照。非转基因对照的平均RDR较低，表明田间的NCR压力较低。

[0206] 2018年夏天，在已知侵染NCR的三(3)个不同地点Belmond,IA、Benson,MN和Colton,SD进行了田间试验。如前所述地进行田间试验。表12和表13显示了三(3)个地点的平均RDR和RDR范围。

[0207] 表12.MON95275和来自Belmond,IA和Benson,MN的对照的平均NCR根损害评级。

[0208]

	Belmond				Benson			
事件	地块	N	范围	RDR	地块	N	范围	RDR
93IDI3 x LH244	4	40	0.13-0.96	0.37	4	39	1.30-2.78	2.04
MON89034(93IDI3) x LH244	10	99	0.15-1.26	0.50	10	95	1.20-2.28	1.98
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	4	38	0.06-0.08	0.07	4	35	0.07-0.17	0.10

[0209] 表13.MON95275和来自Colton,SD的对照的平均NCR根损害评级。

[0210]

	Colton			
事件	地块	N	范围	RDR
93IDI3 x LH244	4	40	0.16-1.33	0.69
MON89034(93IDI3) x LH244	10	88	0.17-2.45	1.29
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	4	39	0.09-0.21	0.14

[0211] 从表12和表13中可以看出，玉米事件MON95275提供了对NCR的抗性。例如，在Benson,MN,NCR压力很高，这可以从阴性对照的高平均RDR中看出，但在玉米事件MON95275中平均RDR低于经济损失。在所有三(3)个地点，MON95275相对于两个阴性对照都表现出对NCR的抗性。

[0212] MON95275提供对北方玉米根虫(巴氏根萤叶甲)的抗性。

[0213] 实施例5

[0214] 玉米事件MON95275为未转化的LH244玉米植物提供一致的产量和类似的农艺学

[0215] 此实施例证明转基因玉米事件MON95275在田间提供了与未转化的LH244玉米植物一致的产量和相似的农艺学。

[0216] 在草甘膦选择盒的Cre切除之前和Cre切除之后,用对应于MON95275的植物进行田间试验,以确定与对照植物相比的产量和农艺学的各个方面。计算产量的测量值并表示为每英亩蒲式耳(bu/acre)。株高和穗高以英寸(in)为单位测量。50%花粉脱落和50%吐丝以种植后天数(DAP)表示。

[0217] 在美国2017年的生长季节,确定了在草甘膦标记盒的Cre切除之前,MON95275自交系和杂种的产量和农艺测量值。表14和表15分别显示了对MON95275自交系和杂种测量的产量和农艺特征。用于自交比较的阴性对照植物是未转化的品种LH244。通过用玉米品种93IDI3对自交系MON95275异花授粉产生含有MON95275的杂种,并且对照是MON 89034(93IDI3)x LH244杂交系。

[0218] 表14.MON95275自交系相对于非转基因对照的产量和农艺学。

[0219]

事件	产量 (bu/acre)	株高 (in)	穗高 (in)	50%花粉脱落 (DAP)	50%吐丝(DAP)
MON95275(LH244)标记	104.3	79	35.9	60.8	62.1
LH244	110.7	80.6	36.6	60.6	61.5

[0220] 表15.MON95275杂种相对于非转基因对照的产量和农艺学。

[0221]

事件	产量 (bu/acre)	株高 (in)	穗高 (in)	50%花粉脱落 (DAP)	50%吐丝 (DAP)
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	223.2	101.3	44.6	55.8	56.1
MON 89034(93IDI3) x LH244	216.7	98.8	46.3	54.9	55.2

[0222] 从表15和表16中可以看出,在2017年美国田间试验中,相对于对照,自交系和杂种的MON95275的产量和其它农艺测量值都相对相同。自交系和杂种与它们各自的对照之间的变异性在可接受的范围内,并且表明将T-DNA插入事件MON95275的玉米基因组中对产量和其它农艺特征没有造成负面影响。

[0223] 在美国2018年的生长季节,确定了在草甘膦标记盒的Cre切除之前和切除之后,MON95275自交系和杂种的产量和农艺测量值。表16和17分别显示了对MON95275标记阳性和无标记自交系和杂种测量的产量和农艺特征。

[0224] 表16.MON95275自交系相对于非转基因对照的产量和农艺学。

[0225]

事件	产量 (bu/acre)	株高 (in)	穗高 (in)	50%花粉脱落 (DAP)	50%吐丝 (DAP)
MON95275(LH244)标记	114.3	83.1	37.7	62.0	63.1
LH244	122.4	82.7	38.6	62.0	63.1
MON95275(LH244)无标记	139.0	84.0	36.5	61.8	63.0
LH244	128.1	84.5	38.6	61.8	62.8

[0226] 表17.MON95275杂种相对于非转基因对照的产量和农艺学。

[0227]

事件	产量 (bu/acre)	株高 (in)	穗高 (in)	50%花粉脱落 (DAP)	50%吐丝 (DAP)
MON95275(LH244) x 93IDI3 标记	208.1	99.5	45.5	57.7	58.9
MON89034(93IDI3) x LH244	201.4	98.5	44.6	57.5	58.9
MON95275(LH244) x 93IDI3 无标记	212.6	100.6	46.9	57.8	59.0
MON89034(93IDI3) x LH244	221.5	99.3	44.9	58.1	59.2

[0228] 从表16和表17中可以看出，在2018年美国田间试验中，相对于对照，自交系和杂种的MON95275(标记阳性和无标记两者)的产量和其它农艺测量值都相对相同。自交系和杂种与它们各自的对照之间的变异性在可接受的范围内，并且表明将T-DNA插入事件MON95275的玉米基因组中对产量和其它农艺特征没有造成负面影响。

[0229] 在2018年至2019年生长季节期间，还在阿根廷研究了MON95275无标记自交系的产量和农艺学。表18显示了对MON95275无标记自交系测量的产量和农艺特征。

[0230] 表18.MON95275自交系相对于非转基因对照的产量和农艺学。

[0231]

事件	产量 (bu/acre)	株高 (in)	穗高 (in)	50%花粉脱落 (DAP)	50%吐丝 (DAP)
MON95275(LH244) 无标记	101.6	74.4	37.5	70.5	70
LH244	105.2	73.5	34.3	70.3	69.8

[0232] 从表18中可以看出，2018-2019年阿根廷田间试验的无标记自交系和对照的产量和其它农艺测量值相对相同。自交系与对照之间的变异性在可接受的范围内，并且表明将T-DNA插入事件MON95275的玉米基因组中对产量和其它农艺特征没有造成负面影响。

[0233] 实施例6

[0234] 玉米事件MON95275事件特异性终点TAQMAN®分析

[0235] 以下实施例描述了用于鉴定玉米样品中是否存在MON95275的方法。设计了一对PCR引物和一个探针，用于在事件特异性终点TAQMAN® PCR中鉴定玉米基因组DNA与MON95275的插入DNA之间形成的独特接头。用于在事件特异性终点TAQMAN® PCR中鉴定玉米样品中是否存在MON95275的条件的实例描述于表19和表20中。

[0236] 寡核苷酸正向引物SQ20267的序列(SEQ ID NO:15)与对应于SEQ ID NO:10的位置15,706-15,732的核苷酸序列相同。寡核苷酸反向引物SQ51355的序列(SEQ ID NO:16)与对应于SEQ ID NO:10的位置15,756-15,779的核苷酸序列的反向互补序列相同。寡核苷酸探针PB10263的序列(SEQ ID NO:17)与对应于SEQ ID NO:10的位置15,734-15,752的核苷酸序列相同。带有探针PB10263(SEQ ID NO:17)的引物SQ20267(SEQ ID NO:15)和SQ51355(SEQ ID NO:16)可被萦光标记(例如，6-FAM™萦光标记)，可用于终点TAQMAN® PCR分析以鉴定样品中是否存在源自MON95275的DNA。

[0237] 除了SQ20267(SEQ ID NO:15)、SQ51355(SEQ ID NO:16)和PB10263(SEQ ID NO:17)，本领域技术人员应该显而易见的是，其它引物和/或探针可设计为扩增或杂交至SEQ ID NO:10内的序列，所述序列对于检测样品中是否存在源自MON95275的DNA是独特的，并且是有用的。

[0238] 遵循标准分子生物学实验室实践，开发了用于事件鉴定的PCR分析，用于检测样品中的MON95275。标准PCR分析或TAQMAN® PCR分析的参数均使用用于检测样品中是否存在源自MON95275的DNA的每组引物对和探针(例如，用萦光标签如6-FAM™标记的探针)进行优化。PCR反应的对照包括内部对照引物和对用作内部对照的玉米基因组内的区域特异的内部对照探针(例如，经VIC®标记)，并且是引物SQ20222(SEQ ID NO:18)、SQ20221(SEQ ID NO:19)和VIC®标记探针PB50298(SEQ ID NO:20)。

[0239] 通常，为检测样品中的MON95275而优化的参数包括引物和探针浓度、模板化DNA的量和PCR扩增循环参数。此分析的对照包括来自含有MON95275的玉米的阳性对照、来自非转基因玉米的阴性对照以及不含模板DNA的阴性对照。

[0240] 表19.MON95275事件特定端点TAQMAN® PCR反应组分。

[0241]

步骤	试剂	储备液浓度 (μM)	体积 (μl)	最终浓度 (μM)	注解
	反应体积		5		
1	主混合物		2.28		1X 最终浓度
2	事件特定引物 SQ51355	100	0.05	0.9	
3	事件特定引物 SQ20267	100	0.05	0.9	
4	事件特定 6FAM™ 探针 PB10263	100	0.01	0.2	探针对光敏感
5	内部对照引物 SQ20222	100	0.05	0.9	
6	内部对照引物 SQ20221	100	0.05	0.9	
7	内部对照 VIC®探针 PB50298	100	0.01	0.2	探针对光敏感
8	提取的 DNA (模板): • 待分析的叶子样品 • 阴性对照(非转基因 DNA) • 阴性水对照(无模板对照) • 阳性定性对照 MON95275 DNA		2.5		对每个模板进行单独的反应。

[0242] 表20.终点**TAQMAN®**热循环仪条件。

[0243]

步骤编号	循环次数	设置
1	1	95°C 20 秒

[0244]

步骤编号	循环次数	设置
2	35	95℃ 3 秒
		60℃ 20 秒
3	1	10℃

[0245] 实施例7

[0246] 使用TAQMAN®确定玉米事件MON95275的接合性的分析

[0247] 以下实施例描述了可用于鉴定事件MON95275的接合性的方法。设计PCR引物对和探针以用于鉴定引起事件MON95275的T-DNA插入阳性的等位基因的特定特性，并且设计PCR引物对和探针作为对玉米基因组内的区域特异的内部对照探针，其用作在玉米基因组中表现为纯合子的内部对照。

[0248] 实施例6中描述的对MON95275转基因等位基因特异的PCR引物对和探针，PCR引物SQ20267(SEQ ID NO:15)、SQ51355(SEQ ID NO:16)和6-FAM™标记的探针PB10263(SEQ ID NO:17)，以及对内部对照特异的PCR引物对和探针，引物SQ20222(SEQ ID NO:18)、SQ20221(SEQ ID NO:19)和VIC®标记的探针PB50298(SEQ ID NO:20)用于实时PCR反应，例如实施例6中描述的反应。

[0249] 扩增后，确定对应于MON95275插入的等位基因和单拷贝纯合内标的扩增子的循环阈值(Ct值)。确定单拷贝纯合内标扩增子的Ct值与MON95275插入的等位基因扩增子的Ct值之差(ΔCt)。关于接合性，约零(0)的ΔCt表示插入的MON95275 T-DNA的纯合性，且约一(1)的ΔCt表示插入的MON95275 T-DNA的杂合性。缺少对应于MON95275插入的等位基因的扩增子表明不存在插入的MON95275 T-DNA的样品。TAQMAN®热扩增方法中的Ct值会因例如扩增效率和理想退火温度等多种因素而存在一定的变化性。因此，“约一(1)”的范围定义为0.75至1.25的ΔCt。

[0250] 实施例8

[0251] 使用TAQMAN®确定玉米事件MON95275的接合性的分析

[0252] 以下实施例描述了可用于鉴定玉米样品中事件MON95275的接合性的方法。

[0253] 设计了一对PCR引物和一个探针，用于鉴定引起事件MON95275的T-DNA插入阳性和阴性等位基因的特定特性。可用于事件特异性接合性TAQMAN®PCR的条件的实例提供于表21和表22中。对于此分析，将四种不同的引物和两种不同的探针与样品混合在一起。接合性分析中使用的DNA引物对是(1)引物SQ20267(SEQ ID NO:15)和SQ51355(SEQ ID NO:16)；以及(2)引物PNEG95275_F(SEQ ID NO:21)和PNEG95275_R(SEQ ID NO:22)。接合性分析中使用的探针是6FAM™标记的探针PB10263(SEQ ID NO:17)和VIC®标记的探针PRBNEG95275(SEQ ID NO:23)。引物SQ20267(SEQ ID NO:15)和SQ51355(SEQ ID NO:16)产生可通过与6FAM™标记的探针PB10263(SEQ ID NO:17)的结合鉴定的第一扩增子，并且检测探针与扩增子的结合可诊断含有玉米DNA的样品中是否存在事件MON95275 DNA。引物PNEG95275_F(SEQ ID NO:21)和PNEG95275_R(SEQ ID NO:22)产生可通过与VIC®标记的

探针PRBNEG95275(SEQ ID NO:23)的结合鉴定的第二扩增子,并且当含有玉米DNA的样品中不存在MON95275的拷贝时,检测探针与扩增子的结合可诊断MON95275事件DNA的缺失;即,此第二引物和探针组可诊断野生型等位基因。

[0254] 当三种引物和两种探针在PCR反应中与从就事件MON95275来说是杂合的植物提取的DNA混合在一起时,可从6FAM™标记的探针PB10263(SEQ ID NO:17)和VIC®标记的探针PRBNEG95275(SEQ ID NO:23)两者检测到萤光信号,并且从这样的热扩增反应中检测到两种萤光团可指示和诊断就事件MON95275来说是杂合的植物。当三种引物和两种探针在PCR反应中与从就事件MON95275来说是纯合的植物提取的DNA混合在一起时,仅可从6FAM™标记的探针PB10263(SEQ ID NO:17)中且不可从VIC® 标记的探针PRBNEG95275(SEQ ID NO:23)中检测到萤光信号。当三种引物和两种探针在PCR反应中与从不存在MON95275(即野生型)的植物中提取的DNA混合在一起时,只能从VIC®标记的探针PRBNEG95275(SEQ ID NO:23)中检测到萤光信号。用于此分析的模板DNA样品和对照是来自含有MON95275 DNA的玉米的阳性对照(来自已知纯合和已知杂合样品)、来自非转基因玉米的阴性对照和不含模板DNA的阴性对照。

[0255] 表21.MON95275接合性TAQMAN®PCR

[0256]

步骤	试剂	储备液浓度(μl)	体积(μl)	最终浓度(μM)	注解
	反应体积		5		
1	主混合物		2.28		1X 最终浓度
2	事件特定引物SQ51355	100	0.05	0.9	
3	事件特定引物SQ20267	100	0.05	0.9	
4	事件特定6FAM™探针 PB10263	100	0.01	0.2	探针对光敏感
5	WT等位基因引物PNEG95275_F	100	0.05	0.9	
6	WT等位基因引物PNEG95275_R	100	0.05	0.9	
7	WT等位基因VIC®探针PRBNEG95275	100	0.01	0.2	探针对光敏感

[0257]

8	提取的 DNA (模板): • 待分析的叶子样品 • 阴性对照(非转基因 DNA) • 阴性水对照(无模板对照) • 阳性定性对照 MON95275 DNA		2.5		对每个模板进行单独的反应。

[0258] 表29.Zygosity**TAQMAN®**热循环仪条件

[0259]

步骤编号	循环次数	设置
1	1	95°C 20 秒
2	40	95°C 3 秒
		60°C 20 秒
3	1	10°C

[0260] 实施例9

[0261] 在任何MON95275育种事件中鉴定玉米事件MON95275

[0262] 以下实施例描述了如何使用玉米事件MON95275在任何育种活动的后代中识别MON95275事件DNA。例如,MON95275事件可通过育种或通过定点渗入与本领域已知控制玉米根虫害虫的其它事件叠加,例如包括但不限于以下的任何玉米事件:MON863、MON88017、DAS-59122-7、DP-004114-3、DP23211和MIR604。MON95275事件也可通过育种或通过定点渗入与本领域已知的控制除玉米根虫之外的害虫的其它转基因玉米事件叠加,例如包括但不限于包括以下的事件:MON810、TC1507、MON89034、MON95379和MIR162等,所述事件赋予鳞翅目抗性,或提供赋予对本领域已知的任何数量的除草剂的耐受性的蛋白质表达的事件。

[0263] DNA引物对用于产生可诊断玉米事件MON95275的扩增子。可诊断事件MON95275 DNA的扩增子包含至少一个接头序列。事件MON95275特异性DNA的接头序列是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6(分别是图1中的[1]、[2]、[3]、[4]、[5]和[6])。SEQ ID NO:1是五十(50)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区。SEQ ID NO:1位于SEQ ID NO:10的核苷酸位置1,049-1,098处。SEQ ID NO:2是五十(50)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的3′接头区。SEQ ID NO:2位于SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,731-15,780处。SEQ ID NO:3是一百(100)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区。SEQ ID NO:3位于SEQ ID NO:10的核苷酸位置1,024-1,123处。SEQ ID NO:4是一百(100)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的3′接头区。SEQ ID NO:4位于SEQ

ID NO:10的核苷酸位置15,706-15,805处。SEQ ID NO:5是两百(200)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5′接头区。SEQ ID NO:5位于SEQ ID NO:10的核苷酸位置974-1,173处。SEQ ID NO:6是两百(200)个核苷酸序列,代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的3′接头区。SEQ ID NO:6位于SEQ ID NO:10的核苷酸位置15,656-15,855处。

[0264] 将产生可诊断事件MON95275的扩增子的引物对包括基于侧接序列(SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12)和插入的T-DNA(SEQ ID NO:9)的引物对。为了获得其中发现SEQ ID NO:1、或SEQ ID NO:3、或SEQ ID NO:5的诊断扩增子,可基于碱基1-1,073的5′侧接玉米基因组DNA(SEQ ID NO:11)设计正向引物分子且基于位置1,074至15,755的插入T-DNA(SEQ ID NO:9)设计反向引物分子,其中引物分子具有长度足以与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:9特异性杂交的连续核苷酸。为了获得其中发现SEQ ID NO:2、或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的诊断扩增子,将基于位置1,074至15,755的插入T-DNA(SEQ ID NO:9)设计正向引物分子且基于位置15,756至16,861的3′侧接玉米基因组DNA(SEQ ID NO:12)设计反向引物分子,其中引物分子具有长度足以与SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:12特异性杂交的连续核苷酸。

[0265] 出于实际目的,应设计产生有限大小范围,优选在200至1000个碱基之间的扩增子的引物。较小大小的扩增子通常在热扩增反应中更可靠地产生,允许更短的循环时间,并且可在琼脂糖或丙烯酰胺凝胶上轻松分离和可视化或适用于终点TAQMAN®样分析。另外,可将使用所述引物对产生的扩增子克隆至载体中,进行繁殖、分离和测序,或者可直接使用本领域公认的方法进行测序。任何源自可用于DNA扩增方法以产生可诊断事件MON95275 DNA或其后代的扩增子的SEQ ID NO:11与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:12与SEQ ID NO:9的组合的引物对都是本发明的一个方面。可用于DNA扩增方法以产生可诊断事件MON95275 DNA或其含有此类DNA的后代的扩增子的SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:12或其互补序列的至少十一(11)个连续核苷酸的任何单个分离的DNA多核苷酸引物分子都是本发明的一个方面。

[0266] 此分析的扩增条件的实例说明于表19和表20中。这些方法的任何修改或使用与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12同源或互补的DNA引物,或事件MON95275 DNA的转基因插入物(SEQ ID NO:9)中所含的遗传元件的DNA序列,产生可诊断事件MON95275 DNA的扩增子在本领域内。诊断扩增子包含与至少一个转基因/基因组接头DNA或其主要部分同源或互补的DNA分子。

[0267] 对MON95275事件植物组织样品的分析应包括来自含有事件MON95275 DNA的植物的阳性组织对照、来自不含有事件MON95275 DNA的玉米植物(例如LH244)的阴性对照和不含玉米基因组DNA的阴性对照。引物对将扩增内源性玉米DNA分子,并将作为DNA扩增条件的内部对照。DNA扩增方法领域的技术人员可从SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:9中选择额外引物序列。通过表19和表20中所示的方法为产生扩增子选择的条件可能不同,但会产生可诊断事件MON95275 DNA的扩增子。在表23和表24的方法内或对所述方法进行修改后使用DNA引物序列在本发明的范围内。由至少一个源自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:9的DNA引物序列产生的可诊断事件MON95275的扩增子是本发明的一个方面。

[0268] 含有足够长度的源自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:9的连续核苷酸的至少一个DNA引物的DNA检测试剂盒是本发明的一个方面,所述DNA引物在用于DNA扩增方

法时产生可诊断事件MON95275 DNA或含有此类DNA的后代的扩增子。当在DNA扩增方法中测试时,其中基因组将产生可诊断事件MON95275 DNA的扩增子的玉米植物或种子是本发明的一个方面。MON95275事件扩增子的分析可使用Applied Biosystems GeneAmp™PCR System 9700、Stratagene Robocycler®、Eppendorf® Mastercycler® Gradient热循环仪或任何其它可用于产生可诊断事件MON95275 DNA的扩增子的扩增系统,如表24中所示。

[0269] 在本说明书中引用并且对本发明重要的所有出版物和公布的专利文件都以引用方式并入本文,其程度与每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指示以引用方式并入的程度相同。

[0270] 已经示出和描述本发明的原则,本领域技术人员显而易知本发明可在安排和细节上改进而不背离这些原则。在所附权利要求书的精神和范围内的所有修改都被要求保护。

序列表

<110> 孟山都技术公司(Monsanto Technology LLC)

<120> 转基因玉米事件MON95275以及其检测方法和用途(TRANSGENIC CORN EVENT MON95275 AND METHODS FOR DETECTION AND USES THEREOF)

<130> MONS:480WO

<150> US 63/014,771
<151> 2020-04-24

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5'接头区的50个核苷酸的序列。

[0001]

<400> 1
ttcaggtctg tagcagccgg cccgatcaaa cactgatagt ttcccggtaa 50

<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表整合的转基因表达盒和玉米基因组DNA的3'接头区的50个核苷酸的序列。

<400> 2
atcatactca ttgctgatcc atgtaactat aacacagagg ctggccaacc 50

<210> 3
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表玉米基因组DNA和整合的转基因表达盒的5'接头区的100个核苷酸的序列。

<400> 3
ccgtcccttt tttggcgcat gaagtttcag gtctgtagca gccggcccga tcaaacactg 60

atagtttccc ggtaactata acggtcctaa ggtagcgact 100

<210> 4
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表整合的转基因表达盒和玉米基因组 DNA 的 3’接头区的 100 个核苷酸的序列。

<400> 4
ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta actataacac 60

agaggctggc caacctggag gcgcagcggc gccacaaggt 100

<210> 5
<211> 200
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表玉米基因组 DNA 和整合的转基因表达盒的 5’接头区的 200 个核苷酸的序列。

[0002] <400> 5
gactccaatt ttttatgaag acgggtcaaa actcaacaaa tcaacggata ccgtcccttt 60

tttggcgcat gaagtttcag gtctgtagca gccggcccga tcaaacactg atagtttccc 120

ggtaactata acggtcctaa ggtagcgact taggctgagc ccgggcaggc ctacccataa 180

tacccataat agctgtttgc 200

<210> 6
<211> 200
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表整合的转基因表达盒和玉米基因组 DNA 的 3’接头区的 200 个核苷酸的序列。

<400> 6
ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt 60

ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta actataacac agaggctggc 120

caacctggag gcgcagcggc gccacaaggt ccagatctcg ttcatcctgg ccacgttgct 180

cgcgactccg aggacgtgca 200

<210> 7
<211> 1226
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表玉米基因组 DNA 和整合的转基因表达盒的 5' 接头区的 1,226 个核苷酸的序列。

<400> 7

[0003]

gaacatttgg cggaagaaca tgttttaagg gctagtttgg aagctcaatt ttcccaagag 60

attcttattt tcccaaggga aaataaacta atttcccttg tgaaaatgaa aatcccttgg 120

aataacgtgg ttcccaaact aaacctaagg gctttttttt atcattgtgt caaacagttt 180

accagctaat tttagtacct taacatttaa ataggtcagc taaaaaagta gctaattgtt 240

agccgaagaa ctgataaatt atttgtccat tagctatttg accttactaa tagatattaa 300

taaatcatat aaatagtcaa gtcttcaaat ataccctgac taatatttgc tagttaatta 360

tttatttttct gattaattat tagccactgc taaacaataa gtcagtacga cccaaacaag 420

gcctagttac tactcctatc cataaaaaaa agttgtttga ccattttgac gccaaattta 480

accggcttat attaccaaaa tatttgaaaa aacattaaaa acagttgctg gttaaagtaa 540

attgtatgat aaactaaatc ggaatgaaaa taaataatag ttataatttt ttaataagat 600

gagccagtca aatttgacaa aaagttaaac cgatattctt tctggaacgg aaggagtaga 660

ctgtgttaat gttatgatat tgtgagcaag agagaagggg gtcgatagca acgacccaag 720

tgagtgggag gaggaaggtt ggggcgacga tgttgtgggg agggtgaagg atgatctaaa 780

taatattgtt cgctggattt gagtgagtaa gagcaacccc aacagtttag atataaatcc 840

tagctaaatt tagagtcttg ccaagagatt tttatttttt caaaaaaata gtttatttt 900

ctttgggaaa tagaaatctc ttggaacaat agtgttttta aactagtctt ggcgtttgta 960

aagaagatag atagactcca atttttttatg aagacgggtc aaaactcaac aaatcaacgg 1020

ataccgtccc ttttttggcg catgaagttt caggtctgta gcagccggcc cgatcaaaca 1080

ctgatagttt cccggtaact ataacggtcc taaggtagcg acttaggctg agcccgggca 1140

ggcctaccca taatacccat aatagctgtt tgccaatcgt tcttcttggc gcgccgttgt 1200

caatcaattg gcaagtcata aaatgc 1226

<210> 8
<211> 1207
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表整合的转基因表达盒和玉米基因组 DNA 的 3' 接头区的 1,207 个核苷酸的序列。

<400> 8
aataacgctg cggacatcta catttttgaa ttgaaaaaaa attggtaatt actctttctt 60

tttctccata ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt aactataaca cagaggctgg 120

ccaacctgga ggcgcagcgg cgccacaagg tccagatctc gttcatcctg gccacgttgc 180

tcgcgactcc gaggacgtgc aggccactcg tcgtagctct acctcggcag cctctgtcgc 240

gactccgagg acgtgcaggc cgcgcagctc gcgcgctcct tccgtgccct ctccggtttt 300

gtgattccct gcgccctctc cggcttcgcc gccgcatccg ggtttacgtg gtggtgggcc 360

accgcagtcc caccatccgc gaggcagcca gcagggcccc cgcgctcgac gataggctgc 420

[0004]

tgaagcccct cgcccatcac cgtcttctgg ggcgtgccta ctgcgaggag gatggggtct 480

tccacaccat gccacaaggt gttcgacgct cgttccaact ccgacgcgca gcctgtctgc 540

tcgcccatca ccggccacct gtctggacgc gcagcctgct gcgtcaacat gctcagcagc 600

atcaactgct caagaagcta caccaacatc actcctcttc ctccacgggg gactggattc 660

gccattggta cctgctgctt catgctcaac caacaccctt cttgccaagg atgatggaga 720

ttatatgaac cggtgtttca gttggtgttg gaagtcccca tggttacatc cagatcagtc 780

ggaatttaga gacttcctcc aatggtcttc ttggcatttc caatttgtca ggtgcagagc 840

atcacagtta ccaattcctt ggccaccacc tataacattg cgtttggtta gagatgacct 900

tgttgtgatg ccagtgattc caagtatgct attgttatct cagtgctatt tcagtggagt 960

agaatgtgtg ctgacaacta tagatccatt attttctaaa ttttgtgctg agagagagct 1020

gttctggaag ccaccttggc aacctccagt tcctaacacc agatctgaga taccgttgtt 1080

gatagagttt gtccatctta ctacaggagt ctgtgatact ctgcatatgg ttactgaatt 1140

tcctaagcaa tactttgttg gcctgcttgt gctgattaca agggaatttt tcatgtctgg 1200

gagaata 1207

<210> 9
<211> 14682
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于玉米事件 MON95275 的转基因插入 T-DNA 的 14,682 个核苷酸的序列。

<400> 9
tcaaacactg atagtttccc ggtaactata acggtcctaa ggtagcgact taggctgagc 60

ccgggcaggc ctacccataa tacccataat agctgtttgc caatcgttct tcttggcgcg 120

ccgttgtcaa tcaattggca agtcataaaa tgcattaaaa aatattttca tactcaacta 180

caaatccatg agtataacta taattataaa gcaatgatta gaatctgaca aggattctgg 240

aaaattacat aaaggaaagt tcataaatgt ctaaaacaca agaggacata cttgtattca 300

gtaacatttg cagcttttct aggtctgaaa atatatttgt tgcctagtga ataagcataa 360

[0005] tggtacaact acaagtgttt tactcctcat attaacttcg gtcattagag gccacgattt 420

gacacatttt tactcaaaac aaaatgtttg catatctctt ataatttcaa attcaacaca 480

caacaaataa gagaaaaaac aaataatatt aatttgagaa tgaacaaaag gaccatatca 540

ttcattaact cttctccatc catttccatt tcacagttcg atagcgaaaa ccgaataaaa 600

aacacagtaa attacaagca caacaaatgg tacaagaaaa acagttttcc caatgccata 660

atactcaaac tcagtaggat tctggtgtgt gcgcaatgaa actgatgcat tgaacttgac 720

gaacgttgtc gaaaccgatg atacgaacga aagctaggcc tcagcgagta ccgctggcga 780

tctaatccat gatatcgtga acatcatcta cattcaaatt cttatgagct ttcttaaggg 840

catctgcagc atttttcata gaatctaata cagcagtatt tgtgctagct ccttcgaggg 900

cttccctctg catttcaata gttgtaaggg ttccatctat ttgtagttgg gtcttttcca 960

atcgtttctt ctttttgagg gcttggagtg caactctttt atttttcgac gcatttttct 1020

ttgcgctcct gcaggcggcc gcgtggatga ggagttaatc ggtcgtgtga gagtagtgat 1080

cgagtggatg tcgtcgagag tgatgagtgt tgatgttgtt agtgatatgt ggtagaaggt 1140

atcgtgataa agcgttaacg cgatcgcagt acttgcaaag aaaaatgcgt cgaaaaataa 1200

aagagttgca ctccaagccc tcaaaaagaa gaaacgattg gaaaagaccc aactacaaat 1260

agatggaacc cttacaacta ttgaaatgca gagggaagcc ctcgaaggag ctagcacaaa 1320

tactgctgta ttagattcta tgaaaaatgc tgcagatgcc cttaagaaag ctcataagaa 1380

tttgaatgta gatgatgttc acgatatcat ggatggtatc gcacagcgac tgctgaggga 1440

cgtcgagctc ccgcttggta tctgcattac aatgaaatga gcaaagacta tgtgagtaac 1500

actggtcaac actagggaga aggcatcgag caagatacgt atgtaaagag aagcaatata 1560

gtgtcagttg gtagatacta gataccatca ggaggtaagg agagcaacaa aaaggaaact 1620

ctttatttt aaattttgtt acaacaaaca agcagatcaa tgcatcaaaa tactgtcagt 1680

acttatttct tcagacaaca atatttaaaa caagtgcatc tgatcttgac ttatggtcac 1740

aataaaggag cagagataaa catcaaaatt tcgtcattta tatttattcc ttcaggcgtt 1800

aacaatttaa cagcacacaa acaaaaacag aataggaata tctaattttg gcaaataata 1860

agctctgcag acgaacaaat tattatagta tcgcctataa tatgaatccc tatactattg 1920

[0006]

acccatgtag tatgaagcct gtgcctaaat taacagcaaa cttctgaatc caagtgccct 1980

ataacaccaa catgtgctta aataaatacc gctaagcacc aaattacaca tttctcgtat 2040

tgctgtgtag gttctatctt cgtttcgtac taccatgtcc ctatattttg ctgctacaaa 2100

ggacggcaag taatcagcac aggcagaaca cgatttcaga gtgtaattct agatccagct 2160

aaaccactct cagcaatcac cacacaagag agcattcaga gaaacgtggc agtaacaaag 2220

gcagagggcg gagtgagcgc gtaccgaaga cggtcgtacg gaaaatagag agagatagat 2280

ttgtagagag agactggtga tttcagcgtg tcctctccaa atgaaatgaa cttccttata 2340

tagaggaaga gtcttgcgaa ggatagtggg attgtgcgtc atcccttacg tcagtggaga 2400

tatcacatca atccacttgc tttgaagacg tggttggaac gtcttctttt tccacgatgc 2460

tcctcgtggg tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc agaggcatct tgaacgatag 2520

cctttccttt atcgcaatga tggactttgt aggagccacc ttccttttct actgtccttt 2580

ccatgaagtg acagatagat gggcaatgga atccgaggag gtttcctgat attacccttt 2640

gttgaaaagt ctcaatagcc ctttggtctt ctgagactgt atctttgata ttcttggagt 2700

agacgagagt gtcgtgctcc accatgttga cgaagatttt cttcttgtca ttgagtcgta 2760

aaagactctg tatgaactgt ccgccagtct tcacggcgag ttctgttaga tcctcgatct 2820

gaatttttga ctccttgctg atggacggtg tggagggagg tgctttcgtg cttggcggca 2880

tgcacgggta atcggcaacg catgtgtgct ttgagcgttg cctggttgtc atgggataca 2940

ggacaacaac catcgtcatg tggagatcga tcgagatata ggatcggagc aagttgacaa 3000

atcatgtcaa aatcactcaa cgaggtagca tgttgtataa acagatcaat gcagaaatac 3060

attagtgcta gctggaattg ttccgatcag ctggcgctat tattatttta tcgaaactga 3120

tgcgtgtgcg tgctcgcctt attttgtgtt ctgcgggggc ggctcccgcg aatacctatt 3180

atttctgtga gcgctccctt caaaagtgac atgattttat atatccctct acgatacgac 3240

gaccagatca agctaccact accaccgaaa tcaggacctc tgctaaccgg tggcccagac 3300

cggacaaaag ttattgcatt gtatatgggt agggtttatg tccattttac atcgcgcata 3360

gtacgcacaa tttctgttgg cccatcaata tataccgagt gtgctgcagc ctatagtgat 3420

[0007] agagttttac ttaattctaa gcctaggatc cgaacagtga ttggaaatcc ttagttacag 3480

tctgacagta taaaggtcac tctcactacc tggtagtaga gccatgaccc ggtgctgata 3540

tcactatcag gtacagccat aaccacagtg ctagtggaaa tatcactacg tactaggcca 3600

atctataatc tgatgagaac acatatagtt gacatagtcg atacgtaccc atgttatgag 3660

tcccgagtga ctgtcaagga catgatttga gttttggtaa gtgtgtgttg gacaaatcga 3720

agcatgagta gggttcatgg cctgtgattt gtactagtct aactaactaa attatcgtgt 3780

acaaccgttg atctgagagg gtcccgcgct gcaaatctat tgtaatactc cctgtcgtaa 3840

tactgtgtta atttgtgctc agtcggacgg ctcagacttt acggtgatat aaacctttac 3900

tgagctgaac tcgacctgga gatcgaatcg accccgcagg tgttccgaag cgtaccacgg 3960

cgagcgttag gtctaagcaa aagccacacc cttcacagaa cgaaggagtt tcgcgaagtc 4020

acgctgattt aaaaagagcg ggccactttt tccactcttg gtcaacagaa aaaggcggac 4080

gagttcagat ttaaggccag ctgcacgccg atcagcagat tcgacgttac ccgcggagag 4140

aaggctgcct gctacttccc agtcgaaagt ggtgtagttc aagtgatctc taaagctaag 4200

gctccgctgg tcctagtcgt taattaccga gcagctctcc ggcgtacaga accacgaagt 4260

tacttcttga ggtgaagcgt aagtggtggt gagggtaagt agttggaagc agaagcctta 4320

agtgatacaa tctggcttcc accttgtcgg aactcgttaa aatttccctt gattacaata 4380

taagtacctg cctgatcgtt ctggtagcct gatcgatttt tatttttggg ctacgggcaa 4440

ttgctcgcaa tttattgaag tcgcacgggc gcgaaagaag acgttgttct ctctgcttgc 4500

tagaagccgc ggataagcga ttctatccga tatttaagac ccgtgtagac cagcagacgt 4560

gagtgggccg tttccagaaa ccgtctctcc ttgcgacgat agatccgata gtaagtaact 4620

tcacccctga tcaacggcgt agtcgcctgt ctggttcgga tctgtataga tttggcggat 4680

tccgcttgcg aaatctttag cagcttaggt ccggagcccc cggtggatct ggctgttcag 4740

cggcacggtc caatctcctt agctcctctg tgaacagcag tcgaactcta agattcttga 4800

tacgcgcaac acgggccttg gcgagcctgg ggataactcg cgaggacgct ctcgccgcgc 4860

taaagcgtgc gatcacaccg ctccgacaag tgactttgcc aaatctagaa agagagacta 4920

cactgcttgc cggtgcagtc ttgatccacc ttggaggggc tgacgctaac taactaaggc 4980

[0008]

gcgcctgcct actaggcctc gacccttgtt cgtcactgct gacgtctttt tctccattat 5040

tggaggatga gtcactgcaa gctgtaaagc ttgtattatt gctagtggag gccccacctg 5100

cacatgccga gcaattatga ttgtcggcca gtagcttttt gagctgtttg cagagcaata 5160

acttagtgga tgtccccacc attacatcgt tattgatgat gctttcttca aaggaagata 5220

agatgctgac atcctgtctg gagattgtcg ctccatagtg actcgtgatc aatactcttt 5280

catgtgagta attgattttt atctttgttt ctccgttgat ggcctactag gccaaatgga 5340

tgaaacaact tggaccaatc agagatggcc acgtcagctc ccgatcgtcg taaccgacca 5400

aacccgatcg ataacggttt aggctccaat acaccgtcgg taccacccgg tcgctatcat 5460

ctgcccccgt cccaacgcta ttggtatcgt ccgcccctat atcggtcggt agcccagtcc 5520

accgtcgggg ccaatcgtcc cctgctgcgt ccgctcgtgt cggtaccgat cgccaaaaac 5580

gccacgtcaa cggcactgcg gtaccgaccg ccgctggcac cggccttagc gggccacacg 5640

accgatcgct gttgtacgga cgtagaggtg aatcatgcga ttgaattttc gctagaggaa 5700

agttatcatc ttattatctc caaccctcct tcctacggct ggatccgacg aaaatttacc 5760

ctggacggtg ccagtaacaa ttgcaggtct cactcacgtg ctaaatccag caatcaaaca 5820

cgaaggaata tacgtgatct ggccagaaca tgcaagagaa taatacagta gtgttagagt 5880

acgaaaccta cacgattcaa cgaattaatc aatgggttca cgttcacggg tatgctcgcg 5940

cacgtccaaa atccaacgac atttttataa gcggcatgat ccagacgggc cagctcgagc 6000

accacatggc gtggctccat ctcgcatccc ccatcaccgc tataaatacc attggccatg 6060

cacacccgca ctcccacaca gcacaagcag cagcagcagc agcagctcga tcgaactagc 6120

ttagctacta cgtgcgcgtg caacaagcag ctcgatcgat cgccctcacg gtaatttctt 6180

ctcccaaaat aaacctaatc tttaatctgt tgcctgtcta ctcttcctat ctgttgctaa 6240

aaatttgaat ttggtatgtg caggaggact taattaaggg acccaccgcc atgtcatcca 6300

cggacgtgca agagcgcctg cgggacttgg cgcgcgaaga cgaggcggga acgttcaacg 6360

aggcttggaa caccaacttc aagccgtcgg acgagcagca attcagctac tcgccgacgg 6420

agggaattgt cttcctcacg ccgcctaaga acgtcatcgg tgagcggcgc atctcccagt 6480

[0009] acaaggtgaa caatgcctgg gcaactctgg agggctctcc caccgaggcg agcggtacgc 6540

cgttgtacgc gggcaagaat gtactggaca actcgaaagg cacaatggac caggagttgc 6600

ttacacccga gttcaactac acctacacgg agagcacgag caacacgacg acgcacggcc 6660

tcaaactcgg cgtgaagacc accgcgacca tgaagttccc tatcgctcaa ggctcgatgg 6720

aggcgagcac cgagtacaat ttccagaact cctccaccga taccaagacc aaacaagtgt 6780

cttacaagtc tccgagccag aagattaagg ttcctgcggg caagacgtac cgcgtgctgg 6840

cgtacctgaa caccggctct atctctggcg aggctaacct gtacgcgaac gtcggcggca 6900

tcgcgtggcg ggtctcgcca ggctatccta acggcggcgg cgtgaacatc ggcgctgtcc 6960

tgaccaagtg ccagcagaag ggttggggcg acttccgcaa cttccagccc tccgggcgcg 7020

acgtcatcgt gaagggtcag ggcaccttca agtccaacta cggcaccgac ttcatcctta 7080

agattgagga catcaccgac agcaagctcc gcaacaacaa cggctccggg acggtcgtac 7140

aggagatcaa ggtgccactc atccgcaccg agatttgata ggggtccccg gtccgatgaa 7200

gtgccatcat gccatggatg cggggtgaaa gctcgcggcg tcgaatataa tctccggttc 7260

cagtttcagc tactatggcg actcgtgtcg tgtgtgtgtg gttactctgc ttttgtatgt 7320

ttggtaatgg tgtgtgcgct gttgtccaga gtttcatggt ggtactgctt cctagcagtg 7380

ttgtgtacta gtctcggtac tttgcctgta tgttgagctc ggctcagtat gttctgggag 7440

tgaataaata aaaataaaaa aaaccagata ttgtagtata ctaactgccg ttgctctgtt 7500

tcatccacat acacagaatc ctatgaactg atctttgtgg ggacttggga gccatctgct 7560

cggatcttct tcatgggatt ctctcaattt ctcctcattt ttctaaggct gtgtgtttag 7620

atgtagggag aaaagttttt ggattgtaca tcgtgttggg tactaattta gtctactact 7680

ccgtccgtga atagatgaca ttttctttcg gtgttgttcg tcgtgccaca aagttttgaa 7740

tttatttata tgcaatcctg caggtgttta aacacctgca ggtctgcatg ttcagttagc 7800

acaagcaggt tgcagcttca ccaaacacat acagtcggcc attgctgctt caccaaacat 7860

aaacactacc tgttggagct acaccaaaca cttgcactga ccaaagaaca ttaatagatc 7920

atcaggactg ttcaagtaat cacgcatgac aagatagaaa gcagcaggtc cccttccttc 7980

tcaaagtagc ctgcagcttc attctttggt tcaccattac ataaacagca aaaccagaaa 8040

[0010]

tagcagacaa taattcctcc tctaggtaaa taaccagaca cagtaatacc ctcacaagta 8100

ccacttatta ggacagtaca atacaaatga tagcaagggg cagatcaaga atcacaacac 8160

agaagccaca aaacatgata agcgcagcag accaaaagct tcttctcaaa gggcgcccgg 8220

accgtcagtt gttggtctgg ctgtacatga catccgactt ctgaatccac ttgtgtagca 8280

ccttcaggtc cttcccgccg accgtcgccc agagctctac gctagcatct ttcgtcgggt 8340

aggtcccgcc gttagggttc ttgagattaa acgtaatctg gaacaagaac gggctcggct 8400

tgctgacggt ctggaccttc ttgccgttca cgcggatctt gtagctcgac acgttgttgt 8460

agaagatgtc gggcagcttg tacaggctga ggccggagta caggtttgga ttctctgaga 8520

gataccacca gcctgagaat ttgtgggcgt cgatcataac tttctcgatc tcggactcgc 8580

caagctcagc gactttcact ttgaggttgt cgttcttctc gtcaacggcg tagagctcca 8640

taggcgtgat cgcagtgatg ctgccgtacg tcaccgtccg cttcccgttg gcgtccagag 8700

gcggcgcagg gatgatgcta ccgaggcggc cgttgatctt ccactggtat cggatcttgc 8760

tactcggcac gcgagtgaac gtggcaccga tcaccatctc gtcgttggag ccgaaggacc 8820

acttctcaaa gatgtgtttc ttctgcaggt tctcgttggt cttccactcg atcacggaga 8880

catcgtcgaa gtgcaggttg gcgttcccgt tattcttcag gccgatgatc ttgaagtatt 8940

cagggttatt gaacgtgttg aaggagaact ccgctatctt ccacttcccg ccggtcacct 9000

tcccggaaac cttcgcgcct tgcccgttgc cggagctgtt gtcagcgtag aagacgacct 9060

cgttgctccc agtggtgctg gcggtgcgca cgtacgcccg cacagtgtag gaggtgtatg 9120

gcttcagctg cgggtttgac atcgccgtgc cgtgcccgtc agtgccgatc cgcccgcgct 9180

tcttgccggt gtagcctccg gattcttggt aggtgtagta ccacaggttc tctgaggtct 9240

cgaagtcgta gtacttgatc gggacgtgta gcgtgatctt catgccgcgc ttccacttca 9300

cgtcgtacac cgtcttgccg ggcatctggt tcagctggcg ctcgatttct ttcttcgtgt 9360

tctcgtccgt gatgaggttg atggaaggct catcaatgaa gatgtccttc tcaccctggt 9420

ccgtgtagta cagtctgccg tccttctcct gagcgttaaa cgccttcttg atggcctcct 9480

tgatggtgat ctccggagtc ttgtcctccg gatcgttcat gttcttcgcc gcgacccggc 9540

[0011] gctcgaggct atccttgccc gtgccgaggt taagagtaag gctcccactg acagcgtcaa 9600

tgtttgtccg gatcgggtcc cactcgcctc cgggtatcac ctggcctttc tcgtcgagga 9660

taccgtactg gccgcggttc tgcgtagtct cgatgttgag aatctccgtg cccgcctgga 9720

tcttgtccag ctgctcggcg ttgatcgcta tcttcacggt gcccgcctcg ttggccttgt 9780

ctagggagat aggagcctgg cccttctgcg gataggtgtc gccggcaccg agcgagttgc 9840

cgatctggtt agggccggcg gtgatcgtgg tgatgctgtc gcctgagttc tggaagacga 9900

agttggtggt cggcttcagg tcgtagatgg gcgcggtgcc accattgtaa tagcgcacgt 9960

tcgcgttgag atacgccctc tcggcagtgt tgatccctat ctgcgaactc caggtagtag 10020

agtcggtgtc ggccacactt gtggacgacg accagctgtg ggtgtacttt ggtgagattg 10080

agaaactgaa gcccttgtcg ctgaagccca ggctgccgcc gatctcgacg gtgttggtcg 10140

tggtgtcggt cttagttgta gtcttgctct ttgtatccgc gttgccctcc gtcaccgtat 10200

cgttcttgct gaagtggagc ttctccattc cgacgccaac ggagggatag gcggccacta 10260

gaggatcgcg cgcctcatac ttcgtagcag cgggcatgtg cccagtcacc ttctcgaagt 10320

cggtgtacgg gtctttgacc gtacgggcgt ggtaagggtt gctcacgtac ttcttgtagc 10380

cttctgcact gtaggcgtcg ttccacggca cgatctgctg gttacggaag gtgtatcctt 10440

tctcttccca ttcatcaggg atgcagtcgt tgtcggtgtc caccggcgtg gacatcgact 10500

gcttctcgcc gttctcttgc tggcggtcga agaggttgta gttcgggaag aagctctggg 10560

tctccttctc cgcgagagag ttcgccttct cgctgaaatt cgggctcagt atgtacttct 10620

ccgggatctg ttccttctgc gcgttgttca tcgaccagaa gagctgtagg tccggcaggg 10680

tgttggaggt gttcctgtac tcgatcttaa tctcgtagac ctggtttgcc tctagtttga 10740

ggttcttctg gatgctcgcc tggttgatga ccgtctcgcc attgatctgg aggattacgt 10800

tctcgtcgga ggatgtggag aggcggtact cgccggtctg cgggctcttc aggttgccca 10860

tccaccgaat ggactggatc tgctgggcgt ccgtgttgat gcgagccttg ttcatgaggt 10920

tggacttctc gcccacctgg atgaacatga gctccttgaa ggttgagtcc ttgaagtaga 10980

agccgaccag gccgatgacc gtcgcttgct cactcttgga ggagacaatg ttctgcatgg 11040

tggtggccgg ccaagtaacg gtccgctacc ctgcaagagg tagcaaaaaa ggggtatcag 11100

[0012]

ttaacagcaa gtgtatcctg ctagatagta gctgtacaag ggaaccagta agcatcgtaa 11160

acataaaagt tttgaaggca tatcaactga acctttatat ttgtgcatct ataagtcaat 11220

aaaaacaaca tatgtacaga gcttactgcc aggcaaaagt gggattcatt tcaccgacta 11280

ggctaatgtt gtactccctc cgttccaaat tgtaggtcgt tttgactttt ctagattcat 11340

agatattatt atgcacctag acatacacta tatctagatg cataataata tctatgaacc 11400

tacaaaagtc aaaacgacct acaatttgga acggagagag taagaaataa tctgataact 11460

tgcggactgt tgtttccaac atttataaaa atgtgtaaag taccataacc aaacattcgt 11520

ataactaaac atgataggaa aagactagca ttgctttgaa aaagtagtgt acatgtactg 11580

gccaatctaa caagcttttt tgttgtctaa aatgtgacct gcagagcaac aaaaatcaca 11640

tgctgaactt ttcagcctaa catttggtgc catgaaacat cactaagttg tcactaattt 11700

tgggtggtat gtgctcaata gctattcatg acaaggaaac atcctaacat gcagatatgc 11760

tttccaaata gctctctccg aatgaaccac acacggattt ttacactctg gtagttcaat 11820

cacaccaaat taactatccg cgactttcat ccaaccatgt taccagttac cgcaactatc 11880

tggacttgct agacagagca tcacgaagct ctcccagact cccagtcaag caggaaacta 11940

gaacgtcgga gctgggaagt agtcaagcag tcacacccca agggctcgtg catcgccagc 12000

aacacgtaag cgcattcagg cacatcacag tcaccattcc taggtacgta gctcagagag 12060

cctcctcgca cggcagtccc gcaaacacac atcaggcgtg cgcacaaaat cagacgcatc 12120

ggcacgcaga aacgctacag atcaggaaca ggacggagtt catcaagcac agacgtcaga 12180

cgaacaccct agcaccaacc acgaagcacg atccgctggc ggatcgcgcg gtacccgccc 12240

cggatctggc gggagcaccg gaggcaagtg accagaacgc atgagcaaac cgcagatctc 12300

gagccaggcc gctcagatct gagcgccaaa cactcgaaaa atgctggagc aggagctagt 12360

gcgtggggag atcgcgagta gaggggctcc agggagcgga ggggaggggg aggaggagat 12420

taccggggag gccggcctgc tgcagagtac agaaagcact tgcttgatca ctagcgcgaa 12480

gcagaggtgt gcctgccctt agtattaact gatcactaag cgcttgtgat ggttcgtggt 12540

ggcgcttgat tgttgcattt ataggagaac catcggcgca gtgccgatta ttgtaatagc 12600

[0013] agtgttgttg tgtgagttta cattcccgtg agcatgagtg catgtgaggg cgattattaa 12660

ttagatggct gatcaatgca gaacagcgca agtggccaag attgctccac tggtggatgc 12720

atgttgatgt ttgttctcgc ttgatggttg atcatttta ttcagtttag gacgaacttg 12780

tcatatgggt tggctgcttg tatctagtaa cgtgatcgag tgctaaacat cagcagaggt 12840

atcatggtga tgcatggacg gtggacgccc aagttgttga acagttgaag tatttttttt 12900

tctgcacttc acgggatcca agcgcagagc tatgcataat tgcatatagc ggtgggtacg 12960

ggtgcaccct tgcatggtaa aactgaatgc gctcagaagg caattgcaat cactaaaatt 13020

tgctttagct ctgttcctga tcgggtcaag gtttattatg ttcagttgga acattcaaag 13080

ttagaggctt gaatttgctt aaaaagcatt cccacaaaca acggtgggtg ccctttttgt 13140

atgacgtact gttggctaga tggttccgct tgtttatgaa aaaagagtgt actaataaat 13200

ttacccgaac tcttcactac cgcagataac tcttttgccg agtgcttcat gcacttcaca 13260

aagtccagaa aacacttggc aagctccaag cttaagaaac ataaatgacg tgcataagtt 13320

caaaaatagt ttaatacaag actaagatgt ccaaaagaac ggtaaattat attaaaataa 13380

tacttcttat aatagatcaa tgctatcgaa tagcccactt cactctttaa gcatacataa 13440

attttcaatt atatcataaa atttctacgt cctactgcgt ttcaaccata tttcagcatg 13500

acaattatag taatacaaaa caagaattga attgcttgaa tgtaaatgtt caaagtaaag 13560

aaggattatt aatatgatga tgttttatcg agatatcaga gagtcaacac tcctcattga 13620

tccttgttag agcacccatg taagtgtgtc gctccccctt catccgtgca agcaggatca 13680

aatgctctct agaaggaacg tgggcatcta agagagggat gaatccgaac ataactggga 13740

tttttggagg attctgatga aaccatttac cctaacttga gataactgga gtaaaagatc 13800

cttactgtcc accatttctt gtgatgggtt aaaatccctc ttgccggaga gacctatctc 13860

tatcaggtga tatgcctggt agctgtttcc ttcttcccaa tctggcaggc ccttgttcgt 13920

cactgctgac gtctttttcc tcattattgg aggatgagtc actgcaagct gtaaagcttg 13980

tattattgct ggtggaggcc ccaccttcac atgctgagca tttatggttg tcggccaata 14040

atttcttcag ctgtttgcaa agcaataatt ttgtagatgt ccctacatca actttggcat 14100

gtgcaatgct ttcttcaaag gaagataaga tgtcaacatc ttgtctggag attggtgctc 14160

[0014]

cgtagtgact catgatcaat acctttttct gtgcgtaatt gatcttgatt tttgtcttcc 14220

cgtcgatggc gcgccaagaa gaacgattgg caaacagcta ttatgggtat tatgggtagg 14280

cctgcccaaa ctagggataa cagggtaata ggtctcacgc ggcaaatcct accacctcat 14340

ttaaatagag tgaggttgat ttgcggccgc tataacttcg tataatgtat gctatacgaa 14400

gttatgtcga ctcgtggtgg ccgcatcgat cgtgaagttt ctcatctaag cccccatttg 14460

gacgtgaatg tagacacgtc gaaataaaga tttccgaatt agaataattt gtttattgct 14520

ttcgcctata aatacgacgg atcgtaattt gtcgttttat caaaatgtac tttcatttta 14580

taataacgct gcggacatct acatttttga attgaaaaaa aattggtaat tactctttct 14640

ttttctccat attgaccatc atactcattg ctgatccatg ta 14682

<210> 10
<211> 16861
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 对应于5'基因组侧接DNA核苷酸序列、事件MON95275中的插入T-DNA核苷酸序列和3'基因组侧接核苷酸序列的contig核苷酸序列的16,861个核苷酸的序列。

<400> 10

[0015]

gaacatttgg cggaagaaca tgttttaagg gctagtttgg aagctcaatt ttcccaagag 60

attcttattt tcccaaggga aaataaacta atttcccttg tgaaaatgaa aatcccttgg 120

aataacgtgg ttcccaaact aaacctaagg gctttttttt atcattgtgt caaacagttt 180

accagctaat tttagtacct taacatttaa ataggtcagc taaaaaagta gctaattgtt 240

agccgaagaa ctgataaatt atttgtccat tagctatttg accttactaa tagatattaa 300

taaatcatat aaatagtcaa gtcttcaaat ataccctgac taatatttgc tagttaatta 360

tttatttttct gattaattat tagccactgc taaacaataa gtcagtacga cccaaacaag 420

gcctagttac tactcctatc cataaaaaaa agttgtttga ccattttgac gccaaattta 480

accggcttat attaccaaaa tatttgaaaa aacattaaaa acagttgctg gttaaagtaa 540

attgtatgat aaactaaatc ggaatgaaaa taaataatag ttataatttt ttaataagat 600

gagccagtca aatttgacaa aaagttaaac cgatattctt tctggaacgg aaggagtaga 660

ctgtgttaat gttatgatat tgtgagcaag agagaagggg gtcgatagca acgacccaag 720

tgagtgggag gaggaaggtt ggggcgacga tgttgtgggg agggtgaagg atgatctaaa 780

taatattgtt cgctggattt gagtgagtaa gagcaacccc aacagtttag atataaatcc 840

tagctaaatt tagagtcttg ccaagagatt tttatttttt caaaaaaata gtttatttt 900

ctttgggaaa tagaaatctc ttggaacaat agtgttttta aactagtctt ggcgtttgta 960

aagaagatag atagactcca atttttatg aagacgggtc aaaactcaac aaatcaacgg 1020

ataccgtccc ttttttggcg catgaagttt caggtctgta gcagccggcc cgatcaaaca 1080

ctgatagttt cccggtaact ataacggtcc taaggtagcg acttaggctg agcccgggca 1140

ggcctaccca taatacccat aatagctgtt tgccaatcgt tcttcttggc gcgccgttgt 1200

caatcaattg gcaagtcata aaatgcatta aaaaatattt tcatactcaa ctacaaatcc 1260

atgagtataa ctataattat aaagcaatga ttagaatctg acaaggattc tggaaaatta 1320

cataaaggaa agttcataaa tgtctaaaac acaagaggac atacttgtat tcagtaacat 1380

ttgcagcttt tctaggtctg aaaatatatt tgttgcctag tgaataagca taatggtaca 1440

actacaagtg ttttactcct catattaact tcggtcatta gaggccacga tttgacacat 1500

ttttactcaa aacaaaatgt ttgcatatct cttataattt caaattcaac acacaacaaa 1560

taagagaaaa aacaaataat attaatttga gaatgaacaa aaggaccata tcattcatta 1620

actcttctcc atccatttcc atttcacagt tcgatagcga aaaccgaata aaaaacacag 1680

taaattacaa gcacaacaaa tggtacaaga aaaacagttt tcccaatgcc ataatactca 1740

aactcagtag gattctggtg tgtgcgcaat gaaactgatg cattgaactt gacgaacgtt 1800

gtcgaaaccg atgatacgaa cgaaagctag gcctcagcga gtaccgctgg cgatctaatc 1860

catgatatcg tgaacatcat ctacattcaa attcttatga gctttcttaa gggcatctgc 1920

agcatttttc atagaatcta atacagcagt atttgtgcta gctccttcga gggcttccct 1980

ctgcatttca atagttgtaa gggttccatc tatttgtagt tgggtctttt ccaatcgttt 2040

cttctttttg agggcttgga gtgcaactct tttatttttc gacgcatttt tctttgcgct 2100

cctgcaggcg gccgcgtgga tgaggagtta atcggtcgtg tgagagtagt gatcgagtgg 2160

[0016] atgtcgtcga gagtgatgag tgttgatgtt gttagtgata tgtggtagaa ggtatcgtga 2220

taaagcgtta acgcgatcgc agtacttgca aagaaaaatg cgtcgaaaaa taaaagagtt 2280

gcactccaag ccctcaaaaa gaagaaacga ttggaaaaga cccaactaca aatagatgga 2340

acccttacaa ctattgaaat gcagagggaa gccctcgaag gagctagcac aaatactgct 2400

gtattagatt ctatgaaaaa tgctgcagat gcccttaaga aagctcataa gaatttgaat 2460

gtagatgatg ttcacgatat catggatggt atcgcacagc gactgctgag ggacgtcgag 2520

ctcccgcttg gtatctgcat tacaatgaaa tgagcaaaga ctatgtgagt aacactggtc 2580

aacactaggg agaaggcatc gagcaagata cgtatgtaaa gagaagcaat atagtgtcag 2640

ttggtagata ctagatacca tcaggaggta aggagagcaa caaaaaggaa actctttatt 2700

tttaaatttt gttacaacaa acaagcagat caatgcatca aaatactgtc agtacttatt 2760

tcttcagaca acaatattta aaacaagtgc atctgatctt gacttatggt cacaataaag 2820

gagcagagat aaacatcaaa atttcgtcat ttatatttat tccttcaggc gttaacaatt 2880

taacagcaca caaacaaaaa cagaatagga atatctaatt ttggcaaata ataagctctg 2940

cagacgaaca aattattata gtatcgccta taatatgaat ccctatacta ttgacccatg 3000

tagtatgaag cctgtgccta aattaacagc aaacttctga atccaagtgc cctataacac 3060

caacatgtgc ttaaataaat accgctaagc accaaattac acatttctcg tattgctgtg 3120

taggttctat cttcgtttcg tactaccatg tccctatatt ttgctgctac aaaggacggc 3180

aagtaatcag cacaggcaga acacgatttc agagtgtaat tctagatcca gctaaaccac 3240

tctcagcaat caccacacaa gagagcattc agagaaacgt ggcagtaaca aaggcagagg 3300

gcggagtgag cgcgtaccga agacggtcgt acggaaaata gagagagata gatttgtaga 3360

gagagactgg tgatttcagc gtgtcctctc caaatgaaat gaacttcctt atatagagga 3420

agagtcttgc gaaggatagt gggattgtgc gtcatccctt acgtcagtgg agatatcaca 3480

tcaatccact tgctttgaag acgtggttgg aacgtcttct ttttccacga tgctcctcgt 3540

gggtgggggt ccatctttgg gaccactgtc ggcagaggca tcttgaacga tagcctttcc 3600

tttatcgcaa tgatggactt tgtaggagcc accttccttt tctactgtcc tttccatgaa 3660

gtgacagata gatgggcaat ggaatccgag gaggtttcct gatattaccc tttgttgaaa 3720

[0017]

agtctcaata gccctttggt cttctgagac tgtatctttg atattcttgg agtagacgag 3780

agtgtcgtgc tccaccatgt tgacgaagat tttcttcttg tcattgagtc gtaaaagact 3840

ctgtatgaac tgtccgccag tcttcacggc gagttctgtt agatcctcga tctgaatttt 3900

tgactccttg ctgatggacg gtgtggaggg aggtgctttc gtgcttggcg gcatgcacgg 3960

gtaatcggca acgcatgtgt gctttgagcg ttgcctggtt gtcatgggat acaggacaac 4020

aaccatcgtc atgtggagat cgatcgagat ataggatcgg agcaagttga caaatcatgt 4080

caaaatcact caacgaggta gcatgttgta taaacagatc aatgcagaaa tacattagtg 4140

ctagctggaa ttgttccgat cagctggcgc tattattatt ttatcgaaac tgatgcgtgt 4200

gcgtgctcgc cttattttgt gttctgcggg ggcggctccc gcgaatacct attatttctg 4260

tgagcgctcc cttcaaaagt gacatgattt tatatatccc tctacgatac gacgaccaga 4320

tcaagctacc actaccaccg aaatcaggac ctctgctaac cggtggccca gaccggacaa 4380

aagttattgc attgtatatg ggtagggttt atgtccattt tacatcgcgc atagtacgca 4440

caatttctgt tggcccatca atatataccg agtgtgctgc agcctatagt gatagagttt 4500

tacttaattc taagcctagg atccgaacag tgattggaaa tccttagtta cagtctgaca 4560

gtataaaggt cactctcact acctggtagt agagccatga cccggtgctg atatcactat 4620

caggtacagc cataaccaca gtgctagtgg aaatatcact acgtactagg ccaatctata 4680

atctgatgag aacacatata gttgacatag tcgatacgta cccatgttat gagtcccgag 4740

tgactgtcaa ggacatgatt tgagttttgg taagtgtgtg ttggacaaat cgaagcatga 4800

gtagggttca tggcctgtga tttgtactag tctaactaac taaattatcg tgtacaaccg 4860

ttgatctgag agggtcccgc gctgcaaatc tattgtaata ctccctgtcg taatactgtg 4920

ttaatttgtg ctcagtcgga cggctcagac tttacggtga tataaacctt tactgagctg 4980

aactcgacct ggagatcgaa tcgaccccgc aggtgttccg aagcgtacca cggcgagcgt 5040

taggtctaag caaaagccac acccttcaca gaacgaagga gtttcgcgaa gtcacgctga 5100

tttaaaaaga gcgggccact ttttccactc ttggtcaaca gaaaaaggcg gacgagttca 5160

gatttaaggc cagctgcacg ccgatcagca gattcgacgt tacccgcgga gagaaggctg 5220

[0018] cctgctactt cccagtcgaa agtggtgtag ttcaagtgat ctctaaagct aaggctccgc 5280

tggtcctagt cgttaattac cgagcagctc tccggcgtac agaaccacga agttacttct 5340

tgaggtgaag cgtaagtggt ggtgagggta agtagttgga agcagaagcc ttaagtgata 5400

caatctggct tccaccttgt cggaactcgt taaaatttcc cttgattaca atataagtac 5460

ctgcctgatc gttctggtag cctgatcgat ttttatttt gggctacggg caattgctcg 5520

caatttattg aagtcgcacg ggcgcgaaag aagacgttgt tctctctgct tgctagaagc 5580

cgcggataag cgattctatc cgatatttaa gacccgtgta gaccagcaga cgtgagtggg 5640

ccgtttccag aaaccgtctc tccttgcgac gatagatccg atagtaagta acttcacccc 5700

tgatcaacgg cgtagtcgcc tgtctggttc ggatctgtat agatttggcg gattccgctt 5760

gcgaaatctt tagcagctta ggtccggagc ccccggtgga tctggctgtt cagcggcacg 5820

gtccaatctc cttagctcct ctgtgaacag cagtcgaact ctaagattct tgatacgcgc 5880

aacacgggcc ttggcgagcc tggggataac tcgcgaggac gctctcgccg cgctaaagcg 5940

tgcgatcaca ccgctccgac aagtgacttt gccaaatcta gaaagagaga ctacactgct 6000

tgccggtgca gtcttgatcc accttggagg ggctgacgct aactaactaa ggcgcgcctg 6060

cctactaggc ctcgaccctt gttcgtcact gctgacgtct ttttctccat tattggagga 6120

tgagtcactg caagctgtaa agcttgtatt attgctagtg gaggccccac ctgcacatgc 6180

cgagcaatta tgattgtcgg ccagtagctt tttgagctgt ttgcagagca ataacttagt 6240

ggatgtcccc accattacat cgttattgat gatgctttct tcaaaggaag ataagatgct 6300

gacatcctgt ctggagattg tcgctccata gtgactcgtg atcaatactc tttcatgtga 6360

gtaattgatt tttatctttg tttctccgtt gatggcctac taggccaaat ggatgaaaca 6420

acttggacca atcagagatg gccacgtcag ctcccgatcg tcgtaaccga ccaaacccga 6480

tcgataacgg tttaggctcc aatacaccgt cggtaccacc cggtcgctat catctgcccc 6540

cgtcccaacg ctattggtat cgtccgcccc tatatcggtc ggtagcccag tccaccgtcg 6600

gggccaatcg tcccctgctg cgtccgctcg tgtcggtacc gatcgccaaa aacgccacgt 6660

caacggcact gcggtaccga ccgccgctgg caccggcctt agcgggccac acgaccgatc 6720

gctgttgtac ggacgtagag gtgaatcatg cgattgaatt ttcgctagag gaaagttatc 6780

[0019]

atcttattat ctccaaccct ccttcctacg gctggatccg acgaaaattt accctggacg 6840

gtgccagtaa caattgcagg tctcactcac gtgctaaatc cagcaatcaa acacgaagga 6900

atatacgtga tctggccaga acatgcaaga gaataataca gtagtgttag agtacgaaac 6960

ctacacgatt caacgaatta atcaatgggt tcacgttcac gggtatgctc gcgcacgtcc 7020

aaaatccaac gacattttta taagcggcat gatccagacg ggccagctcg agcaccacat 7080

ggcgtggctc catctcgcat cccccatcac cgctataaat accattggcc atgcacaccc 7140

gcactcccac acagcacaag cagcagcagc agcagcagct cgatcgaact agcttagcta 7200

ctacgtgcgc gtgcaacaag cagctcgatc gatcgccctc acggtaattt cttctcccaa 7260

aataaaccta atctttaatc tgttgcctgt ctactcttcc tatctgttgc taaaaatttg 7320

aatttggtat gtgcaggagg acttaattaa gggacccacc gccatgtcat ccacggacgt 7380

gcaagagcgc ctgcgggact tggcgcgcga agacgaggcg ggaacgttca acgaggcttg 7440

gaacaccaac ttcaagccgt cggacgagca gcaattcagc tactcgccga cggagggaat 7500

tgtcttcctc acgccgccta agaacgtcat cggtgagcgg cgcatctccc agtacaaggt 7560

gaacaatgcc tgggcaactc tggagggctc tcccaccgag gcgagcggta cgccgttgta 7620

cgcgggcaag aatgtactgg acaactcgaa aggcacaatg gaccaggagt tgcttacacc 7680

cgagttcaac tacacctaca cggagagcac gagcaacacg acgacgcacg gcctcaaact 7740

cggcgtgaag accaccgcga ccatgaagtt ccctatcgct caaggctcga tggaggcgag 7800

caccgagtac aatttccaga actcctccac cgataccaag accaaacaag tgtcttacaa 7860

gtctccgagc cagaagatta aggttcctgc gggcaagacg taccgcgtgc tggcgtacct 7920

gaacaccggc tctatctctg gcgaggctaa cctgtacgcg aacgtcggcg gcatcgcgtg 7980

gcgggtctcg ccaggctatc ctaacggcgg cggcgtgaac atcggcgctg tcctgaccaa 8040

gtgccagcag aagggttggg gcgacttccg caacttccag ccctccgggc gcgacgtcat 8100

cgtgaagggt cagggcacct tcaagtccaa ctacggcacc gacttcatcc ttaagattga 8160

ggacatcacc gacagcaagc tccgcaacaa caacggctcc gggacggtcg tacaggagat 8220

caaggtgcca ctcatccgca ccgagatttg ataggggtcc ccggtccgat gaagtgccat 8280

[0020] catgccatgg atgcggggtg aaagctcgcg gcgtcgaata taatctccgg ttccagtttc 8340

agctactatg gcgactcgtg tcgtgtgtgt gtggttactc tgcttttgta tgtttggtaa 8400

tggtgtgtgc gctgttgtcc agagtttcat ggtggtactg cttcctagca gtgttgtgta 8460

ctagtctcgg tactttgcct gtatgttgag ctcggctcag tatgttctgg gagtgaataa 8520

ataaaaataa aaaaaaccag atattgtagt atactaactg ccgttgctct gtttcatcca 8580

catacacaga atcctatgaa ctgatctttg tggggacttg ggagccatct gctcggatct 8640

tcttcatggg attctctcaa tttctcctca tttttctaag gctgtgtgtt tagatgtagg 8700

gagaaaagtt tttggattgt acatcgtgtt gggtactaat ttagtctact actccgtccg 8760

tgaatagatg acattttctt tcggtgttgt tcgtcgtgcc acaaagtttt gaatttattt 8820

atatgcaatc ctgcaggtgt ttaaacacct gcaggtctgc atgttcagtt agcacaagca 8880

ggttgcagct tcaccaaaca catacagtcg gccattgctg cttcaccaaa cataaacact 8940

acctgttgga gctacaccaa acacttgcac tgaccaaaga acattaatag atcatcagga 9000

ctgttcaagt aatcacgcat gacaagatag aaagcagcag gtccccttcc ttctcaaagt 9060

agcctgcagc ttcattcttt ggttcaccat tacataaaca gcaaaaccag aaatagcaga 9120

caataattcc tcctctaggt aaataaccag acacagtaat accctcacaa gtaccactta 9180

ttaggacagt acaatacaaa tgatagcaag gggcagatca agaatcacaa cacagaagcc 9240

acaaaacatg ataagcgcag cagaccaaaa gcttcttctc aaagggcgcc cggaccgtca 9300

gttgttggtc tggctgtaca tgacatccga cttctgaatc cacttgtgta gcaccttcag 9360

gtccttcccg ccgaccgtcg cccagagctc tacgctagca tctttcgtcg ggtaggtccc 9420

gccgttaggg ttcttgagat taaacgtaat ctggaacaag aacgggctcg gcttgctgac 9480

ggtctggacc ttcttgccgt tcacgcggat cttgtagctc gacacgttgt tgtagaagat 9540

gtcgggcagc ttgtacaggc tgaggccgga gtacaggttt ggattctctg agagatacca 9600

ccagcctgag aatttgtggg cgtcgatcat aactttctcg atctcggact cgccaagctc 9660

agcgactttc actttgaggt tgtcgttctt ctcgtcaacg gcgtagagct ccataggcgt 9720

gatcgcagtg atgctgccgt acgtcaccgt ccgcttcccg ttggcgtcca gaggcggcgc 9780

agggatgatg ctaccgaggc ggccgttgat cttccactgg tatcggatct tgctactcgg 9840

[0021]

cacgcgagtg aacgtggcac cgatcaccat ctcgtcgttg gagccgaagg accacttctc 9900

aaagatgtgt ttcttctgca ggttctcgtt ggtcttccac tcgatcacgg agacatcgtc 9960

gaagtgcagg ttggcgttcc cgttattctt caggccgatg atcttgaagt attcagggtt 10020

attgaacgtg ttgaaggaga actccgctat cttccacttc ccgccggtca ccttcccgga 10080

aaccttcgcg ccttgcccgt tgccggagct gttgtcagcg tagaagacga cctcgttgct 10140

cccagtggtg ctggcggtgc gcacgtacgc ccgcacagtg taggaggtgt atggcttcag 10200

ctgcgggttt gacatcgccg tgccgtgccc gtcagtgccg atccgcccgc gcttcttgcc 10260

ggtgtagcct ccggattctt ggtaggtgta gtaccacagg ttctctgagg tctcgaagtc 10320

gtagtacttg atcgggacgt gtagcgtgat cttcatgccg cgcttccact tcacgtcgta 10380

caccgtcttg ccgggcatct ggttcagctg gcgctcgatt tctttcttcg tgttctcgtc 10440

cgtgatgagg ttgatggaag gctcatcaat gaagatgtcc ttctcaccct ggtccgtgta 10500

gtacagtctg ccgtccttct cctgagcgtt aaacgccttc ttgatggcct ccttgatggt 10560

gatctccgga gtcttgtcct ccggatcgtt catgttcttc gccgcgaccc ggcgctcgag 10620

gctatccttg cccgtgccga ggttaagagt aaggctccca ctgacagcgt caatgtttgt 10680

ccggatcggg tcccactcgc ctccgggtat cacctggcct ttctcgtcga ggataccgta 10740

ctggccgcgg ttctgcgtag tctcgatgtt gagaatctcc gtgcccgcct ggatcttgtc 10800

cagctgctcg gcgttgatcg ctatcttcac ggtgcccgcc tcgttggcct tgtctaggga 10860

gataggagcc tggcccttct gcggataggt gtcgccggca ccgagcgagt tgccgatctg 10920

gttagggccg gcggtgatcg tggtgatgct gtcgcctgag ttctggaaga cgaagttggt 10980

ggtcggcttc aggtcgtaga tgggcgcggt gccaccattg taatagcgca cgttcgcgtt 11040

gagatacgcc ctctcggcag tgttgatccc tatctgcgaa ctccaggtag tagagtcggt 11100

gtcggccaca cttgtggacg acgaccagct gtgggtgtac tttggtgaga ttgagaaact 11160

gaagcccttg tcgctgaagc ccaggctgcc gccgatctcg acggtgttgg tcgtggtgtc 11220

ggtcttagtt gtagtcttgc tctttgtatc cgcgttgccc tccgtcaccg tatcgttctt 11280

gctgaagtgg agcttctcca ttccgacgcc aacggaggga taggcggcca ctagaggatc 11340

[0022] gcgcgcctca tacttcgtag cagcgggcat gtgcccagtc accttctcga agtcggtgta 11400

cgggtctttg accgtacggg cgtggtaagg gttgctcacg tacttcttgt agccttctgc 11460

actgtaggcg tcgttccacg gcacgatctg ctggttacgg aaggtgtatc ctttctcttc 11520

ccattcatca gggatgcagt cgttgtcggt gtccaccggc gtggacatcg actgcttctc 11580

gccgttctct tgctggcggt cgaagaggtt gtagttcggg aagaagctct gggtctcctt 11640

ctccgcgaga gagttcgcct tctcgctgaa attcgggctc agtatgtact tctccgggat 11700

ctgttccttc tgcgcgttgt tcatcgacca gaagagctgt aggtccggca gggtgttgga 11760

ggtgttcctg tactcgatct taatctcgta gacctggttt gcctctagtt tgaggttctt 11820

ctggatgctc gcctggttga tgaccgtctc gccattgatc tggaggatta cgttctcgtc 11880

ggaggatgtg gagaggcggt actcgccggt ctgcgggctc ttcaggttgc ccatccaccg 11940

aatggactgg atctgctggg cgtccgtgtt gatgcgagcc ttgttcatga ggttggactt 12000

ctcgcccacc tggatgaaca tgagctcctt gaaggttgag tccttgaagt agaagccgac 12060

caggccgatg accgtcgctt gctcactctt ggaggagaca atgttctgca tggtggtggc 12120

cggccaagta acggtccgct accctgcaag aggtagcaaa aaaggggtat cagttaacag 12180

caagtgtatc ctgctagata gtagctgtac aagggaacca gtaagcatcg taaacataaa 12240

agttttgaag gcatatcaac tgaaccttta tatttgtgca tctataagtc aataaaaaca 12300

acatatgtac agagcttact gccaggcaaa agtgggattc atttcaccga ctaggctaat 12360

gttgtactcc ctccgttcca aattgtaggt cgttttgact tttctagatt catagatatt 12420

attatgcacc tagacataca ctatatctag atgcataata atatctatga acctacaaaa 12480

gtcaaaacga cctacaattt ggaacggaga gagtaagaaa taatctgata acttgcggac 12540

tgttgtttcc aacatttata aaaatgtgta aagtaccata accaaacatt cgtataacta 12600

aacatgatag gaaaagacta gcattgcttt gaaaaagtag tgtacatgta ctggccaatc 12660

taacaagctt ttttgttgtc taaaatgtga cctgcagagc aacaaaaatc acatgctgaa 12720

cttttcagcc taacatttgg tgccatgaaa catcactaag ttgtcactaa ttttgggtgg 12780

tatgtgctca atagctattc atgacaagga aacatcctaa catgcagata tgctttccaa 12840

atagctctct ccgaatgaac cacacacgga tttttacact ctggtagttc aatcacacca 12900

[0023]

aattaactat ccgcgacttt catccaacca tgttaccagt taccgcaact atctggactt 12960

gctagacaga gcatcacgaa gctctcccag actcccagtc aagcaggaaa ctagaacgtc 13020

ggagctggga agtagtcaag cagtcacacc ccaagggctc gtgcatcgcc agcaacacgt 13080

aagcgcattc aggcacatca cagtcaccat tcctaggtac gtagctcaga gagcctcctc 13140

gcacggcagt cccgcaaaca cacatcaggc gtgcgcacaa aatcagacgc atcggcacgc 13200

agaaacgcta cagatcagga acaggacgga gttcatcaag cacagacgtc agacgaacac 13260

cctagcacca accacgaagc acgatccgct ggcggatcgc gcggtacccg ccccggatct 13320

ggcgggagca ccggaggcaa gtgaccagaa cgcatgagca aaccgcagat ctcgagccag 13380

gccgctcaga tctgagcgcc aaacactcga aaaatgctgg agcaggagct agtgcgtggg 13440

gagatcgcga gtagaggggc tccagggagc ggaggggagg gggaggagga gattaccggg 13500

gaggccggcc tgctgcagag tacagaaagc acttgcttga tcactagcgc gaagcagagg 13560

tgtgcctgcc cttagtatta actgatcact aagcgcttgt gatggttcgt ggtggcgctt 13620

gattgttgca tttataggag aaccatcggc gcagtgccga ttattgtaat agcagtgttg 13680

ttgtgtgagt ttacattccc gtgagcatga gtgcatgtga gggcgattat taattagatg 13740

gctgatcaat gcagaacagc gcaagtggcc aagattgctc cactggtgga tgcatgttga 13800

tgtttgttct cgcttgatgg ttgatcattt ttattcagtt taggacgaac ttgtcatatg 13860

ggttggctgc ttgtatctag taacgtgatc gagtgctaaa catcagcaga ggtatcatgg 13920

tgatgcatgg acggtggacg cccaagttgt tgaacagttg aagtattttt ttttctgcac 13980

ttcacgggat ccaagcgcag agctatgcat aattgcatat agcggtgggt acgggtgcac 14040

ccttgcatgg taaaactgaa tgcgctcaga aggcaattgc aatcactaaa atttgcttta 14100

gctctgttcc tgatcgggtc aaggtttatt atgttcagtt ggaacattca aagttagagg 14160

cttgaatttg cttaaaaagc attcccacaa acaacggtgg gtgccctttt tgtatgacgt 14220

actgttggct agatggttcc gcttgtttat gaaaaaagag tgtactaata aatttacccg 14280

aactcttcac taccgcagat aactcttttg ccgagtgctt catgcacttc acaaagtcca 14340

gaaaacactt ggcaagctcc aagcttaaga aacataaatg acgtgcataa gttcaaaaat 14400

[0024] agtttaatac aagactaaga tgtccaaaag aacggtaaat tatattaaaa taatacttct 14460

tataatagat caatgctatc gaatagccca cttcactctt taagcataca taaattttca 14520

attatatcat aaaatttcta cgtcctactg cgtttcaacc atatttcagc atgacaatta 14580

tagtaataca aaacaagaat tgaattgctt gaatgtaaat gttcaaagta aagaaggatt 14640

attaatatga tgatgtttta tcgagatatc agagagtcaa cactcctcat tgatccttgt 14700

tagagcaccc atgtaagtgt gtcgctcccc cttcatccgt gcaagcagga tcaaatgctc 14760

tctagaagga acgtgggcat ctaagagagg gatgaatccg aacataactg ggatttttgg 14820

aggattctga tgaaaccatt taccctaact tgagataact ggagtaaaag atccttactg 14880

tccaccattt cttgtgatgg gttaaaatcc ctcttgccgg agagacctat ctctatcagg 14940

tgatatgcct ggtagctgtt tccttcttcc caatctggca ggcccttgtt cgtcactgct 15000

gacgtctttt tcctcattat tggaggatga gtcactgcaa gctgtaaagc ttgtattatt 15060

gctggtggag gccccacctt cacatgctga gcatttatgg ttgtcggcca ataatttctt 15120

cagctgtttg caaagcaata attttgtaga tgtccctaca tcaactttgg catgtgcaat 15180

gctttcttca aaggaagata agatgtcaac atcttgtctg gagattggtg ctccgtagtg 15240

actcatgatc aataccttttt tctgtgcgta attgatcttg atttttgtct tcccgtcgat 15300

ggcgcgccaa gaagaacgat tggcaaacag ctattatggg tattatgggt aggcctgccc 15360

aaactaggga taacagggta ataggtctca cgcggcaaat cctaccacct catttaaata 15420

gagtgaggtt gatttgcggc cgctataact tcgtataatg tatgctatac gaagttatgt 15480

cgactcgtgg tggccgcatc gatcgtgaag tttctcatct aagcccccat ttggacgtga 15540

atgtagacac gtcgaaataa agatttccga attagaataa tttgtttatt gctttcgcct 15600

ataaatacga cggatcgtaa tttgtcgttt tatcaaaatg tactttcatt ttataataac 15660

gctgcggaca tctacatttt tgaattgaaa aaaaattggt aattactctt tctttttctc 15720

catattgacc atcatactca ttgctgatcc atgtaactat aacacagagg ctggccaacc 15780

tggaggcgca gcggcgccac aaggtccaga tctcgttcat cctggccacg ttgctcgcga 15840

ctccgaggac gtgcaggcca ctcgtcgtag ctctacctcg gcagcctctg tcgcgactcc 15900

gaggacgtgc aggccgcgca gctcgcgcgc tccttccgtg ccctctccgg ttttgtgatt 15960

[0025]

ccctgcgccc tctccggctt cgccgccgca tccgggttta cgtggtggtg ggccaccgca 16020

gtcccaccat ccgcgaggca gccagcaggg cccccgcgct cgacgatagg ctgctgaagc 16080

ccctcgccca tcaccgtctt ctggggcgtg cctactgcga ggaggatggg gtcttccaca 16140

ccatgccaca aggtgttcga cgctcgttcc aactccgacg cgcagcctgt ctgctcgccc 16200

atcaccggcc acctgtctgg acgcgcagcc tgctgcgtca acatgctcag cagcatcaac 16260

tgctcaagaa gctacaccaa catcactcct cttcctccac gggggactgg attcgccatt 16320

ggtacctgct gcttcatgct caaccaacac ccttcttgcc aaggatgatg gagattatat 16380

gaaccggtgt ttcagttggt gttggaagtc cccatggtta catccagatc agtcggaatt 16440

tagagacttc ctccaatggt cttcttggca tttccaattt gtcaggtgca gagcatcaca 16500

gttaccaatt ccttggccac cacctataac attgcgtttg gttagagatg accttgttgt 16560

gatgccagtg attccaagta tgctattgtt atctcagtgc tatttcagtg gagtagaatg 16620

tgtgctgaca actatagatc cattattttc taaattttgt gctgagagag agctgttctg 16680

gaagccacct tggcaacctc cagttcctaa caccagatct gagataccgt tgttgataga 16740

gtttgtccat cttactacag gagtctgtga tactctgcat atggttactg aatttcctaa 16800

gcaatacttt gttggcctgc ttgtgctgat tacaagggaa tttttcatgt ctgggagaat 16860

a 16861

<210> 11
<211> 1073
<212> DNA
<213> 玉蜀黍(Zea mays)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1073)
<223> 代表5'侧接玉米基因组DNA直至插入T-DNA的1,073个核苷酸的序列。

<400> 11

[0026]

gaacatttgg cggaagaaca tgttttaagg gctagtttgg aagctcaatt ttcccaagag 60

attcttattt tcccaaggga aaataaacta atttcccttg tgaaaatgaa aatcccttgg 120

aataacgtgg ttcccaaact aaacctaagg gctttttttt atcattgtgt caaacagttt 180

accagctaat tttagtacct taacatttaa ataggtcagc taaaaaagta gctaattgtt 240

agccgaagaa ctgataaatt atttgtccat tagctatttg accttactaa tagatattaa 300

taaatcatat aaatagtcaa gtcttcaaat ataccctgac taatatttgc tagttaatta 360

tttattttct gattaattat tagccactgc taaacaataa gtcagtacga cccaaacaag 420

gcctagttac tactcctatc cataaaaaaa agttgtttga ccattttgac gccaaattta 480

accggcttat attaccaaaa tatttgaaaa aacattaaaa acagttgctg gttaaagtaa 540

attgtatgat aaactaaatc ggaatgaaaa taaataatag ttataatttt ttaataagat 600

gagccagtca aatttgacaa aaagttaaac cgatattctt tctggaacgg aaggagtaga 660

ctgtgttaat gttatgatat tgtgagcaag agagaagggg gtcgatagca acgacccaag 720

tgagtgggag gaggaaggtt ggggcgacga tgttgtgggg agggtgaagg atgatctaaa 780

taatattgtt cgctggattt gagtgagtaa gagcaacccc aacagtttag atataaatcc 840

tagctaaatt tagagtcttg ccaagagatt tttatttttt caaaaaaata gtttatttt 900

ctttgggaaa tagaaatctc ttggaacaat agtgttttta aactagtctt ggcgtttgta 960

aagaagatag atagactcca atttttatg aagacgggtc aaaactcaac aaatcaacgg 1020

ataccgtccc ttttttggcg catgaagttt caggtctgta gcagccggcc cga 1073

<210> 12
<211> 1106
<212> DNA
<213> 玉蜀黍(Zea mays)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1106)
<223> 代表插入 T-DNA 之后的 3' 侧接玉米基因组 DNA 的 1,106 个核苷酸的序列。

<400> 12
actataacac agaggctggc caacctggag gcgcagcggc gccacaaggt ccagatctcg 60

ttcatcctgg ccacgttgct cgcgactccg aggacgtgca ggccactcgt cgtagctcta 120

cctcggcagc ctctgtcgcg actccgagga cgtgcaggcc gcgcagctcg cgcgctcctt 180

ccgtgccctc tccggttttg tgattccctg cgccctctcc ggcttcgccg ccgcatccgg 240

[0027]

gtttacgtgg tggtgggcca ccgcagtccc accatccgcg aggcagccag cagggccccc 300

gcgctcgacg ataggctgct gaagcccctc gcccatcacc gtcttctggg gcgtgcctac 360

tgcgaggagg atggggtctt ccacaccatg ccacaaggtg ttcgacgctc gttccaactc 420

cgacgcgcag cctgtctgct cgcccatcac cggccacctg tctggacgcg cagcctgctg 480

cgtcaacatg ctcagcagca tcaactgctc aagaagctac accaacatca ctcctcttcc 540

tccacggggg actggattcg ccattggtac ctgctgcttc atgctcaacc aacacccttc 600

ttgccaagga tgatggagat tatatgaacc ggtgtttcag ttggtgttgg aagtccccat 660

ggttacatcc agatcagtcg gaatttagag acttcctcca atggtcttct tggcatttcc 720

aatttgtcag gtgcagagca tcacagttac caattccttg gccaccacct ataacattgc 780

gtttggttag agatgacctt gttgtgatgc cagtgattcc aagtatgcta ttgttatctc 840

agtgctattt cagtggagta gaatgtgtgc tgacaactat agatccatta ttttctaaat 900

tttgtgctga gagagagctg ttctggaagc caccttggca acctccagtt cctaacacca 960

gatctgagat accgttgttg atagagtttg tccatcttac tacaggagtc tgtgatactc 1020

tgcatatggt tactgaattt cctaagcaat actttgttgg cctgcttgtg ctgattacaa 1080

gggaattttt catgtctggg agaata 1106

<210> 13
<211> 19612
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 代表包含在用于转化玉米以产生玉米事件 MON95275 的二元质粒转化载体中的转基因盒的 19,612 个核苷酸的序列。

[0028]

<400> 13
aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60

cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaatg ctgctccgtc 120

gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcat tatcgcacgg aatgccaagc 180

actcccgagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240

ttcacgccct tttaaatatc cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttaccc 300

gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt tcccggtaac tataacggtc ctaaggtagc 360

gacttaggct gagcccgggc aggcctaccc ataataccca taatagctgt ttgccaatcg 420

ttcttcttgg cgcgccgttg tcaatcaatt ggcaagtcat aaaatgcatt aaaaaatatt 480

ttcatactca actacaaatc catgagtata actataatta taaagcaatg attagaatct 540

gacaaggatt ctggaaaatt acataaagga aagttcataa atgtctaaaa cacaagagga 600

catacttgta ttcagtaaca tttgcagctt ttctaggtct gaaaatatat ttgttgccta 660

gtgaataagc ataatggtac aactacaagt gttttactcc tcatattaac ttcggtcatt 720

agaggccacg atttgacaca tttttactca aaacaaaatg tttgcatatc tcttataatt 780

tcaaattcaa cacacaacaa ataagagaaa aaacaaataa tattaatttg agaatgaaca 840

aaaggaccat atcattcatt aactcttctc catccatttc catttcacag ttcgatagcg 900

aaaaccgaat aaaaaacaca gtaaattaca agcacaacaa atggtacaag aaaaacagtt 960

ttcccaatgc cataatactc aaactcagta ggattctggt gtgtgcgcaa tgaaactgat 1020

gcattgaact tgacgaacgt tgtcgaaacc gatgatacga acgaaagcta ggcctcagcg 1080

agtaccgctg gcgatctaat ccatgatatc gtgaacatca tctacattca aattcttatg 1140

agctttctta agggcatctg cagcattttt catagaatct aatacagcag tatttgtgct 1200

agctccttcg agggcttccc tctgcatttc aatagttgta agggttccat ctatttgtag 1260

ttgggtcttt tccaatcgtt tcttcttttt gagggcttgg agtgcaactc ttttatttt 1320

cgacgcattt ttctttgcgc tcctgcaggc ggccgcgtgg atgaggagtt aatcggtcgt 1380

gtgagagtag tgatcgagtg gatgtcgtcg agagtgatga gtgttgatgt tgttagtgat 1440

atgtggtaga aggtatcgtg ataaagcgtt aacgcgatcg cagtacttgc aaagaaaaat 1500

gcgtcgaaaa ataaaagagt tgcactccaa gccctcaaaa agaagaaacg attggaaaag 1560

acccaactac aaatagatgg aacccttaca actattgaaa tgcagaggga agccctcgaa 1620

ggagctagca caaatactgc tgtattagat tctatgaaaa atgctgcaga tgcccttaag 1680

aaagctcata agaatttgaa tgtagatgat gttcacgata tcatggatgg tatcgcacag 1740

cgactgctga gggacgtcga gctcccgctt ggtatctgca ttacaatgaa atgagcaaag 1800

[0029] actatgtgag taacactggt caacactagg gagaaggcat cgagcaagat acgtatgtaa 1860

agagaagcaa tatagtgtca gttggtagat actagatacc atcaggaggt aaggagagca 1920

acaaaaagga aactctttat ttttaaattt tgttacaaca aacaagcaga tcaatgcatc 1980

aaaatactgt cagtacttat ttcttcagac aacaatattt aaaacaagtg catctgatct 2040

tgacttatgg tcacaataaa ggagcagaga taaacatcaa aatttcgtca tttatattta 2100

ttccttcagg cgttaacaat ttaacagcac acaaacaaaa acagaatagg aatatctaat 2160

tttggcaaat aataagctct gcagacgaac aaattattat agtatcgcct ataatatgaa 2220

tccctatact attgacccat gtagtatgaa gcctgtgcct aaattaacag caaacttctg 2280

aatccaagtg ccctataaca ccaacatgtg cttaaataaa taccgctaag caccaaatta 2340

cacatttctc gtattgctgt gtaggttcta tcttcgtttc gtactaccat gtccctatat 2400

tttgctgcta caaaggacgg caagtaatca gcacaggcag aacacgattt cagagtgtaa 2460

ttctagatcc agctaaacca ctctcagcaa tcaccacaca agagagcatt cagagaaacg 2520

tggcagtaac aaaggcagag ggcggagtga gcgcgtaccg aagacggtcg tacggaaaat 2580

agagagagat agatttgtag agagagactg gtgatttcag cgtgtcctct ccaaatgaaa 2640

tgaacttcct tatatagagg aagagtcttg cgaaggatag tgggattgtg cgtcatccct 2700

tacgtcagtg gagatatcac atcaatccac ttgctttgaa gacgtggttg gaacgtcttc 2760

tttttccacg atgctcctcg tgggtggggg tccatctttg ggaccactgt cggcagaggc 2820

atcttgaacg atagcctttc ctttatcgca atgatggact ttgtaggagc caccttcctt 2880

ttctactgtc ctttccatga agtgacagat agatgggcaa tggaatccga ggaggtttcc 2940

tgatattacc ctttgttgaa aagtctcaat agccctttgg tcttctgaga ctgtatcttt 3000

gatattcttg gagtagacga gagtgtcgtg ctccaccatg ttgacgaaga ttttcttctt 3060

gtcattgagt cgtaaaagac tctgtatgaa ctgtccgcca gtcttcacgg cgagttctgt 3120

tagatcctcg atctgaattt ttgactcctt gctgatggac ggtgtggagg gaggtgcttt 3180

cgtgcttggc ggcatgcacg ggtaatcggc aacgcatgtg tgctttgagc gttgcctggt 3240

tgtcatggga tacaggacaa caaccatcgt catgtggaga tcgatcgaga tataggatcg 3300

gagcaagttg acaaatcatg tcaaaatcac tcaacgaggt agcatgttgt ataaacagat 3360

[0030]

caatgcagaa atacattagt gctagctgga attgttccga tcagctggcg ctattattat 3420

tttatcgaaa ctgatgcgtg tgcgtgctcg ccttattttg tgttctgcgg gggcggctcc 3480

cgcgaatacc tattatttct gtgagcgctc ccttcaaaag tgacatgatt ttatatatcc 3540

ctctacgata cgacgaccag atcaagctac cactaccacc gaaatcagga cctctgctaa 3600

ccggtggccc agaccggaca aaagttattg cattgtatat gggtagggtt tatgtccatt 3660

ttacatcgcg catagtacgc acaatttctg ttggcccatc aatatatacc gagtgtgctg 3720

cagcctatag tgatagagtt ttacttaatt ctaagcctag gatccgaaca gtgattggaa 3780

atccttagtt acagtctgac agtataaagg tcactctcac tacctggtag tagagccatg 3840

acccggtgct gatatcacta tcaggtacag ccataaccac agtgctagtg gaaatatcac 3900

tacgtactag gccaatctat aatctgatga gaacacatat agttgacata gtcgatacgt 3960

acccatgtta tgagtcccga gtgactgtca aggacatgat ttgagttttg gtaagtgtgt 4020

gttggacaaa tcgaagcatg agtagggttc atggcctgtg atttgtacta gtctaactaa 4080

ctaaattatc gtgtacaacc gttgatctga gagggtcccg cgctgcaaat ctattgtaat 4140

actccctgtc gtaatactgt gttaatttgt gctcagtcgg acggctcaga ctttacggtg 4200

atataaacct ttactgagct gaactcgacc tggagatcga atcgaccccg caggtgttcc 4260

gaagcgtacc acggcgagcg ttaggtctaa gcaaaagcca cacccttcac agaacgaagg 4320

agtttcgcga agtcacgctg atttaaaaag agcgggccac tttttccact cttggtcaac 4380

agaaaaaggc ggacgagttc agatttaagg ccagctgcac gccgatcagc agattcgacg 4440

ttacccgcgg agagaaggct gcctgctact tcccagtcga aagtggtgta gttcaagtga 4500

tctctaaagc taaggctccg ctggtcctag tcgttaatta ccgagcagct ctccggcgta 4560

cagaaccacg aagttacttc ttgaggtgaa gcgtaagtgg tggtgagggt aagtagttgg 4620

aagcagaagc cttaagtgat acaatctggc ttccaccttg tcggaactcg ttaaaatttc 4680

ccttgattac aatataagta cctgcctgat cgttctggta gcctgatcga tttttatttt 4740

tgggctacgg gcaattgctc gcaatttatt gaagtcgcac gggcgcgaaa gaagacgttg 4800

ttctctctgc ttgctagaag ccgcggataa gcgattctat ccgatattta agacccgtgt 4860

[0031] agaccagcag acgtgagtgg gccgtttcca gaaaccgtct ctccttgcga cgatagatcc 4920

gatagtaagt aacttcaccc ctgatcaacg gcgtagtcgc ctgtctggtt cggatctgta 4980

tagatttggc ggattccgct tgcgaaatct ttagcagctt aggtccggag cccccggtgg 5040

atctggctgt tcagcggcac ggtccaatct ccttagctcc tctgtgaaca gcagtcgaac 5100

tctaagattc ttgatacgcg caacacgggc cttggcgagc ctggggataa ctcgcgagga 5160

cgctctcgcc gcgctaaagc gtgcgatcac accgctccga caagtgactt tgccaaatct 5220

agaaagagag actacactgc ttgccggtgc agtcttgatc caccttggag gggctgacgc 5280

taactaacta aggcgcgccg gcctactagg cctcgaccct tgttcgtcac tgctgacgtc 5340

tttttctcca ttattggagg atgagtcact gcaagctgta aagcttgtat tattgctagt 5400

ggaggcccca cctgcacatg ccgagcaatt atgattgtcg gccagtagct ttttgagctg 5460

tttgcagagc aataacttag tggatgtccc caccattaca tcgttattga tgatgctttc 5520

ttcaaaggaa gataagatgc tgacatcctg tctggagatt gtcgctccat agtgactcgt 5580

gatcaatact ctttcatgtg agtaattgat ttttatcttt gtttctccgt tgatggccta 5640

ctaggccaaa tggatgaaac aacttggacc aatcagagat ggccacgtca gctcccgatc 5700

gtcgtaaccg accaaacccg atcgataacg gtttaggctc caatacaccg tcggtaccac 5760

ccggtcgcta tcatctgccc ccgtcccaac gctattggta tcgtccgccc ctatatcggt 5820

cggtagccca gtccaccgtc ggggccaatc gtcccctgct gcgtccgctc gtgtcggtac 5880

cgatcgccaa aaacgccacg tcaacggcac tgcggtaccg accgccgctg gcaccggcct 5940

tagcgggcca cacgaccgat cgctgttgta cggacgtaga ggtgaatcat gcgattgaat 6000

tttcgctaga ggaaagttat catcttatta tctccaaccc tccttcctac ggctggatcc 6060

gacgaaaatt taccctggac ggtgccagta acaattgcag gtctcactca cgtgctaaat 6120

ccagcaatca aacacgaagg aatatacgtg atctggccag aacatgcaag agaataatac 6180

agtagtgtta gagtacgaaa cctacacgat tcaacgaatt aatcaatggg ttcacgttca 6240

cgggtatgct cgcgcacgtc caaaatccaa cgacattttt ataagcggca tgatccagac 6300

gggccagctc gagcaccaca tggcgtggct ccatctcgca tcccccatca ccgctataaa 6360

taccattggc catgcacacc cgcactccca cacagcacaa gcagcagcag cagcagcagc 6420

[0032]

tcgatcgaac tagcttagct actacgtgcg cgtgcaacaa gcagctcgat cgatcgccct 6480

cacggtaatt tcttctccca aaataaacct aatctttaat ctgttgcctg tctactcttc 6540

ctatctgttg ctaaaaattt gaatttggta tgtgcaggag gacttaatta agggacccac 6600

cgccatgtca tccacggacg tgcaagagcg cctgcgggac ttggcgcgcg aagacgaggc 6660

gggaacgttc aacgaggctt ggaacaccaa cttcaagccg tcggacgagc agcaattcag 6720

ctactcgccg acggagggaa ttgtcttcct cacgccgcct aagaacgtca tcggtgagcg 6780

gcgcatctcc cagtacaagg tgaacaatgc ctgggcaact ctggagggct ctcccaccga 6840

ggcgagcggt acgccgttgt acgcgggcaa gaatgtactg gacaactcga aaggcacaat 6900

ggaccaggag ttgcttacac ccgagttcaa ctacacctac acggagagca cgagcaacac 6960

gacgacgcac ggcctcaaac tcggcgtgaa gaccaccgcg accatgaagt tccctatcgc 7020

tcaaggctcg atggaggcga gcaccgagta caatttccag aactcctcca ccgataccaa 7080

gaccaaacaa gtgtcttaca agtctccgag ccagaagatt aaggttcctg cgggcaagac 7140

gtaccgcgtg ctggcgtacc tgaacaccgg ctctatctct ggcgaggcta acctgtacgc 7200

gaacgtcggc ggcatcgcgt ggcgggtctc gccaggctat cctaacggcg gcggcgtgaa 7260

catcggcgct gtcctgacca agtgccagca gaagggttgg ggcgacttcc gcaacttcca 7320

gccctccggg cgcgacgtca tcgtgaaggg tcagggcacc ttcaagtcca actacggcac 7380

cgacttcatc cttaagattg aggacatcac cgacagcaag ctccgcaaca acaacggctc 7440

cgggacggtc gtacaggaga tcaaggtgcc actcatccgc accgagattt gataggggtc 7500

cccggtccga tgaagtgcca tcatgccatg gatgcggggt gaaagctcgc ggcgtcgaat 7560

ataatctccg gttccagttt cagctactat ggcgactcgt gtcgtgtgtg tgtggttact 7620

ctgcttttgt atgtttggta atggtgtgtg cgctgttgtc cagagtttca tggtggtact 7680

gcttcctagc agtgttgtgt actagtctcg gtactttgcc tgtatgttga gctcggctca 7740

gtatgttctg ggagtgaata aataaaaata aaaaaaacca gatattgtag tatactaact 7800

gccgttgctc tgtttcatcc acatacacag aatcctatga actgatcttt gtggggactt 7860

gggagccatc tgctcggatc ttcttcatgg gattctctca atttctcctc atttttctaa 7920

[0033] ggctgtgtgt ttagatgtag ggagaaaagt ttttggattg tacatcgtgt tgggtactaa 7980

tttagtctac tactccgtcc gtgaatagat gacattttct ttcggtgttg ttcgtcgtgc 8040

cacaaagttt tgaatttatt tatatgcaat cctgcaggtg tttaaacacc tgcaggtctg 8100

catgttcagt tagcacaagc aggttgcagc ttcaccaaac acatacagtc ggccattgct 8160

gcttcaccaa acataaacac tacctgttgg agctacacca aacacttgca ctgaccaaag 8220

aacattaata gatcatcagg actgttcaag taatcacgca tgacaagata gaaagcagca 8280

ggtccccttc cttctcaaag tagcctgcag cttcattctt tggttcacca ttacataaac 8340

agcaaaacca gaaatagcag acaataattc ctcctctagg taaataacca gacacagtaa 8400

taccctcaca agtaccactt attaggacag tacaatacaa atgatagcaa ggggcagatc 8460

aagaatcaca acacagaagc cacaaaacat gataagcgca gcagaccaaa agcttcttct 8520

caaagggcgc ccggaccgtc agttgttggt ctggctgtac atgacatccg acttctgaat 8580

ccacttgtgt agcaccttca ggtccttccc gccgaccgtc gcccagagct ctacgctagc 8640

atctttcgtc gggtaggtcc cgccgttagg gttcttgaga ttaaacgtaa tctggaacaa 8700

gaacgggctc ggcttgctga cggtctggac cttcttgccg ttcacgcgga tcttgtagct 8760

cgacacgttg ttgtagaaga tgtcgggcag cttgtacagg ctgaggccgg agtacaggtt 8820

tggattctct gagagatacc accagcctga gaatttgtgg gcgtcgatca taactttctc 8880

gatctcggac tcgccaagct cagcgacttt cactttgagg ttgtcgttct tctcgtcaac 8940

ggcgtagagc tccataggcg tgatcgcagt gatgctgccg tacgtcaccg tccgcttccc 9000

gttggcgtcc agaggcggcg cagggatgat gctaccgagg cggccgttga tcttccactg 9060

gtatcggatc ttgctactcg gcacgcgagt gaacgtggca ccgatcacca tctcgtcgtt 9120

ggagccgaag gaccacttct caaagatgtg tttcttctgc aggttctcgt tggtcttcca 9180

ctcgatcacg gagacatcgt cgaagtgcag gttggcgttc ccgttattct tcaggccgat 9240

gatcttgaag tattcagggt tattgaacgt gttgaaggag aactccgcta tcttccactt 9300

cccgccggtc accttcccgg aaaccttcgc gccttgcccg ttgccggagc tgttgtcagc 9360

gtagaagacg acctcgttgc tcccagtggt gctggcggtg cgcacgtacg cccgcacagt 9420

gtaggaggtg tatggcttca gctgcgggtt tgacatcgcc gtgccgtgcc cgtcagtgcc 9480

[0034]

gatccgcccg cgcttcttgc cggtgtagcc tccggattct tggtaggtgt agtaccacag 9540

gttctctgag gtctcgaagt cgtagtactt gatcgggacg tgtagcgtga tcttcatgcc 9600

gcgcttccac ttcacgtcgt acaccgtctt gccgggcatc tggttcagct ggcgctcgat 9660

ttctttcttc gtgttctcgt ccgtgatgag gttgatggaa ggctcatcaa tgaagatgtc 9720

cttctcaccc tggtccgtgt agtacagtct gccgtccttc tcctgagcgt taaacgcctt 9780

cttgatggcc tccttgatgg tgatctccgg agtcttgtcc tccggatcgt tcatgttctt 9840

cgccgcgacc cggcgctcga ggctatcctt gcccgtgccg aggttaagag taaggctccc 9900

actgacagcg tcaatgtttg tccggatcgg gtcccactcg cctccgggta tcacctggcc 9960

tttctcgtcg aggataccgt actggccgcg gttctgcgta gtctcgatgt tgagaatctc 10020

cgtgcccgcc tggatcttgt ccagctgctc ggcgttgatc gctatcttca cggtgcccgc 10080

ctcgttggcc ttgtctaggg agataggagc ctggcccttc tgcggatagg tgtcgccggc 10140

accgagcgag ttgccgatct ggttagggcc ggcggtgatc gtggtgatgc tgtcgcctga 10200

gttctggaag acgaagttgg tggtcggctt caggtcgtag atgggcgcgg tgccaccatt 10260

gtaatagcgc acgttcgcgt tgagatacgc cctctcggca gtgttgatcc ctatctgcga 10320

actccaggta gtagagtcgg tgtcggccac acttgtggac gacgaccagc tgtgggtgta 10380

ctttggtgag attgagaaac tgaagccctt gtcgctgaag cccaggctgc cgccgatctc 10440

gacggtgttg gtcgtggtgt cggtcttagt tgtagtcttg ctctttgtat ccgcgttgcc 10500

ctccgtcacc gtatcgttct tgctgaagtg gagcttctcc attccgacgc caacggaggg 10560

ataggcggcc actagaggat cgcgcgcctc atacttcgta gcagcgggca tgtgcccagt 10620

caccttctcg aagtcggtgt acgggtcttt gaccgtacgg gcgtggtaag ggttgctcac 10680

gtacttcttg tagccttctg cactgtaggc gtcgttccac ggcacgatct gctggttacg 10740

gaaggtgtat cctttctctt cccattcatc agggatgcag tcgttgtcgg tgtccaccgg 10800

cgtggacatc gactgcttct cgccgttctc ttgctggcgg tcgaagaggt tgtagttcgg 10860

gaagaagctc tgggtctcct tctccgcgag agagttcgcc ttctcgctga aattcgggct 10920

cagtatgtac ttctccggga tctgttcctt ctgcgcgttg ttcatcgacc agaagagctg 10980

[0035] taggtccggc agggtgttgg aggtgttcct gtactcgatc ttaatctcgt agacctggtt 11040

tgcctctagt ttgaggttct tctggatgct cgcctggttg atgaccgtct cgccattgat 11100

ctggaggatt acgttctcgt cggaggatgt ggagaggcgg tactcgccgg tctgcgggct 11160

cttcaggttg cccatccacc gaatggactg gatctgctgg gcgtccgtgt tgatgcgagc 11220

cttgttcatg aggttggact tctcgcccac ctggatgaac atgagctcct tgaaggttga 11280

gtccttgaag tagaagccga ccaggccgat gaccgtcgct tgctcactct tggaggagac 11340

aatgttctgc atggtggtgg ccggccaagt aacggtccgc taccctgcaa gaggtagcaa 11400

aaaaggggta tcagttaaca gcaagtgtat cctgctagat agtagctgta caagggaacc 11460

agtaagcatc gtaaacataa aagttttgaa ggcatatcaa ctgaaccttt atatttgtgc 11520

atctataagt caataaaaac aacatatgta cagagcttac tgccaggcaa aagtgggatt 11580

catttcaccg actaggctaa tgttgtactc cctccgttcc aaattgtagg tcgttttgac 11640

ttttctagat tcatagatat tattatgcac ctagacatac actatatcta gatgcataat 11700

aatatctatg aacctacaaa agtcaaaacg acctacaatt tggaacggag agagtaagaa 11760

ataatctgat aacttgcgga ctgttgtttc caacatttat aaaaatgtgt aaagtaccat 11820

aaccaaacat tcgtataact aaacatgata ggaaaagact agcattgctt tgaaaaagta 11880

gtgtacatgt actggccaat ctaacaagct tttttgttgt ctaaaatgtg acctgcagag 11940

caacaaaaat cacatgctga acttttcagc ctaacatttg gtgccatgaa acatcactaa 12000

gttgtcacta attttgggtg gtatgtgctc aatagctatt catgacaagg aaacatccta 12060

acatgcagat atgctttcca aatagctctc tccgaatgaa ccacacacgg atttttacac 12120

tctggtagtt caatcacacc aaattaacta tccgcgactt tcatccaacc atgttaccag 12180

ttaccgcaac tatctggact tgctagacag agcatcacga agctctccca gactcccagt 12240

caagcaggaa actagaacgt cggagctggg aagtagtcaa gcagtcacac cccaagggct 12300

cgtgcatcgc cagcaacacg taagcgcatt caggcacatc acagtcacca ttcctaggta 12360

cgtagctcag agagcctcct cgcacggcag tcccgcaaac acacatcagg cgtgcgcaca 12420

aaatcagacg catcggcacg cagaaacgct acagatcagg aacaggacgg agttcatcaa 12480

gcacagacgt cagacgaaca ccctagcacc aaccacgaag cacgatccgc tggcggatcg 12540

[0036]

cgcggtaccc gccccggatc tggcgggagc accggaggca agtgaccaga acgcatgagc 12600

aaaccgcaga tctcgagcca ggccgctcag atctgagcgc caaacactcg aaaaatgctg 12660

gagcaggagc tagtgcgtgg ggagatcgcg agtagagggg ctccagggag cggaggggag 12720

ggggaggagg agattaccgg ggaggccggc ctgctgcaga gtacagaaag cacttgcttg 12780

atcactagcg cgaagcagag gtgtgcctgc ccttagtatt aactgatcac taagcgcttg 12840

tgatggttcg tggtggcgct tgattgttgc atttatagga gaaccatcgg cgcagtgccg 12900

attattgtaa tagcagtgtt gttgtgtgag tttacattcc cgtgagcatg agtgcatgtg 12960

agggcgatta ttaattagat ggctgatcaa tgcagaacag cgcaagtggc caagattgct 13020

ccactggtgg atgcatgttg atgtttgttc tcgcttgatg gttgatcatt tttattcagt 13080

ttaggacgaa cttgtcatat gggttggctg cttgtatcta gtaacgtgat cgagtgctaa 13140

acatcagcag aggtatcatg gtgatgcatg gacggtggac gcccaagttg ttgaacagtt 13200

gaagtatttt tttttctgca cttcacggga tccaagcgca gagctatgca taattgcata 13260

tagcggtggg tacgggtgca cccttgcatg gtaaaactga atgcgctcag aaggcaattg 13320

caatcactaa aatttgcttt agctctgttc ctgatcgggt caaggtttat tatgttcagt 13380

tggaacattc aaagttagag gcttgaattt gcttaaaaag cattcccaca aacaacggtg 13440

ggtgcccttt ttgtatgacg tactgttggc tagatggttc cgcttgttta tgaaaaaaga 13500

gtgtactaat aaatttaccc gaactcttca ctaccgcaga taactctttt gccgagtgct 13560

tcatgcactt cacaaagtcc agaaaacact tggcaagctc caagcttaag aaacataaat 13620

gacgtgcata agttcaaaaa tagtttaata caagactaag atgtccaaaa gaacggtaaa 13680

ttatattaaa ataatacttc ttataataga tcaatgctat cgaatagccc acttcactct 13740

ttaagcatac ataaattttc aattatatca taaaatttct acgtcctact gcgtttcaac 13800

catatttcag catgacaatt atagtaatac aaaacaagaa ttgaattgct tgaatgtaaa 13860

tgttcaaagt aaagaaggat tattaatatg atgatgtttt atcgagatat cagagagtca 13920

acactcctca ttgatccttg ttagagcacc catgtaagtg tgtcgctccc ccttcatccg 13980

tgcaagcagg atcaaatgct ctctagaagg aacgtgggca tctaagagag ggatgaatcc 14040

[0037] gaacataact gggatttttg gaggattctg atgaaaccat ttaccctaac ttgagataac 14100

tggagtaaaa gatccttact gtccaccatt tcttgtgatg ggttaaaatc cctcttgccg 14160

gagagaccta tctctatcag gtgatatgcc tggtagctgt ttccttcttc ccaatctggc 14220

aggcccttgt tcgtcactgc tgacgtcttt ttcctcatta ttggaggatg agtcactgca 14280

agctgtaaag cttgtattat tgctggtgga ggccccacct tcacatgctg agcatttatg 14340

gttgtcggcc aataatttct tcagctgttt gcaaagcaat aattttgtag atgtccctac 14400

atcaactttg gcatgtgcaa tgctttcttc aaaggaagat aagatgtcaa catcttgtct 14460

ggagattggt gctccgtagt gactcatgat caataccttt ttctgtgcgt aattgatctt 14520

gatttttgtc ttcccgtcga tggcgcgcca agaagaacga ttggcaaaca gctattatgg 14580

gtattatggg taggcctgcc caaactaggg ataacagggt aataggtctc acgcggcaaa 14640

tcctaccacc tcatttaaat agagtgaggt tgatttgcgg ccgctataac ttcgtataat 14700

gtatgctata cgaagttatc ctagggacaa caacatgctt ctcatcaaca tggagggaag 14760

agggagggag aaagtgtcgc ctggtcacct ccattgtcac actagccact ggccagctct 14820

cccacaccac caatgccagg ggcgagcttt agcacagcca ccgcttcacc tccaccaccg 14880

cactacccta gcttcgccca acagccaccg tcaacgcctc ctctccgtca acataagaga 14940

gagagagaag aggagagtag ccatgtgggg aggaggaata gtacatgggg cctaccgttt 15000

ggcaagttat tttgggttgc caagttaggc caataagggg agggatttgg ccatccggtt 15060

ggaaaggtta ttggggtagt atctttttac tagaattgtc aaaaaaaaat agtttgagag 15120

ccatttggag aggatgttgc ctgttagagg tgctcttagg acatcaaatt ccataaaaac 15180

atcagaaaaa ttctctcgat gaagatttat aaccactaaa actgccctca attcgaaggg 15240

agttcaaaac aattaaaatc atgttcgaat tgagtttcaa tttcacttta acccctttga 15300

aatctcaatg gtaaaacatc aacccgtcag gtagcatggt tctttttatt cctttcaaaa 15360

agagttaatt acaaacagaa tcaaaactaa cagttaggcc caaggcccat ccgagcaaac 15420

aatagatcat gggccaggcc tgccaccacc ctccccctcc tggctcccgc tcttgaattt 15480

caaaatccaa aaatatcggc acgactggcc gccgacggag cgggcggaaa atgacggaac 15540

aacccctcga attctacccc aactacgccc accaacccac acgccactga caatccggtc 15600

[0038]

ccacccttgt gggcccacct acaagcgaga cgtcagtcgc tcgcagcaac cagtgggccc 15660

acctcccagt gagcggcggg tagatctgga ctcttaccca cccacactaa acaaaacggc 15720

atgaatattt tgcactaaaa ccctcagaaa aattccgata ttccaaacca gtacagttcc 15780

tgaccgttgg aggagccaaa gtggagcgga gtgtaaaatt gggaaactta atcgaggggg 15840

ttaaacgcaa aaacgccgag gcgcctcccg ctctatagaa aggggaggag tgggaggtgg 15900

aaaccctacc acaccgcaga gaaaggcgtc ttcgtactcg cctctctccg cgccctcctc 15960

cgccgccgct cgccgccgtt cgtctccgcc gccaccggct agccatccag gtaaaacaaa 16020

caaaaacgga tctgatgctt ccattcctcc gtttctcgta gtagcgcgct tcgatctgtg 16080

ggtggatctg ggtgatcctg gggtgtggtt cgttctgttt gatagatctg tcggtggatc 16140

tggccttctg tggttgtcga tgtccggatc tgcgttttga tcagtggtag ttcgtggatc 16200

tggcgaaatg ttttggatct ggcagtgaga cgctaagaat cgggaaatga tgcaatatta 16260

gggggtttc ggatggggat ccactgaatt agtctgtctc cctgctgata atctgttcct 16320

ttttggtaga tctggttagt gtatgtttgt ttcggataga tctgatcaat gcttgtttgt 16380

ttttttcaaat tttctaccta ggttgtatag gaatggcatg cggatctggt tggattgcca 16440

tgatccgtgc tgaaatgccc ctttggttga tggatcttga tattttactg ctgttcacct 16500

agatttgtac tcccgtttat acttaatttg ttgcttatta tgaatagatc tgtaacttag 16560

gcacatgtat ggacggagta tgtggatctg tagtatgtac attgctgcga gctaagaact 16620

atttcagagc aagcacagaa aaaaatattt agacagattg ggcaactatt tgatggtctt 16680

tggtatcatg ctttgtagtg ctcgtttctg cgtagtaatc ttttgatctg atctgaagat 16740

aggtgctatt atattcttaa aggtcattag aacgctatct gaaaggctgt attatgtgga 16800

ttggttcacc tgtgactccc tgttcgtctt gtcttgataa atcctgtgat aaaaaaaatt 16860

cttaaggcgt aatttgttga aatcttgttt tgtcctatgc agcctgatcc atggcgcaag 16920

ttagcagaat ctgcaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc tcgaaatcca 16980

gtcaacgcaa atctccctta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca cgagcttatc 17040

cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaattggc tctgagcttc 17100

[0039] gtcctcttaa ggtcatgtct tctgtttcca cggcgtgcat gcttcacggt gcaagcagcc 17160

ggcccgcaac cgcccgcaaa tcctctggcc tttccggaac cgtccgcatt cccggcgaca 17220

agtcgatctc ccaccggtcc ttcatgttcg gcggtctcgc gagcggtgaa acgcgcatca 17280

ccggccttct ggaaggcgag gacgtcatca atacgggcaa ggccatgcag gcgatgggcg 17340

cccgcatccg taaggaaggc gacacctgga tcatcgatgg cgtcggcaat ggcggcctcc 17400

tggcgcctga ggcgccgctc gatttcggca atgccgccac gggctgccgc ctgacgatgg 17460

gcctcgtcgg ggtctacgat ttcgacagca ccttcatcgg cgacgcctcg ctcacaaagc 17520

gcccgatggg ccgcgtgttg aacccgctgc gcgaaatggg cgtgcaggtg aaatcggaag 17580

acggtgaccg tcttcccgtt accttgcgcg ggccgaagac gccgacgccg atcacctacc 17640

gcgtgccgat ggcctccgca caggtgaagt ccgccgtgct gctcgccggc ctcaacacgc 17700

ccggcatcac gacggtcatc gagccgatca tgacgcgcga tcatacggaa aagatgctgc 17760

agggctttgg cgccaacctt accgtcgaga cggatgcgga cggcgtgcgc accatccgcc 17820

tggaaggccg cggcaagctc accggccaag tcatcgacgt gccgggcgac ccgtcctcga 17880

cggccttccc gctggttgcg gccctgcttg ttccgggctc cgacgtcacc atcctcaacg 17940

tgctgatgaa ccccacccgc accggcctca tcctgacgct gcaggaaatg ggcgccgaca 18000

tcgaagtcat caacccgcgc cttgccggcg gcgaagacgt ggcggacctg cgcgttcgct 18060

cctccacgct gaagggcgtc acggtgccgg aagaccgcgc gccttcgatg atcgacgaat 18120

atccgattct cgctgtcgcc gccgccttcg cggaaggggc gaccgtgatg aacggtctgg 18180

aagaactccg cgtcaaggaa agcgaccgcc tctcggccgt cgccaatggc ctcaagctca 18240

atggcgtgga ttgcgatgag ggcgagacgt cgctcgtcgt gcgtggccgc cctgacggca 18300

aggggctcgg caacgcctcg ggcgccgccg tcgccaccca tctcgatcac cgcatcgcca 18360

tgagcttcct cgtcatgggc ctcgtgtcgg aaaaccctgt cacggtggac gatgccacga 18420

tgatcgccac gagcttcccg gagttcatgg acctgatggc cgggctgggc gcgaagatcg 18480

aactctccga tacgaaggct gcctgatgag ctccagggtt cttgcctggt gccttggcaa 18540

tgcttgatta ctgctgctat cctatgatct gtccgtgtgg gcttctatct atcagtttgt 18600

gtgtctggtt ttgaaaaaca tttgcttttc gattatgtag ggtttgcttg tagctttcgc 18660

[0040]

tgctgtgacc tgtgttgttt atgtgaacct tctttgtggc atctttaata tccaagttcg 18720

tggtttgtcg taaaacgaag cctctacttc gtaaagttgt gtctatagca ttgaaatcgt 18780

ttttttgctc gagaataatt gtgaccttta gttggcgtga aactagtttt ggatatctga 18840

ttctctggtt cgcaatcttg agatcgtcgc tgcttaggtg agctaagtga tgttcctaag 18900

taaatgctcc tcaccagaat acgtagctgt gtgaaaagag aacgcgtgaa tacgtagctg 18960

tgtaaagatt gtgtcccaag taaacctcag tgatttttgt ttggattttt aatttagaaa 19020

cattcgactg ggagcggcta gagccacacc caagttccta actatgataa agttgctctg 19080

taacagaaaa caccaactag tataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatgtcga 19140

ctcgtggtgg ccgcatcgat cgtgaagttt ctcatctaag cccccatttg gacgtgaatg 19200

tagacacgtc gaaataaaga tttccgaatt agaataattt gtttattgct ttcgcctata 19260

aatacgacgg atcgtaattt gtcgttttat caaaatgtac tttcatttta taataacgct 19320

gcggacatct acatttttga attgaaaaaa aattggtaat tactctttct ttttctccat 19380

attgaccatc atactcattg ctgatccatg tagatttccc ggacatgaag ccatttacaa 19440

ttgaatatat cctgccgccg ctgccgcttt gcacccggtg gagcttgcat gttggtttct 19500

acgcagaact gagccggtta ggcagataat ttccattgag aactgagcca tgtgcacctt 19560

ccccccaaca cggtgagcga cggggcaacg gagtgatcca catgggactt tt 19612

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> 肠杆菌噬菌体 P1 (Enterobacteria phage P1)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> 代表用于 Cre 介导的切除和重组的 LoxP 位点的 35 个核苷酸的序列。

<400> 14
tataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttat 35

[0041]

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于鉴定样品中的玉米事件 MON95275 DNA 的称为 SQ20267 的热扩增引物的 27 个核苷酸的序列。

<400> 15
ctctttcttt ttctccatat tgaccat 27

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于鉴定样品中的玉米事件 MON95275 DNA 的称为 SQ51355 的热扩增引物的 24 个核苷酸的序列。

<400> 16
gttggccagc ctctgtgtta tagt 24

<210> 17
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于鉴定样品中的玉米事件 MON95275 DNA 的称为 PB10263 的探针的 19 个核苷酸的序列。

<400> 17
atactcattg ctgatccat 19

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用作玉米事件 MON95275 的事件和接合性分析的内部对照的称为 SQ20222 的热扩增引物的 24 个核苷酸的序列。

<400> 18
gccctatgac ttaccgagag ttca 24

<210> 19
[0042] <211> 28
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用作玉米事件 MON95275 的事件和接合性分析的内部对照的称为 SQ20221 的热扩增引物的 28 个核苷酸的序列。

<400> 19
gttgctatgt actaacagaa ctgcatgt 28

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用作玉米事件 MON95275 的事件和接合性分析的内部对照的称为 PB50298 的探针的 17 个核苷酸的序列。

<400> 20
ttgttgtgtg gctccat 17

<210> 21

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于玉米事件 MON95275 的接合性分析的称为 PNEG95275_F 的热扩增引物的 20 个核苷酸的序列。

<400> 21
tctctttctt ccacctcacg 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于玉米事件 MON95275 的接合性分析的称为 PNEG95275_R 的热扩增引物的 20 个核苷酸的序列。

<400> 22
cgaatgcctc tgataccaat 20

[0043]

<210> 23
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 对应于用于玉米事件 MON95275 的接合性分析的称为 PRBNEG95275 的探针的 17 个核苷酸的序列。

<400> 23
gtaccgcaac gctaaca 17

<210> 24
<211> 496
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 具有改变的核苷酸的作为源自大丽花花叶病毒的片段的重排的增强子。

<400> 24
atcgacggga agacaaaaat caagatcaat tacgcacaga aaaaggtatt gatcatgagt 60

cactacggag caccaatctc cagacaagat gttgacatct tatcttcctt tgaagaaagc 120

attgcacatg ccaaagttga tgtagggaca tctacaaaat tattgctttg caaacagctg 180

aagaaattat tggccgacaa ccataaatgc tcagcatgtg aaggtggggc ctccaccagc 240

aataatacaa gctttacagc ttgcagtgac tcatcctcca ataatgagga aaaagacgtc 300

agcagtgacg aacaagggcc tgccagattg ggaagaagga aacagctacc aggcatatca 360

cctgatagag ataggtctct ccggcaagag ggattttaac ccatcacaag aaatggtgga 420

cagtaaggat cttttactcc agttatctca agttagggta aatggtttca tcagaatcct 480

ccaaaaatcc cagtta 496

<210> 25
<211> 576
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 可操作地连接至源自花椰菜花叶病毒分离株 NY8153 的前导子的启动子，其中核苷酸位置 2 已被更改以改变潜在起始密码子。

[0044]

<400> 25
aaggagtcaa aaattcagat cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcggacag 60

ttcatacaga gtcttttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag 120

cacgacactc tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct 180

attgagactt ttcaacaaag ggtaatatca ggaaacctcc tcggattcca ttgcccatct 240

atctgtcact tcatggaaag gacagtagaa aaggaaggtg gctcctacaa agtccatcat 300

tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtggtcc caaagatgga 360

cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa 420

gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg 480

caagactctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agaggacacg ctgaaatcac 540

cagtctctct ctacaaatct atctctctct attttc 576

<210> 26
<211> 322
<212> DNA
<213> 大丽花花叶病毒(Dahlia mosaic virus)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(322)
<223> 源自大丽花花叶病毒的增强子。

<400> 26

[0045]

atcaacggag aaacaaagat aaaaatcaat tactcacatg aaagagtatt gatcacgagt 60

cactatggag cgacaatctc cagacaggat gtcagcatct tatcttcctt tgaagaaagc 120

atcatcaata acgatgtaat ggtggggaca tccactaagt tattgctctg caaacagctc 180

aaaaagctac tggccgacaa tcataattgc tcggcatgtg caggtggggc ctccactagc 240

aataatacaa gctttacagc ttgcagtgac tcatcctcca ataatggaga aaaagacgtc 300

agcagtgacg aacaagggtc ga 322

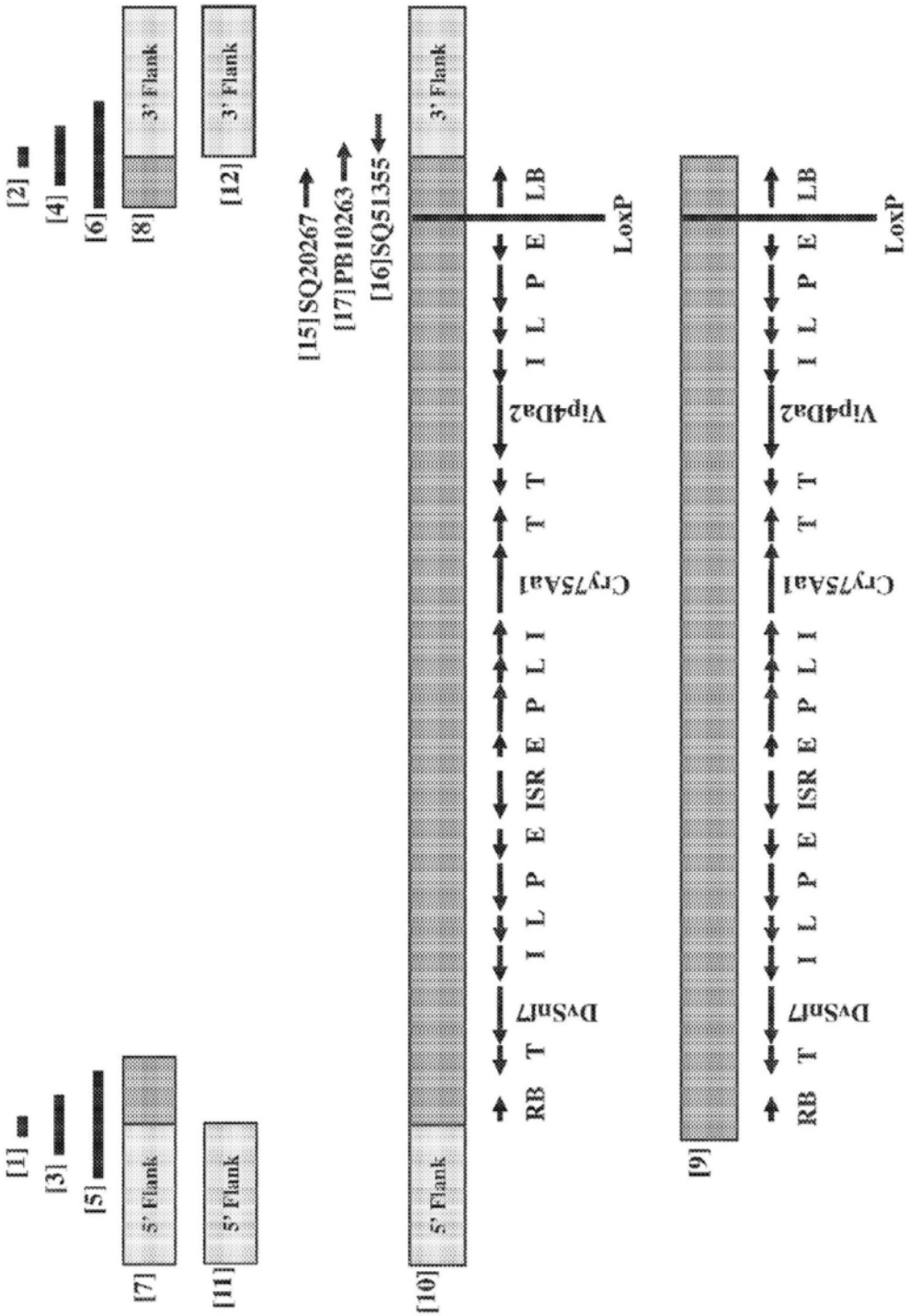

[1]
[2]
[3]
[4]
[5]
[6]
[7]
5' Flank
[8]
3' Flank
[9]
[10]
5' Flank
[11]
5' Flank
[12]
3' Flank
[15] SQ20267
[17] PB10263
[16] SQ51355
3' Flank
RB
T
DvSnf7
I L P E ISR E P L I
Cry75Aa1
T T
Vip4Da2
I L P E
LB
LoxP

图1

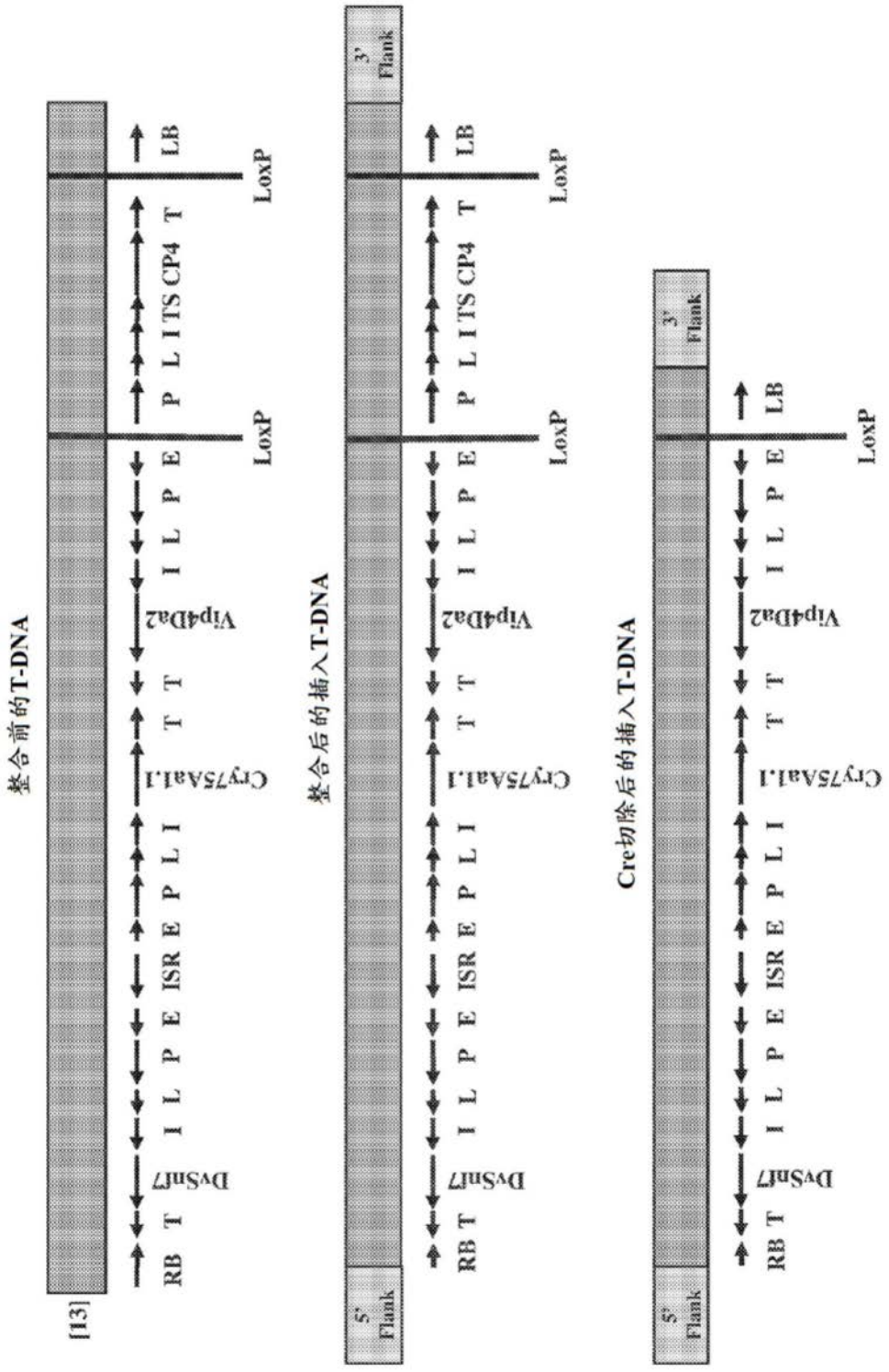

整合前的T-DNA
[13]
RB T
DvSnf7
I L P E ISR E P L I
Cry75Aa1.1
T T
Vip4Da2
I L P E
LoxP
P L I TS CP4 T
LoxP
LB
整合后的插入T-DNA
5' Flank
RB T
DvSnf7
I L P E ISR E P L I
Cry75Aa1.1
T T
Vip4Da2
I L P E
LoxP
P L I TS CP4 T
LoxP
LB
3' Flank
Cre切除后的插入T-DNA
5' Flank
RB T
DvSnf7
I L P E ISR E P L I
Cry75Aa1.1
T T
Vip4Da2
I L P E
LoxP
LB
3' Flank

图2

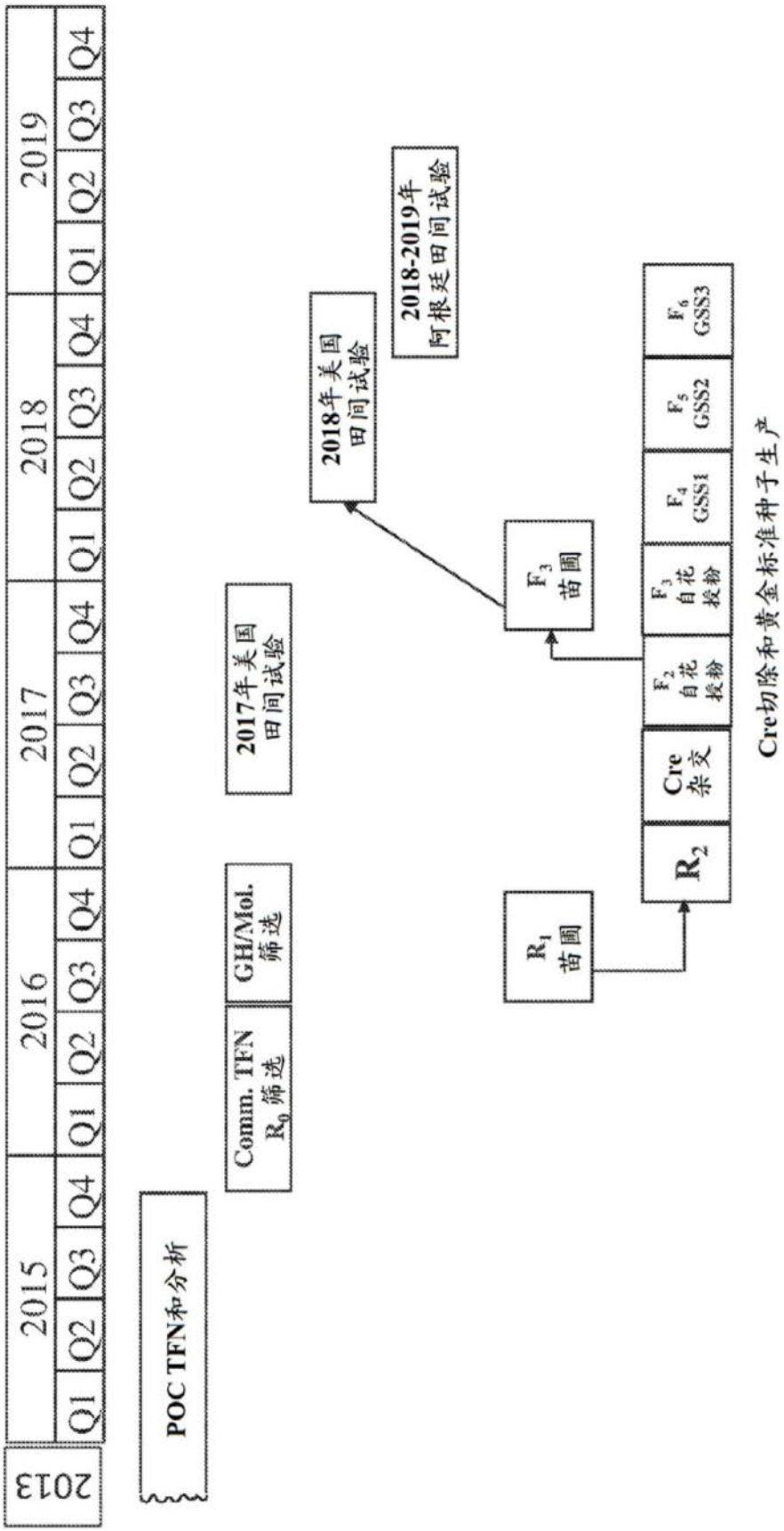

2013
2015
2016
2017
2018
2019
Q1
Q2
Q3
Q4
POC TFN和分析
Comm. TFN
R0 筛选
GH/Mol.
筛选
2017年美国
田间试验
2018年美国
田间试验
2018-2019年
阿根廷田间试验
R1
苗圃
R2
Cre
杂交
F2
自花
授粉
F3
苗圃
F3
自花
授粉
F4
GSS1
F5
GSS2
F6
GSS3
Cre切除和黄金标准种子生产

图3