



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1690211 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200510071997.0

A01H 1/02(2006.01)

(22) 申请日 2000.12.06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

CN 1219065 C, 2005.09.14, 权利要求 1-45.

09/457,037 1999.12.08 US

审查员 邢云龙

(62) 分案原申请数据

00816880.6 2000.12.06

(73) 专利权人 拜尔生物科学公司

地址 比利时根特

(72) 发明人 G·德博特 M·德博克勒尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 50 页 附图 5 页

(54) 发明名称

杂交春油料种子油菜及其生产方法

(57) 摘要

本发明涉及转基因春油料种子油菜(springoilseed rape;SOSR)植物、植物材料和种子,其特征在于拥有特异的转化事件。它涉及春油料种子油菜植物,更具体地涉及一对尤其适于产生杂交种子的春油料种子油菜植物。更具体地,一种植物的特征为雄性不育,因为在它的基因组中存在雄性不育基因,而另一种植物的特征为携带育性恢复基因,可阻止雄性不育基因的活性。本发明进一步提供了产生杂交种子的方法、产生转基因 SOSR 植物油或植物的方法以及鉴定转基因植物、细胞或组织的方法。也描述了用于鉴定包含本发明的原种事件之转基因植物的试剂盒。本发明的 SOSR 植物将形成杂交种子的能力与最佳总体农业性能、遗传稳定性以及对不同遗传背景的适应性结合起来。

1. 春油料种子油菜植物细胞,其特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度在 195 和 235bp 之间的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 23 和 SEQ ID No 41。

2. 权利要求 1 的植物细胞,其特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增长度为 215bp 的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 23 和 SEQ ID No 41。

3. 权利要求 1 的植物细胞,其进一步的特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度在 260 和 300bp 之间的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19。

4. 权利要求 3 的植物细胞,其特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度为 280bp 的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19。

5. 权利要求 1 至 4 中任意一项的植物细胞,其为杂交植物细胞。

6. 春油料种子油菜植物细胞,其特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度在 260 和 300bp 之间的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19。

7. 权利要求 6 的植物细胞,其特征在于可使用所述植物细胞的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增长度为 280bp 的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19。

8. 产生杂交种子的方法,所述方法包含:

a) 将转基因、雄性不育的春油料种子油菜植物与育性恢复春油料种子油菜植物杂交,其中所述转基因、雄性不育春油料种子油菜植物的特点为可使用所述植物的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度在 260 和 300bp 之间的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19;其中所述育性恢复春油料种子油菜植物包含稳定整合入基因组的育性恢复基因,其中育性恢复基因包含:

- 编码核糖核酸酶抑制剂的 DNA,和

- 组成型启动子;其中所述 DNA 在同一转录单位中且在所述组成型启动子的控制下;并且

b) 从该雄性不育春油料种子油菜植物收获该杂交种子。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述育性恢复植物的特征为可使用所述植物的基因组 DNA,经聚合酶链反应扩增出长度为 215bp 的 DNA 片段,两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 23 和 SEQ ID No 41。

杂交春油料种子油菜及其生产方法

[0001] 本申请是申请日为 2000 年 12 月 6 日的发明名称为“杂交冬油料种子油菜及其生产方法”的中国专利申请 00816880.6 (PCT/EP00/12872) 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及春油料种子油菜 (spring oilseed rape ;SOSR) 植物,更具体地涉及一对尤其适于产生杂交种子的春油料种子油菜植物。更具体地,一种植物的特征为雄性不育,因为在其基因组中存在雄性不育基因,而另一种植物的特征为携带可阻止雄性不育基因活性的育性恢复基因。本发明的这对 SOSR 植物将形成杂交种子的能力与最佳总体农学性能、遗传稳定性以及对不同遗传背景的适应性相结合。

[0003] 此处引用的所有文献皆列入本文作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] 转基因在植物中的表型表达由该基因自身的结构及其在植物基因组中的位置来决定。同时转基因在基因组的不同位置存在时,可以不同方式影响植物的总体表型。通过遗传操作对植物从农业上或工业上成功导入商业感兴趣的性状是一个漫长的、受不同因素影响的过程。经遗传转化的植物的实际转化和再生只是一系列选择步骤的第一步,其中所述选择步骤包括广泛的遗传鉴定、育种及野外试验的评估。

[0006] 油料种子油菜 (Oilseed rape, OSR) (欧洲油菜 (*Brassica napus*), AACC, $2n = 38$) 为天然杂交产物,其来自油菜 (甘蓝 (*Brassica oleracea*), CC, $2n = 18$) 和芜菁 (芸苔, AA, $2n = 20$) 的种间杂交。冬油料种子油菜在八月的最后 10 天及九月的前 10 天播种,并在来年七月收获,其需要一段气候温和的时期进行春化作用。较快生长的春油菜在三月末和四月初播种,并在八月中至九月收获。目前生长的 OSR 主要类型为低芥酸和高芥酸品种。双低 (00) 品种含低 (通常少于 1%) 水平的芥酸 (发现人类对其难于消化) 和低水平的芥子油甙 (其使油渣副产品难于被动物消化)。目前“00”品种的用途包括用于人类消耗的油及用于喂养动物的高蛋白质饲料。工业用途包括药物及液压油供给原料。高芥酸油菜 (HEAR) 品种因为其芥酸含量 - 在油中的含量一般为 50-60% 油而被专门种植。HEAR 主要的最终用途为产生芥酸酰胺,后者为聚乙烷生产中使用的“增滑剂”。小部分用于产生山萘醇,将其加至蜡样的粗矿物油中以提高后者的流动性。

[0007] 油料种子油菜植物为两性的,一般 60-70% 为自花传粉。作为选择基础,杂交体的产生和遗传变异的导入通常依赖于对自然发生现象 (例如自身不相容性和细胞质雄性不育) 的适应。在 OSR 育种中未广泛使用人工授粉控制法例如手工去雄或使用杀配子剂,分别是因为它们有限的实用性和高成本。

[0008] 已开发了用于产生雄性或雌性不育植物的转基因方法,它们提供了有意义的常规技术替代方法。

[0009] EP 0, 344, 029 描述了用于获得核雄性不育的体系,其中将植物用雄性不育基因转化,所述雄性不育基因包含例如在绒毡层特异启动子 PTA29 控制下的编码芽孢杆菌 RNA 酶的 DNA,当该基因掺入植物中后,可选择性破坏绒毡层细胞。用此嵌合基因转化烟草及油

料种子油菜植物可导致花粉形成完全受阻的植物 (Mariani 等,1990,自然 (Nature)347:737-741)。

[0010] 为恢复雄性不育植物之子代的育性,开发了这样的体系,其中雄性不育植物与携带育性恢复基因的转基因植物杂交,当育性恢复基因表达时可抑制或阻止雄性不育基因的活性 (US 5,689,041 ;US 5,792,929)。此育性恢复基因被置于指导其至少在表达雄性不育基因的细胞中表达的启动子的控制下。Mariani 等 (1992,自然 357:384-387) 表明由 pTA29 :芽孢杆菌 RNA 酶基因编码的不育性可被油料种子油菜中嵌合的 pTA29 :芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因恢复。

[0011] De Block 和 De Brouwer(1993,Planta 189:218-225) 描述了欧洲油菜植物花药发育之细胞化学和组织化学分析,其中所述植物只包含嵌合 pTA29 :芽孢杆菌 RNA 酶基因或包含 pTA29 :芽孢杆菌 RNA 酶基因和 pTA29 :芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因。

[0012] 已通过一些方法获得了对芸苔属种的成功转化,包括农杆菌感染 (其描述见例如 EP 0,116,718 和 EP 0,270,882)、微粒轰击法 (其描述于例如 Chen 等,1994,理论与应用遗传学 (Theor. Appl. Genet.)88:187-192) 及直接的 DNA 摄入 (其描述于例如 De Block 等,1989,植物生理学 (PlantPhysiol.)914:694-701 ;Poulsen,1996,植物育种 (Plant Breeding)115:209-225)。

[0013] 但前述文献对本发明未起到教导及提示作用。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及一对尤其适于产生杂交种子的 WOSR 植物。更具体地,本发明涉及第一种转基因 WOSR 植物或其种子、细胞或组织和第二种转基因 WOSR 植物或其种子、细胞或组织,其中前者含有整合入其基因组中的、包含雄性不育基因的表达盒,后者含有整合入其基因组中的、包含育性恢复基因的表达盒,本发明还涉及通过第一种和第二种植物杂交所得到的杂交种子,其含有整合入其基因组中的雄性不育基因和 / 或育性恢复基因。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,第一种 WOSR 植物或其种子、细胞或组织包含 pTHW107 表达盒。在本发明的优选实施方案中,第一种 WOSR 植物或其种子、细胞或组织包含事件 MS-BN1。在本发明的另一个实施方案中,第二种 WOSR 植物或其种子、细胞或组织包含 pTHW1118 表达盒。在本发明的优选实施方案中,该 WOSR 植物或其种子、细胞或组织包含事件 RF-BN1。在本发明的一个尤其优选的实施方案中,第一种 WOSR 植物包含事件 MS-BN1,且第二种 WOSR 植物包含事件 RF-BN1,且由它们获得的杂交种子包含事件 MS-BN1 和 RF-BN1 或只包含 RF-BN1。

[0017] 本发明涉及转基因 WOSR 种子或可由此类种子生长出的植物,其基因组 DNA 具有下列一个或两种特征:

[0018] a) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组,优选地至少三组,更优选地至少四组,最优选地五组限制性片段组:

[0019] i) 含两条 EcoRI 片段的组,一条的长度在 2140 和 2450bp 之间,优选地约 2266bp,且一条的长度大于 14kbp;

[0020] ii) 含两条 EcoRV 片段的组,其中一条的长度在 1159 和 1700bp 之间,优选地约 1.4kbp,且另一条的长度大于 14kbp;

[0021] iii) 含两条 HpaI 片段的组,一条的长度在 1986 和 2140bp 之间,优选地长度约

1990bp, 且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2229bp ;

[0022] iv) 含三条 AflIII 片段的组, 一条的长度在 514 和 805bp 之间, 优选地长度约 522bp, 且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2250bp, 且一条的长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地约 2477bp ;

[0023] v) 含两条 NdeI 片段的组, 两者的长度均在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一条约为 6500bp, 且另一条约为 10kbp ;

[0024] 其中每一条限制性片段在标准的严紧条件下可与包含 PTA29- 芽孢杆菌 RNA 酶序列的 3942bp 长的片段杂交, 其中所述 3942bp 长的片段可通过用 HindIII 消化此处描述的质粒 pTHW107 获得 ; 和 / 或

[0025] b) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组, 优选地至少三组, 更优选地至少四组限制性片段组 :

[0026] i) 含三条 BamHI 片段的组, 其中一条长度在 805 和 1099bp 之间, 优选地约为 814bp, 一条长度在 1700 和 1986bp 之间, 优选地约为 1849bp, 一条长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地约为 2607bp, 且一条长度在 5077 和 14057bp 之间, 优选地约为 6500bp ;

[0027] ii) 含四条 EcoRI 片段的组, 一条片段在 805 和 1159bp 之间, 优选地约为 1094bp, 一条长度在 1986 和 2450bp 之间, 优选地约为 2149bp, 以及两条长度在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一条约为 7000bp, 且一条长度约为 10kbp ;

[0028] iii) 含两条 EcoRV 片段的组, 其中两者长度均在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一条长度约为 5.4kbp, 且另一条长度约为 8kbp ;

[0029] iv) 含三条 HindIII 片段的组, 其中一条片段的长度在 1700 和 2140bp 之间, 优选地约为 1969bp, 且两条长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地一条长度约为 2565bp, 且一条长度约为 2635bp ;

[0030] 其中每一条限制性片段在标准的严紧条件下可与包含 PTA29- 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂序列的 2182bp 长的片段杂交, 其中所述 2182bp 长的片段可通过用 HpaI 消化此处描述的质粒 pTHW118 获得。

[0031] 本发明涉及 WOSR 植物的种子或可由此类种子生长出的植物、或其细胞或组织, 其基因组 DNA 具有下列一个或两个特征 :

[0032] a) 基因组 DNA 可产生至少两组, 优选地至少三组, 例如至少四组, 更优选五组限制性片段组, 所述片段组选自在上述 a) 中描述的、包含在上述 a) i), ii), iii), iv) 和 v) 中的限制性片段组, 因而选择可包括上述 a) 中描述的 i), ii), iii), iv) 和 v) 的任一组合 ; 和 / 或

[0033] b) 基因组 DNA 可产生至少两组, 优选地至少三组, 最优选地四组限制性片段组, 所述片段组选自在上述 b) 中描述的、包含在上述 b) i), ii), iii) 和 iv) 中的限制性片段组, 因而选择可包括在上述 b) 中描述的 i), ii), iii) 和 iv) 的任一组合。

[0034] 本发明进一步涉及 WOSR 种子或可由此类种子生长出的植物, 其基因组 DNA 具有下列一个或两个特征 :

[0035] c) 可以使用基因组 DNA, 经用聚合酶链反应扩增出长度在 260 和 300bp 之间, 优选地约为 280bp 的 DNA 片段, 两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19, 和 / 或

[0036] d) 可以使用基因组 DNA, 经聚合酶链反应扩增出长度在 195 和 235bp 之间, 优选地约为 215bp 的 DNA 片段, 两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 23 和 SEQ ID No 41。

[0037] 本发明进一步涉及 WOSR 种子或可由此类种子生长的植物, 其基因组 DNA 具有上述 a) 和 c) 中的特征和 / 或上述 b) 和 d) 中的特征。

[0038] 本发明涉及 WOSR 植物的种子或可由此类种子生长出的植物, 其基因组 DNA 具有下列一个或两个特征:

[0039] a) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组, 优选地至少三组, 更优选地至少四组, 最优选地五组限制性片段组:

[0040] i) 含两条 EcoRI 片段的组, 一条的长度在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2266bp, 且一条的长度大于 14kbp;

[0041] ii) 含两条 EcoRV 片段的组, 其中一条的长度在 1159 和 1700bp 之间, 优选地约 1.4kbp, 且另一条的长度大于 14kbp;

[0042] iii) 含两条 HpaI 片段的组, 一条的长度在 1986 和 2140bp 之间, 优选地长度约 1990bp, 且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2229bp;

[0043] iv) 含三条 AflIII 片段的组, 一条的长度在 514 和 805bp 之间, 优选地长度约 522bp, 且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2250bp, 且一条的长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地约 2477bp;

[0044] v) 含两条 NdeI 片段的组, 两者的长度均在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一条约为 6500bp, 且另一条约为 10kbp;

[0045] 其中每一条限制性片段在标准的严紧条件下可与包含 PTA29- 芽孢杆菌 RNA 酶序列的 3942bp 长的片段杂交, 其中所述 3942bp 长的片段可通过用 HindIII 消化此处描述的质粒 pTHW107 获得; 和 / 或

[0046] c) 可使用基因组 DNA, 经用聚合酶链反应扩增出长度在 260 和 300bp 之间, 优选地约为 280bp 的 DNA 片段, 两条引物分别具有 SEQ ID No12 和 SEQ ID No 19 的核苷酸序列。

[0047] 本发明涉及 WOSR 植物, 优选为雄性不育植物的种子, 或可由此类种子生长出的植物, 或其细胞或组织, 其基因组 DNA 具有: 可产生至少两组, 优选地至少三组, 更优选地五组限制性片段组, 所述片段组选自上述的、包含在上述 i), ii), iii), iv) 和 v) 中的限制性片段组, 因而选择可包括上述 i), ii), iii), iv) 和 v) 的任一组合。

[0048] 本发明进一步涉及 WOSR 植物的种子, 或可由此类种子生长出的植物, 其基因组 DNA 具有下列一个或两个特征:

[0049] b) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组, 优选地至少三组, 更优选地四组限制性片段组:

[0050] i) 含三条 BamHI 片段的组, 其中一条长度在 805 和 1099bp 之间, 优选地约为 814bp, 一条长度在 1700 和 1986bp 之间, 优选地约为 1849bp, 一条长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地约为 2607bp, 且一条长度在 5077 和 14057bp 之间, 优选地约为 6500bp;

[0051] ii) 含四条 EcoRI 片段的组, 一条片段在 805 和 1159bp 之间, 优选地约为 1094bp, 一条长度在 1986 和 2450bp 之间, 优选地约为 2149bp, 以及两条长度在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一条约为 7000bp, 且一条长度约为 10kbp;

[0052] iii) 含两条 EcoRV 片段的组, 其中两者长度均在 5077 和 14057bp 之间, 优选地一

条长度约为 5.4kbp, 且另一条长度约为 8kbp ;

[0053] iv) 含三条 HindIII 片段的组, 其中一条片段的长度在 1700 和 2140bp 之间, 优选地约为 1969bp, 且两条长度在 2450 和 2838bp 之间, 优选地一条长度约为 2565bp, 且一条长度约为 2635bp ;

[0054] 其中每一条限制性片段在标准的严谨条件下可与包含 PTA29- 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂序列的 2182bp 长的片段杂交, 其中所述 2182bp 长的片段可通过用 HpaI 消化此处描述的质粒 pTHW118 获得 ; 和 / 或

[0055] d) 可使用基因组 DNA, 经聚合酶链反应扩增出长度在 195 和 235bp 之间, 优选地约为 215bp 的 DNA 片段, 两条引物分别具有 SEQ ID No 23 和 SEQ ID No 41 的核苷酸序列。

[0056] 本发明涉及 WOSR 植物, 优选为育性恢复植物的种子, 或可由此类种子生长出的植物、或其细胞或组织, 其基因组 DNA 可产生选自上述的、包含在上述 b) i), ii), iii) 和 iv) 中的限制性片段组中的至少两组, 优选地至少三组, 最优选地四组限制性片段组, 因而选择可包括上述 b) 中描述的 i), ii), iii) 和 iv) 的任一组合。

[0057] 本发明涉及转基因 WOSR 植物、细胞、组织或种子, 其优选地分别具有上述 b) 和 / 或 d) 这两者的特性。

[0058] 本发明进一步涉及转基因植物, 优选为杂交的育性得以恢复的 WOSR 植物、细胞、组织或种子, 它们是通过将雄性不育植物与具有上述特征的、本发明的育性恢复植物杂交而获得的, 因而育性得以恢复的植物、细胞组织或种子具有雄性不育的分子特征和上述育性恢复 WOSR 植物的特征。本发明进一步涉及转基因植物, 优选为杂交 WOSR 植物、细胞、组织或种子, 它们是通过将雄性不育植物与具有上述分子特征的、本发明之育性恢复植物杂交而获得的, 因而杂交植物、细胞组织或种子具有上述育性恢复 WOSR 植物的分子特征。

[0059] 本发明也涉及保藏于 ATCC 保藏号为 PTA-730 的种子、由该种子生长出的植物以及该种子长出的植物之细胞或组织。本发明进一步涉及可通过由保藏于 ATCC 保藏号为 PTA-730 的种子长出的 WOSR 植物的繁殖和 / 或育种而获得的植物。

[0060] 本发明进一步涉及产生杂交 WOSR 种子的方法, 其包括将本发明的雄性不育 WOSR 植物与本发明的育性恢复植物杂交。

[0061] 本发明进一步涉及包含重组 DNA 的 WOSR 植物、植物细胞、植物组织或种子, 其中所述重组 DNA 含有整合入部分染色体 DNA 的至少一种序列为 SEQ ID No 22 的转基因和 / 或至少一种序列为 SEQ ID No 34 的转基因。

[0062] 本发明进一步提供了产生 WOSR 植物的转基因细胞或由其获得的植物的方法, 该方法包括将序列特征为 SEQ ID No 22 的重组 DNA 分子插入 WOSR 细胞的部分染色体 DNA, 并且任选地, 由转化的 WOSR 细胞再生 WOSR 植物。

[0063] 本发明进一步提供了产生 WOSR 植物的转基因细胞或由其获得的植物的方法, 该方法包括将序列特征为 SEQ ID No 34 的重组 DNA 分子插入 WOSR 细胞的部分染色体 DNA, 并且任选地, 由转化的 WOSR 细胞再生 WOSR 植物。

[0064] 本发明进一步涉及鉴定包含本发明之原种事件 MS-BN1 的转基因植物、或其细胞或组织的方法, 该方法包括建立的转基因植物或其细胞或组织的基因组 DNA 的下列一个或两个特征 :

[0065] a) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组, 优选地至少三组, 更

优选地至少四组,最优选地五组限制性片段组:

[0066] i) 含两条 EcoRI 片段的组,一条的长度在 2140 和 2450bp 之间,优选地约 2266bp,且一条的长度大于 14kbp;

[0067] ii) 含两条 EcoRV 片段的组,其中一条的长度在 1159 和 1700bp 之间,优选地约 1.4kbp,且另一条的长度大于 14kbp;

[0068] iii) 含两条 HpaI 片段的组,一条的长度在 1986 和 2140bp 之间,优选地长度约 1990bp,且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间,优选地约 2229bp;

[0069] iv) 含三条 AflIII 片段的组,一条的长度在 514 和 805bp 之间,优选地长度约 522bp,且一条的长度在 2140 和 2450bp 之间,优选地约 2250bp,且一条的长度在 2450 和 2838bp 之间,优选地约 2477bp;

[0070] v) 含两条 NdeI 片段的组,两者的长度均在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条约为 6500bp,且另一条约为 10kbp;

[0071] 其中每一条限制性片段在标准的严紧条件下可与包含 PTA29-芽孢杆菌 RNA 酶序列的 3942bp 长的片段杂交,其中所述 3942bp 长的片段可通过用 HindIII 消化此处描述的质粒 pTHW107 获得;和/或

[0072] c) 可使用基因组 DNA,根据本文所述的 PCR 鉴定方法,扩增出长度在 260 和 300bp 之间,优选地约为 280bp 的 DNA 片段,两条鉴定原种事件的引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID No 12 和 SEQ ID No 19。

[0073] 本发明进一步涉及鉴定包含本发明之原种事件 RF-BN1 的转基因植物、或其细胞或组织的方法,该方法包含建立转基因植物或其细胞或组织的基因组 DNA 的下列一个或两个特征:

[0074] b) 基因组 DNA 可产生选自以下限制性片段组中的至少两组,优选地至少三组,更优选地四组限制性片段组:

[0075] i) 含三条 BamHI 片段的组,其中一条长度在 805 和 1099bp 之间,优选地约为 814bp,一条长度在 1700 和 1986bp 之间,优选地约为 1849bp,一条长度在 2450 和 2838bp 之间,优选地约为 2607bp,且一条长度在 5077 和 14057bp 之间,优选地约为 6500bp;

[0076] ii) 含四条 EcoRI 片段的组,一条片段在 805 和 1159bp 之间,优选地约为 1094bp,一条长度在 1986 和 2450bp 之间,优选地约为 2149bp,以及两条长度在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条约为 7000bp,且一条长度约为 10kbp;

[0077] iii) 含两条 EcoRV 片段的组,其中两者长度均在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条长度约为 5.4kbp,且另一条长度约为 8kbp;

[0078] iv) 含三条 HindIII 片段的组,其中一条片段的长度在 1700 和 2140bp 之间,优选地约为 1969bp,且两条长度在 2450 和 2838bp 之间,优选地一条长度约为 2565bp,且一条长度约为 2635bp;

[0079] 其中每一条限制性片段在标准的严紧条件下可与包含 PTA29-芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂序列的 2182bp 长的片段杂交,其中所述 2182bp 长的片段可通过用 HpaI 消化此处描述的质粒 pTHW118 获得,和/或

[0080] d) 可使用基因组 DNA,用此处描述的 PCR 鉴定方法扩增出长度在 195 和 235bp 之间,优选地约为 215bp 的 DNA 片段,鉴定该原种事件的两条引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID

No 23 和 SEQ ID No 41。

[0081] 本发明也涉及用于鉴定包含本发明原种事件 MS-BN1 的植物的试剂盒,所述试剂盒包含核苷酸序列为 SEQ ID No. 12 和 SEQ ID No. 19 的 PCR 探针。

[0082] 本发明进一步涉及用于鉴定包含本发明原种事件 RF-BN1 的植物的试剂盒,所述试剂盒包含核苷酸序列为 SEQ ID No. 23 和 SEQ ID No. 41 的 PCR 探针。

[0083] 本发明也涉及用于鉴定生物样本中的原种事件 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的试剂盒,该试剂盒包含至少一条特异引物或探针,其具有的序列对应于 (或互补于) 与 MS-BN1 特定区域具有 80% 至 100% 序列同一性的序列,和 / 或包含至少一条特异引物或探针,其具有的序列对应于 (或互补于) 与 RF-BN1 特定区域具有 80% 至 100% 序列同一性的序列。优选的探针序列对应于包含 MS-BN1 和 / 或 RF-BN15' 或 3' 侧翼区部分的特定区域。最优选地,该特异探针具有 (或互补于) 这样的序列,对于 MS-BN1 而言,它与 SEQ ID No. 36 或 SEQ ID No. 38 的植物 DNA 序列具有 80% 至 100% 序列同一性或与 RF-BN1 而言,它与 SEQ ID No. 39 或 SEQ ID No. 40 的植物 DNA 序列具有 80% 至 100% 序列同一性。

[0084] 优选地,本发明的试剂盒除了包含一条特异性识别 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的 5' 或 3' 侧翼区的引物外,还包含第二条特异性识别 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的外源 DNA 序列的引物,以用于 PCR 鉴定方法。优选地,本发明的试剂盒包含两条 (或多条) 特异引物,其中一条识别 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的 5' 或 3' 侧翼区中的序列,最优选地,MS-BN1SEQ ID No. 36 或 SEQ ID No. 38 的植物 DNA 区域的序列,或对于 RF-BN1SEQ ID No. 39 或 SEQ ID No. 40 的植物 DNA 区域的序列,且另一条识别 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的外源 DNA 中的序列。特别优选地,识别 MS-BN15' 侧翼区植物 DNA 序列的引物包含 SEQ ID No. 19 的核苷酸序列。尤其是,识别 MS-BN15' 侧翼区的植物 DNA 序列的引物包含 SEQ ID No. 19 的核苷酸序列,识别 MS-BN1 的外源 DNA 的引物包含此处描述的 SEQ ID No. 12 的核苷酸序列。尤其优选地,识别 RF-BN15' 侧翼区的植物 DNA 序列的引物包含 SEQ ID No. 41 的核苷酸序列。尤其地,识别 RF-BN15' 侧翼区的植物 DNA 序列的引物包含 SEQ ID No. 41 的核苷酸序列且识别 RF-BN1 的外源 DNA 的引物包含此处描述的 SEQ ID No. 23 的核苷酸序列。

[0085] 本发明包含的方法和试剂盒可用于不同的目的,例如但不限于下列目的:用于鉴定植物、植物材料或产品中的 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1,其中所述产品例如但不限于包含或衍生于植物材料的食物或饲料产品 (新鲜或加工过的);另外,本发明的方法和试剂盒可用于鉴定转基因植物材料,目的在于将转基因材料和非转基因材料分开;另外,本发明的方法和试剂盒可用于确定含 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的植物材料之质量 (即纯材料百分比)。

[0086] 应理解本文提及的从属权利要求描述了本发明具体的实施方案。

[0087] 附图简述

[0088] 下文以实例方式进行的详述不用于将本发明限制于所述的具体实施方案,其可通过结合附图来理解,附图于此处引用作为参考,其中:

[0089] 图 1 :pVE113 的质粒图谱

[0090] 图 2 :MS-BN1 基因组 DNA 消化后得到的限制性图谱

[0091] 用 Southern 印迹分析凝胶的加样顺序:泳道 1,用 EcoRI 消化 MS-BN1DNA,泳道 2,用 EcoRV 消化 MS-BN1DNA,泳道 3,用 HpaI 消化 MS-BN1DNA,泳道 4,用 AflIII 消化 MS-BN1DNA,泳道 5,用 NdeI 消化 MS-BN1DNA,泳道 6,用 BamHI 消化非转基因 WOSR DNA,泳道

7, 用 BamHI 消化非转基因 WOSR+ 用 BamHI 消化对照质粒 pTHW107DNA。

[0092] 图 3. RF-BN1 基因组 DNA 消化后得到的限制性图谱

[0093] 用 Southern 印迹分析凝胶的加样顺序:泳道 1, 用 BamHI 消化 RF-MS1DNA, 泳道 2, 用 EcoRI 消化 RF-BN1DNA, 泳道 3, 用 EcoRV 消化 RF-BN1DNA, 泳道 4, 用 HindIII 消化 RF-BN1DNA, 泳道 5, 用 BamHI 消化非转基因 WOSR DNA, 泳道 6, 用 BamHI 消化非转基因 WOSR+ 用 BamHI 消化对照质粒 pTHW118DNA。

[0094] 图 4. 用 MS-BN1PCR 鉴定方法对不同品系的 PCR 分析

[0095] 凝胶的加样顺序:泳道 1, DNA 样本来自包含转基因事件 MS-BN1 的 OSR 植物, 泳道 2, DNA 样本来自包含另一转基因事件的 OSR 植物, 泳道 3, DNA 样本来自野生型 OSR, 泳道 4, 阴性对照(水), 泳道 5, 分子量标志物(100bp 梯带)。

[0096] 图 5. 用 RF-BN1PCR 鉴定方法对不同品系的 PCR 分析

[0097] 凝胶的加样顺序:泳道 1, DNA 样本来自包含转基因事件 RF-BN1 的 OSR 植物, 泳道 2, DNA 样本来自包含另一转基因事件的 OSR 植物, 泳道 3, DNA 样本来自野生型 OSR, 泳道 4, 阴性对照(水), 泳道 5, 分子量标志物(100bp 梯带)。

[0098] 发明详述

[0099] 此处所用的术语“基因”指的是任一 DNA 序列, 其包含一些可操作连接的 DNA 片段, 例如启动子和 5' 非翻译区(5' UTR), 它们一起形成启动子区域, 编码区(其编码或不编码蛋白质)以及包含聚腺苷酸化位点的 3' 非翻译区(3' UTR)。在植物细胞中通常 5' UTR、编码区和 3' UTR 转录为 RNA, 其在为蛋白质编码基因的情况下被翻译为蛋白质。基因可包括额外的 DNA 片段, 例如内含子。如此处所用, 基因座为某个指定基因在植物基因组中的位置。

[0100] 当提到基因或 DNA 序列时所用的术语“嵌合”是指这样的基因或 DNA 序列, 其包含至少两种相互间为非天然连接的, 且例如来自不同来源的、功能相关的 DNA 片段(例如启动子、5' UTR、编码区、3' UTR、内含子)。谈到某植物种的“外源”基因或 DNA 序列指的是在该植物中该基因或 DNA 序列为非天然发现的, 或在该植物种的该基因座中该基因或 DNA 序列为非天然发现的。此处所用术语“外源 DNA”指作为转化的结果而掺入植物基因组的 DNA 序列。此处所用“转化 DNA”指用于转化的重组 DNA 分子。转化 DNA 通常包含可将一种或多种特异的特性赋予被转化植物的至少一种“目标基因”(例如嵌合基因)。术语“重组 DNA 分子”用于例证和可包含分离的核酸分子, 其可为 DNA 且其可通过重组或其它方法获得。

[0101] 此处所用的术语“转基因”指掺入植物基因组的目的基因。“转基因植物”指在其所有细胞的基因组中包含至少一种转基因的植物。

[0102] 在本发明的植物中存在的外源 DNA 优选地包含两种目的基因, 更具体地, 或为雄性不育基因和除草剂抗性基因, 或为育性恢复基因和除草剂抗性基因。

[0103] 此处所用术语“雄性不育基因”指的是这样的基因, 其在植物中表达后, 使植物不能产生能育的、能活的花粉。雄性不育基因的实例为包含编码芽孢杆菌 RNA 酶之 DNA 序列的基因, 其中编码芽孢杆菌 RNA 酶的 DNA 序列处于介导其于绒毡层细胞中表达的启动子的控制下。更具体地, 本发明的雄性不育基因为此处描述的“TA29- 芽孢杆菌 RNA 酶”。

[0104] 此处所用的“育性恢复基因”指的是这样的基因, 其在含有雄性不育基因的植物中表达后, 可阻止雄性不育基因的表型表达, 使该植物恢复育性。更具体地, 育性恢复基因包含编码可阻止雄性不育基因表型表达的蛋白质或多肽的 DNA, 其中所述 DNA 处于介导其至

少在表达雄性不育基因的细胞中表达的启动子的控制下。更具体地,本发明的育性恢复基因因为此处所述的“TA29- 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂”。

[0105] 植物基因组中重组 DNA 分子的掺入通常来自细胞或组织的转化(或来自另一种遗传操作)。掺入的具体位点或是随机的或是事先决定的位置(如果用靶向整合方法的话)。

[0106] 外源 DNA 可表征为重组 DNA 分子在植物基因组中掺入位点的位置和构型。重组 DNA 在植物基因组中的插入位点也称为“插入位点”或“目标点”。植物基因组中转基因的插入与植物 DNA 的缺失相关,称为“目标位点缺失”。此处所用的“侧翼区”或“侧翼序列”指的是这样的序列,其为植物基因组的至少 20bp 序列,优选地至少 50bp 序列,以及高达 5000bp 的序列,其位于紧挨着外源 DNA 的上游且邻近于外源 DNA,或位于紧挨着外源 DNA 的下游且邻近于外源 DNA。导致外源 DNA 随机整合的转化步骤会产生具有不同侧翼区的转化子,对每一次转化而言它们是特有的和唯一的。当转基因通过常规的杂交导入植物时,其在植物基因组中的插入位点或其侧翼区一般不改变。此处所用的“插入区”指的是对应于至少 40bp,优选地至少 100bp,以及高达超过 10000bp 的区域,其包含在(未转化的)植物基因组中转基因的上游和下游侧翼区中且包括插入位点(以及可能的目标位点缺失)。考虑到由于种内突变引起的小差异,插入区与包含那个种中指定植物的外源 DNA 上游和下游侧翼区的序列保持至少 85%,优选地 90%,更优选地 95%,且最优选地 100%序列同一性。

[0107] 目的基因的表达指的是:通过转化,将重组 DNA 分子-转化 DNA-导入(基于部分或全部目的基因的结构和功能),而赋予植物一个或多个表型特征(例如除草剂抗性)。

[0108] “事件”定义为作为遗传操作结果的(人工的)基因座,其携带包含至少一拷贝目的基因的外源 DNA。一个事件的一般等位基因状态为外源 DNA 的存在或缺失。此处所用的“MS”事件和“RF”事件分别指携带“TA29- 芽孢杆菌 RNA 的特征为一个或多个转基因的表达。在基因水平上,事件是植物基因组成的一部分。在分子水平上,事件的特征在于转基因的限制性酶切图谱(例如通过 Southern 印迹确定)和/或转基因的上游和/或下游侧翼序列,和/或转基因的分子构型。通常用包含至少一种目的基因的转化 DNA 转化植物,导致多个事件,其中每一个均为唯一的。

[0109] 此处所用的“原种事件”为基于转基因的表达和稳定性以及与含有它的植物之最佳农艺学特性的相容性而从一组事件选择的事件,其通过用同一转化 DNA 转化或通过与此类转化所获得的植物回交而获得。因此原种事件选择的标准为一种或多种,优选地两种或多种,有利地为所有下列标准:

[0110] a) 转基因的存在不降低其它所期望有的植物特性,例如那些与农学特性或商业价值相关的特性;

[0111] b) 事件的特征在于充分定义的稳定遗传之分子构型,且可开发用于鉴定对照的合适诊断工具;

[0112] c) 在事件的杂合(或半合子)和纯合子的情况下,转基因中的目标基因在一系列的环境条件下以商业可接受水平显示正确、合适且稳定的空间和时间表型表达,其中携带事件的植物可能处于常规的农业用途;

[0113] 优选外源 DNA 与植物基因组的某个位置有关,其中所述位置允许基因掺入所期望的商业遗传背景。

[0114] 事件作为原种事件的情形通过将原种事件掺入不同的相关遗传背景并且观察例

如上述 a), b) 和 c) 中的一个、两个或所有标准而证实。

[0115] 另外,对于此处描述的编码雄性不育和育性恢复的转基因,对原种事件的选择也取决于这些事件间的相容性,更具体地携带雄性不育事件的植物与携带育性恢复事件的植物杂交所产生的子代中存在两种事件,所述子代具有以下特征:

[0116] a) 育性恢复表型即雄性育性的充分表型表达,以及

[0117] b) 在一系列的环境条件下,表型表达为商业可接受的水平,其中携带两个事件的植物可能处于常规的农业用途;

[0118] 因此“原种事件”指的是包含转基因的基因座,其满足上述标准。植物、植物材料或子代例如种子可在其基因组中包含一个或多个原种事件。

[0119] 开发用于鉴定原种事件或鉴定包含原种事件的植物或植物材料之“诊断工具”是基于原种事件的特定基因组特性,例如包含外源 DNA 的基因组区域之特定的限制性图谱和/或转基因侧翼区的序列。此处所用的“限制性图谱”指的是用特定的限制性酶或一组限制性酶酶切植物基因组 DNA 并在标准的严紧条件下与探针杂交后获得的一组 Southern 印迹模式,其中所述探针与转基因具有序列相似性。此处所用标准严紧条件指的是此处所述的用于杂交的条件或由 Sambrook 等 (1989) (分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港实验室出版社,纽约 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY)) 描述的常规杂交条件,其例如包括以下步骤: 1) 将植物基因组 DNA 固定在滤膜上, 2) 将滤膜用 50% 甲酰胺, 5X SSPE, 2X Denhardt's 试剂和 0.1% SDS, 42°C 预杂交 1 至 2 小时, 或用 6X SSC, 2X Denhardt's 试剂和 0.1% SDS, 68°C 预杂交 1 至 2 小时, 3) 加入已标记的杂交探针, 4) 孵育 16 至 24 小时, 5) 用 1X SSC, 0.1% SDS 室温洗滤膜 20 分钟, 6) 洗滤膜三次, 20 分钟, 每次在 68°C 于 0.2X SSC, 0.1% SDS, 以及 7) 用增感屏将滤膜于 -70°C 暴露于 X-射线胶片 24 至 48 小时。

[0120] 由于(内源)限制性位点在外源 DNA 掺入之前已存在于植物基因组中,外源 DNA 的插入将改变基因组的特定限制性图谱。这样由其衍生的特定转化子或子代可通过一种或多种特定的限制性模式鉴定。决定事件的限制性图谱的条件在“限制性图谱鉴定方法”中给出。另外,一旦已对转基因的一个或两个侧翼区进行了测序,可在“PCR 鉴定方法”中开发特异性识别这种(这些)序列的 PCR-探针。包含原种事件的植物或植物材料可用这些特异引物按照 PCR 方法通过试验鉴定。

[0121] 如此处所用“生物样本”为植物、植物材料或含有植物材料的产品之样本。术语“植物”包含在任一成熟阶段的 WOSR(欧洲油菜)植物组织以及取自或衍生于任一此类植物的任一细胞、组织或器官,包括(但不限于)任一种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。此处所用的“植物材料”指的是来自或衍生于植物的材料。包含植物材料的产品涉及到食物、饲料或其它用植物材料产生的或可被植物材料污染的产品。应该明白在本发明的上下文中,此类生物材料优选地用于测试 MS-BN1 和/或 RF-BN1 特异核酸的存在,暗示样本中存在核酸。因此此处所指的用于鉴定生物样本中的原种事件 MS-BN1 和/或 RF-BN1 的方法优选地涉及鉴定包含原种事件生物样本中的核酸。

[0122] 此处所用的“试剂盒”指的是:以本发明方法实施为目的的一套试剂,更具体地,指的是鉴定生物样本中原种事件 MS-BN1 和/或 RF-BN1 的一套试剂。更具体地,本发明试剂盒的一个优选的实施方案包含如上所述的至少一条或两条特异引物。任选地,试剂盒可

进一步包含此处 PCR 鉴定方法中描述的任一其它试剂。另外,根据本发明的另一个实施方案,该试剂盒可包括如上所述的一条特异探针,其与生物样本的核酸特异性杂交以鉴定其中 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的存在。任选地,该试剂盒可进一步包含任一其它试剂(例如但不限于杂交缓冲液、标记物),用于用特异探针鉴定生物样本中 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1。

[0123] 可使用本发明的试剂盒,试剂盒的组分可特异地调节,以用于质量控制(例如种子批次的纯度),检测植物材料或包含或衍生于植物材料的材料中(例如但不限于食物或饲料产品)的原种事件。

[0124] 本发明涉及在 WOSR 中产生一组原种事件, MS-BN1 和 RF-BN1, 包含这些事件的植物, 这些植物杂交所获得的子代, 衍生于这些事件的植物细胞或植物材料。包含原种事件 MS-BN1 的植物通过如实施例 1 所述, 用 pTHW107 转化而获得。包含原种事件 RF-BN1 的植物也通过如实施例 1 所述的转化 pTHW118 而获得。

[0125] 用于产生原种事件 MS-BN1 的重组 DNA 分子包含编码芽孢杆菌 RNA 酶分子的 DNA 序列, 其在介导其选择性地在绒毡层细胞中表达的启动子的控制下(称为“TA29-芽孢杆菌 RNA 酶”)。该 TA29 启动子在 OSR 中具有“绒毡层选择的”表达模式(De Block 和 Debrouwer, *Plant* 189:218-225, 1993)。TA29-芽孢杆菌 RNA 酶基因在 WOSR 植物的表达导致绒毡层被破坏, 使植物雄性不育(Mariani 等, 1990, 见上)。用于产生原种事件 RF-BN1 的重组 DNA 分子包含编码芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂分子的 DNA 序列, 其在绒毡层特异的启动子的控制下(称为“TA29-芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂”)。在植物中存在“TA29-芽孢杆菌 RNA 酶”基因时, TA29-芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因在 WOSR 植物中的表达可阻止芽孢杆菌 RNA 酶在植物的绒毡层细胞中的活性, 阻止了对绒毡层的破坏, 并因此在这些植物中恢复育性(Mariani 等, 1992, 见上)。

[0126] 用于产生原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 的重组 DNA 两者均额外包含编码膦丝菌素乙酰转移酶以及花椰菜花叶病毒(Cauliflower Mosaic Virus)35S 启动子的 DNA 序列, 其中编码膦丝菌素乙酰转移酶的序列在 35S 启动子的控制下(称为“35S-bar”)。该 35S 启动子在 OSR 中为“组成型”表达模式, 指的是它在大多数植物的生活周期中在大多数细胞类型中显著表达。35S-bar 基因在 OSR 植物的表达赋予其对除草剂化合物的抗性, 如膦丝菌素或双丙氨酰膦或草铵膦, 或更通常是谷氨酰胺合成酶抑制剂或其盐类或旋光异构体。

[0127] 包含 MS-BN1 的 WOSR 植物或植物材料可根据此处的实施例 5 中描述的 MS-BN1 限制性图谱鉴定方法来鉴定。简而言之, WOSR 基因组 DNA 用所选择的下列限制性酶(优选地 2 至 5 种): EcoRI、EcoRV、NdeI、HpaI、AflIII 消化, 然后转移至尼龙膜并与质粒 pTHW107(或包含在其中的 T-DNA) 的 3942bp HindIII 片段杂交。然后确定所用的每一种限制性内切酶是否可鉴定出下列片段:

[0128] -EcoRI: 一个片段在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2266bp, 且一个片段大于 14kbp;

[0129] -EcoRV: 一个片段在 1159 和 1700bp 之间, 优选地约 1.4kbp, 且一个片段的长度大于 14kbp;

[0130] -HpaI: 一个片段在 1986 和 2140bp 之间, 优选地长度约 1990bp, 且一个片段在 2140 和 2450bp 之间, 优选地约 2229bp;

[0131] -AflIII: 一个片段在 514 和 805bp 之间, 优选地长度约 522bp, 且一个片段在 2140

和 2450bp 之间,优选地约 2250bp,且一个片段在 2450 和 2838bp 之间,优选地约 2477bp ;

[0132] -NdeI :两条片段的长度均在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条约为 6500bp,且另一条约为 10kbp ;

[0133] DNA 片段的长度通过与一组已知长度的 DNA 片段,尤其是与噬菌体 λ DNA 的 PstI 片段比较来确定。当按照 Dellaporta 等 (1983, PlantMolecular Biology Reporter, 1, 第 3 卷, 19-21 页) 的方法提取 DNA 时,估计大于 14kbp 的片段的长度在 14kbp 和 40kbp 之间。

[0134] 如果用至少两种,优选地至少三种,尤其是至少四种,更尤其是用所有这些限制性酶消化植物材料后,产生具有上述同样长度的 DNA 片段,则该 WOSR 植物确定为拥有原种事件 MS-BN1。

[0135] 包含 MS-BN1 的植物或植物材料也可用此处实施例 5 描述的 MS-BN1PCR 鉴定方法进行鉴定。简而言之, WOSR 基因组 DNA 用引物进行 PCR 扩增,其中一条引物特异性识别 MS-BN1 的侧翼序列,优选地识别此处描述的 MS-BN1 之 5' 或 3' 侧翼序列,尤其是引物具有 SEQ ID No 19 的序列,另一条引物识别转基因中的序列,尤其是引物具有 SEQ ID No 12 的序列。内源的 WOSR 引物用作对照。如果植物材料产生在 260 和 300bp 间的片段,优选地约 280bp,该 WOSR 植物确定为拥有原种事件 MS-BN1。

[0136] 拥有 MS-BN1 的植物表型特征为:当它们的基因组中缺乏恢复基因时,它们为雄性不育。雄性不育植物被定义为不能产生能育的、能活的花粉。

[0137] 拥有 MS-BN1 的植物例如,可从含有 MS-BN1 的种子获得,其中所述种子保藏在 ATCC,保藏号为 PTA-730。此类植物可进一步繁殖以将本发明的原种事件导入相同植物种的其它栽培品种

[0138] 包含 RF-BN1 的 WOSR 植物或植物材料可根据此处的实施例 5 中描述的 RF-BN1 限制性图谱的鉴定方法来鉴定。简而言之, WOSR 基因组 DNA 用所选择的下列限制性酶(优选地 2 至 4 种):BamHI、EcoRI、EcoRV 和 HindIII 消化,然后转移至尼龙膜并与质粒 pTHW118(或包含在其中的 T-DNA) 的 2182bp HpaI 片段杂交。然后确定所用的每一种限制性内切酶是否可鉴定出下列片段:

[0139] -BamHI :一个片段在 805 和 1099bp 之间,优选地约为 814bp,一个片段在 1700 和 1986bp 之间,优选地约为 1849bp,一个片段在 2450 和 2838bp 之间,优选地约为 2607bp,且一个片段在 5077 和 14057bp 之间,优选地约为 6500bp ;

[0140] -EcoRI :一个片段在 805 和 1159bp 之间,优选地约为 1094bp,一个片段在 1986 和 2450bp 之间,优选地约为 2149bp,以及两个片段在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条约为 7000bp,且一条长度约为 10kbp ;

[0141] -EcoRV :两个片段均在 5077 和 14057bp 之间,优选地一条长度约为 5.4kbp,且另一条长度约为 8kbp ;

[0142] -HindIII :一个片段的长度在 1700 和 2140bp 之间,优选地约为 1969bp,且两个片段在 2450 和 2838bp 之间,优选地一条长度约为 2565bp,且一条长度约为 2635bp ;

[0143] DNA 片段的长度通过与一组已知长度的 DNA 片段,尤其是与噬菌体 λ DNA 的 PstI 片段比较来确定。

[0144] 如果用至少两种,优选地至少三种,更尤其是用所有这些限制性酶消化植物材料后,产生具有上述同样长度的 DNA 片段,则该 WOSR 植物确定为拥有原种事件 RF-BN1。

[0145] 包含 RF-BN1 的植物或植物材料也可用此处实施例 5 描述的 RF-BN1PCR 鉴定方法进行鉴定。简而言之, WOSR 基因组 DNA 用引物进行 PCR 扩增, 其中一条引物特异性识别 RF-BN1 的侧翼序列, 优选地识别此处描述的 RF-BN1 之 5' 或 3' 侧翼序列, 尤其是引物具有 SEQ ID No 41 的序列, 另一条引物识别转基因中的序列, 尤其是引物具有 SEQ ID No 23 的序列。内源的 WOSR 引物用作对照。如果植物材料产生在 195 和 235bp 间的片段, 优选地约 215bp, 该 WOSR 植物确定为拥有原种事件 RF-BN1。

[0146] 拥有 RF-BN1 的植物特征为: 在绒毡层细胞中表达芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂。在植物的绒毡层细胞中芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂的产生显示出对花粉的产生既无益处也无害处 (Mariani 等, 1992, 见上)。这样当植物基因组中缺乏雄性不育基因时, 该 TA29- 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因将不导致可观察到的表型。当植物基因组中存在雄性不育基因时, 该 TA29- 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因将导致育性恢复, 即能育的表型。将具有育性恢复表型的植物定义为这样的植物, 尽管在其基因组中存在雄性不育基因, 该植物能产生能育的、能活的花粉。

[0147] 拥有 RF-BN1 的植物例如可从种子获得, 其中所述种子保藏在 ATCC, 保藏号为 PTA-730。此类植物可进一步繁殖和 / 或用于常规育种方案以将本发明的原种事件导入相同植物种的其它栽培品种。

[0148] 拥有 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的植物的特征还在于它们的草铵膦耐受性, 在本发明的上下文中它们包括耐受除草剂 Liberty™ 的植物。Liberty™ 耐受性的定义标准为: 在 3 至 4 叶阶段 (3V to 4V) 用至少 200 克活性成分 / 公顷 (g. a. i. /ha), 优选地 400g. a. i. /ha, 也可能高达 1600g. a. i. /ha 喷洒植物时, 不杀死该植物。拥有 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的植物的特征还在于用 PAT 测定法测出它们的细胞中存在膦丝菌素乙酰转移酶 (DeBlock 等, 1987, 见前)。

[0149] 本发明的 WOSR 植物可用常规方法培育。35S-bar 基因的存在使它们对草铵膦具耐受性。因此在生长此类 WOSR 植物的田间可通过使用包含草铵膦作为活性成分的除草剂 (例如 Liberty™) 控制杂草。

[0150] 拥有 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 的植物的特征还在于具有与在美国市售的 WOSR 品种相当的农学特征。相关的农学特征为: 植物高度、秆的强度或硬度、倒伏倾向、冬季顽强度、抗碎性、耐干旱性、抗病性 (Black leg, Light leafspot, Sclerotinia) 以及谷物生产和产量。

[0151] 已观察到此处描述的欧洲油菜 WOSR 植物基因组的插入区存在外源 DNA, 更具体地在欧洲油菜 WOSR 植物基因组的这些插入位点处存在外源 DNA 时, 可赋予包含这些事件之植物特别感兴趣的表型和分子特征。更具体地, 在这些植物基因组的特定区存在外源 DNA 可导致转基因稳定的表型表达, 而没有显著性危及到植物的任一其它理想的农学特性方面, 使得它们尤其适于产生杂交 WOSR。这样, 对应于 SEQ ID No 22 和 SEQ ID No 34 的插入区, 更具体地为其中的 MS-BN1 和 RF-BN1 插入位点, 显示为尤其适于目的基因的导入。更具体地, MS-BN1 (SEQ ID No 22) 的插入区和 RF-BN1 (SEQ ID No 34) 的插入区, 或其中的 MS-BN1 和 RF-BN1 各自的插入位点, 尤其适于分别导入包含雄性不育基因和育性恢复基因的质粒, 可确保植物中这些基因的每一个或两者的最佳表达, 同时不危及到植物的农学特性。

[0152] 重组 DNA 分子可通过靶向插入方法特定插入插入区。此类方法为本领域技术

人员公知,包含例如用重组酶进行同源重组,其中重组酶例如但不限于来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 FLP 重组酶 (美国专利 5,527,695),来自大肠杆菌噬菌体 P1 的 CRE 重组酶 (已公开的 PCT 专利申请 WO 9109957),来自鲁氏糖酵母 (*Saccharomyces rouxii*) pSRI 的重组酶 (Araki 等,1985,分子生物学杂志 (*J Mol Biol*) 182:191-203),或如美国专利 4,673,640 中描述的 λ 噬菌体重组系统。

[0153] 此处所用关于核苷酸序列 (DNA 或 RNA) 的“序列同一性”指的是:具有的相同核苷酸的位置数除以两个序列中的较短序列的核苷酸数目。两个核苷酸序列的排列用 Wilbur 和 Lipmann 算法 (Wilbur 和 Lipmann,1983) 进行,所用窗口大小为 20 个核苷酸,字长为 4 个核苷酸且缺口罚分为 4。例如可用 Intelligenetics™ Suite 程序 (Intelligenetics Inc.,CA) 方便地进行计算机辅助分析并解释序列数据,包括上述的序列排列。当此类序列的序列同一性为至少约 75%,尤其是至少约 80%,更尤其是至少约 85%,更尤其是约 90%,特别是约 95%,更特别是约 100%,更特别是完全一致时,序列被表示为“基本相似”。这样当 RNA 序列被说成是与 DNA 序列基本相似或具有某种程度的序列同一性时,应清楚 DNA 序列中的胸腺嘧啶 (T) 认为与 RNA 序列中的尿嘧啶 (U) 是相同的。

[0154] 此处所用的“包含”可解释为使所述特征、整数、步骤或组成的存在如所指的具体化,但不排除另外的一个或多个特征、整数、步骤、组成或组的存在。这样例如包含核苷酸或氨基酸序列的核酸或蛋白质可包含较实际所引用的要多的核苷酸或氨基酸,即包括在较大的核酸或蛋白质中。包含功能上或结构上确定的 DNA 序列之嵌合基因可包含额外的 DNA 序列等。

[0155] 下列实例描述了拥有原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 的 WOSR 植物的产生及特征。

[0156] 除非另外指出,所有的重组 DNA 技术均按照描述的标准方法进行,描述见 Sambrook 等 (1989),分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港实验室出版社,纽约以及 Ausubel 等, (1994) 分子生物学最新方法 (Current Protocols in Molecular Biology),第 1 和 2 卷,最新方法,美国。植物分子研究的标准材料和方法的描述见 BIOS Scientific Publications Ltd(UK) 和 Blackwell Scientific Publications, UK R.D.D.Croy 出版的植物分子生物学 (Plant Molecular Biology) Labfax (1993)。

[0157] 在描述和实施例中,参照以下序列:

[0158] SEQ ID No 1:质粒 pTHW107

[0159] SEQ ID No 2:质粒 pTHW118

[0160] SEQ ID No 3:引物 248

[0161] SEQ ID No 4:引物 249

[0162] SEQ ID No 5:引物 247

[0163] SEQ ID No 6:引物 250

[0164] SEQ ID No 7:引物 251

[0165] SEQ ID No 8:引物 254

[0166] SEQ ID No 9 引物 258

[0167] SEQ ID No 10:引物 SP6

[0168] SEQ ID No 11:引物 T7

[0169] SEQ ID No 12:引物 201 (BNA01)

- [0170] SEQ ID No 13 :包含 MS-BN15' 侧翼区的序列
- [0171] SEQ ID No 14 :引物 611
- [0172] SEQ ID No 15 :引物 259
- [0173] SEQ ID No 16 :引物 260
- [0174] SEQ ID No 17 :引物 24
- [0175] SEQ ID No 18 :包含 MS-BN13' 侧翼区的序列
- [0176] SEQ ID No 19 :引物 51 (BNA02)
- [0177] SEQ ID No 20 :引物 48
- [0178] SEQ ID No 21 :包含 MS-BN1 目标位点缺失的序列
- [0179] SEQ ID No 22 :插入区 MS-BN1
- [0180] SEQ ID No 23 :引物 193 (BNA03)
- [0181] SEQ ID No 24 :包含 RF-BN15' 侧翼区的序列
- [0182] SEQ ID No 25 :引物 286
- [0183] SEQ ID No 26 :引物 314
- [0184] SEQ ID No 27 :引物 315
- [0185] SEQ ID No 28 :引物 316
- [0186] SEQ ID No 29 :引物 288
- [0187] SEQ ID No 30 :包含 RF-BN13' 侧翼区的序列
- [0188] SEQ ID No 31 :引物 269
- [0189] SEQ ID No 32 :引物 283
- [0190] SEQ ID No 33 :引物 284
- [0191] SEQ ID No 34 :整合区 RF-BN1
- [0192] SEQ ID No 35 :引物 57
- [0193] SEQ ID No 36 :包含 WOSR 中 MS-BN15' 侧翼区的序列
- [0194] SEQ ID No 37 :引物 68
- [0195] SEQ ID No 38 :包含 WOSR 中 MS-BN13' 侧翼区的序列
- [0196] SEQ ID No 39 :包含 WOSR 中 RF-BN15' 侧翼区的序列
- [0197] SEQ ID No 40 :包含 WOSR 中 RF-BN13' 侧翼区的序列
- [0198] SEQ ID No 41 :引物 268 (BNA04)
- [0199] SEQ ID No 42 :引物 BNA05
- [0200] SEQ ID No 43 :引物 BNA06

实施例

[0201] 实施例 1. 用雄性不育基因和恢复基因转化欧洲油菜

[0202] a) 构建包含在绒毡层特异启动子控制下的芽孢杆菌 RNA 酶基因的嵌合 DNA (pTHW107)

[0203] 质粒 pTHW107 (SEQ ID No. 1) 基本上衍生自中间载体 pGSV1. PGSV1 自身衍生自 pGSC1700 (Cornelissen 和 Vandewieue, 1989), 但包含人工 T- 区, 该人工 T- 区由 pTiB6S3 的 TL-DNA 之左和右边界序列和多接头克隆位点组成, 允许在 T-DNA 边界重复序列之间插

入嵌合基因。pGSV1 载体在质粒的主框架上提供芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因并提供用于在 *E. coli* 中表达的调节信号。

[0204] 表 1 对包含在 pTHW107 边界重复序列之间的 DNA 进行了充分描述：

[0205] 表 1：质粒 pTHW107 的 T-DNA

[0206]

nt 位置	方向	描述及参考文献
1-25		来自 pTiB6S3 的 TL-DNA 之右边界重复序列 (Gielen 等 (1984) <i>TheEMBOJournal</i> 3 :835-846).
26-97		合成的多接头衍生序列
309-98	逆时针	pTiB6S3 的 TL-DNA 基因 7 的 3' 非翻译末端 (3' g7) (Velten 和 Schell. (1985) <i>核酸研究 (NucleicAcids Research)</i> 13 :6981-6998 ;Dhaese 等 (1983) <i>The EMBOJournal</i> 3 :835-846).
310-330		合成的多接头衍生序列
882-331	逆时针	吸水链霉菌 (<i>Streptomyceshygroscopicus</i>) 的双丙氨酰磷抗性基因 (bar) 的编码序列 (Thompson 等 (1987) <i>TheEMBOJournal</i> 6 :2519-2523)。野生型 bar 基因编码区 N- 末端的两个密码子已分别用密码子 ATG 和 GAC 替换。
2608-883	逆时针	拟南芥 (<i>Arabidopsisthaliana</i>) 的 atS1A 核酮糖 -1,5- 磷酸氢盐羧化酶小亚单位基因的启动子 (PssuAra) (Krebbers 等 (1988) <i>植物分子生物学</i> 11 :745-759)。
2609-2658		合成的多接头衍生序列
2919-2659	逆时针	来自 pTiT37 中 T-DNA 的胭脂碱合成酶基因 3' 非翻译末端 (3' nos) 的 260bpTaqI 片段并包含植物聚腺苷酸化信号 (Depicker 等 (1982), <i>分子和应用遗传学杂志 (JournalofMolecularandAppliedGenetics)</i> 1 : 561-573).
2920-3031		解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillusamyloliquefaciens</i>) 的芽孢杆菌 RNA 酶编码序列的 3' 非翻译区下游

nt 位置	方向	描述及参考文献
3367-3032	逆时针	解淀粉芽孢杆菌的芽孢杆菌 RNA 酶基因编码区 (Hartley (1988) 分子生物学杂志 202 :913-915).
4877-3368	逆时针	来自烟草 (Nicotianatabacum) 的花药特异基因 TA29 的启动子区。该启动子包含从 ATG 起始密码子起始的 1.5kb 上游序列 (Seurinck 等 (1990) 核酸研究 18 : 3403).
4878-4921		合成的多接头衍生序列
4922-4946		来自 pTiB6S3 的 TL-DNA 之左边界重复序列 (Gielen 等 (1984) TheEMBOJournal3 :835-846).

[0207] b) 构建包含在组成型启动子控制下的芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因的嵌合 DNA (pTHW118)

[0208] 质粒 pTHW118 (SEQ ID No. 2) 也基本上衍生自中间载体 pGSV1 (描述见上)。表 2 给出了包含在 pTHW118 边界重复序列之间的 DNA 的充分描述：

[0209] 表 2 : 质粒 pTHW118 的 T-DNA

[0210]

nt 位置	方向	描述及参考文献
1-25		来自 pTiB6S3 之 TL-DNA 的右边界重复序列 (Gielen 等 (1984) TheEMBOJournal3 :835-846).
26-53		合成的多接头衍生序列
54-90		TL-DNA 在右边界重复序列的残留序列。
91-97		合成的多接头衍生序列
309-98	逆时针	pTiB6S3 的 TL-DNA 基因 7 的 3' 非翻译末端 (3' g7) (Velten 和 Schell. (1985) 核酸研究 13 :6981-6998 ; Dhaese 等 (1983) TheEMBOJournal3 :835-846).
310-330		合成的多接头衍生序列

nt 位置	方向	描述及参考文献
883-331	逆时针	吸水链霉菌的双丙氨酰膦抗性基因 (bar) 的编码序列 (Thompson 等 (1987) TheEMBOJournal6 : 2519-2523)。野生型 bar 编码区 N- 末端的两个密码子已分别用密码子 ATG 和 GAC 替换。
2608-883	逆时针	拟南芥的 atS1A 核酮糖 -1,5- 磷酸氢盐羧化酶小亚单位基因的启动子 (PssuAra) (Krebbbers 等 (1988) 植物分子生物学 11 :745-759)。
2609-2658		合成的多接头衍生序列
2919-2659	逆时针	来自 pTiT37 中 T-DNA 的胭脂碱合成酶基因 3' 非翻译区末端 (3' nos) 的 260bpTaqI 片段并包含植物聚腺苷酸化信号 (Depicker 等人 (1982) 分子和应用遗传学杂志 1 :561-573)。
2920-2940		合成的多接头衍生序列
2941-2980		解淀粉芽孢杆菌的芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂编码序列下游的 3' 非翻译区
3253-2981	逆时针	解淀粉芽孢杆菌的芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因的编码区 (Hartley (1988) 分子生物学杂志 202 :913-915)。
4762-3254	逆时针	烟草花药特异基因 T29 的启动子区。该启动子包含从 ATG 起始密码子起始的 1.5kb 上游序列 (Seurinck 等人 (1990) 核酸研究 18 :3403)。
4763-4807		合成的多聚接头衍生序列
4808-4832		来自 pTiB6S3 的 TL-DNA 之左边界重复序列 (Gielen 等 (1984) TheEMBOJournal3 :835-846)。

[0211] c) 欧洲油菜的转化

[0212] 转化欧洲油菜所用载体系统如 Deblaere 等 (1985,1987) 所述。该载体系统由农杆菌菌株和两个质粒成分组成 :1) 非致瘤性 Ti- 质粒 (pGV4000) 和 2) 基于质粒 pGSV1 的中间克隆载体。已缺失 T- 区的非致瘤性 Ti- 质粒携带 vir 基因,它是将克隆在第二个质粒上的人工 T-DNA 转移至植物基因组所需要的。由这些成分之间三亲杂交形成的农杆菌菌株可用于植物转化。

[0213] 除小植株再生外,所有阶段均用膦丝菌素 (PPT) 进行选择,缺乏 PPT 时进行小植株再生可促进其生长。这样产生了一组原初转化体 (T_0 代植物)。

[0214] 实施例 2. 事件的产生

[0215] 2.1. 转基因事件的鉴定

[0216] 2.1.1. MS 事件的 Southern 印迹分析

[0217] 用标准的 Southern 印迹分析检查转基因的存在和基因插入数。按照 Dellaporta(1983,植物分子生物学报告者 (Plant Molecular Biology Reporter), 1, 第 3 卷, 19-21 页) 或 Doyle 等, 1987, 植物化学通讯 (Phytochem. Bull.) 19:11) 从 1g 发芽组织分离总基因组 DNA 并用限制性酶 SacI 消化。在 T-DNA 片段中 SacI 具有唯一的限制性酶切位点,位于芽孢杆菌 RNA 酶和 bar 构建体之间。用以下两条探针进行 Southern 分析:

[0218] “芽孢杆菌 RNA 酶”探针:质粒 pVE113 的 478bp PstI-EcoRI 片段

[0219] “bar”探针:质粒 pDE110 的 546bp NcoI-BglIII 片段

[0220] 质粒 pVE113 和 pDE110 分别如图 1 和 WO 92/09696 所述。

[0221] MS 事件与芽孢杆菌 RNA 酶探针杂交产生一条 12Kb 条带,而与 bar 探针杂交产生一条 14Kb 条带。

[0222] 相关条带的深浅提供了植物是否与转基因位置同源或异源的指征。发现这两个事件为简单插入。这一点可通过以下事实证实:转基因的分离模式可用简单基因瘤的孟德尔遗传解释。

[0223] 2.1.2. RF 事件的 Southern 印迹分析

[0224] 用标准的 Southern 印迹分析检查转基因的存在和基因插入数。从 1g 发芽组织分离总基因组 DNA (按照 Doyle 等 1987, 植物化学通讯 19:11) 并用限制性酶 SacI 消化。在 T-DNA 片段中 SacI 具有唯一的限制性酶切位点,位于芽孢杆菌 RNA 酶和 bar 构建体之间。用以下两条探针进行 Southern 分析:

[0225] “芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂”探针:质粒 pVE113 的 436bpHindIII-PstI 片段

[0226] “bar”探针:质粒 pDE110 的 546bp NcoI-BglIII 片段

[0227] RF 事件与芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂探针杂交产生一条 3Kb 条带,而与 bar 探针杂交产生一条 14Kb 片段。

[0228] 相关条带的深浅提供了植物是否与转基因位置同源或异源的指征。发现一些事件为简单插入。这一点可通过以下事实证实:转基因的分离模式可用简单基因瘤的孟德尔遗传解释。

[0229] 2.1.3. 总体的植物表型及农业特性

[0230] 用一系列的表型性状评估含 MS and RF 事件的 T_1 植物,包括高度、杆的强度或硬度、倒伏倾向、冬季顽强度、抗碎性、耐干旱性、抗病性 (Blackleg, Light leafspot, Sclerotinia) 以及谷物生产和产量。

[0231] 与未转化的品种及一系列油料种子油菜栽培品种比较,该品系所显示出的农学特征被评估为相似 (或有所改变)。在一些情况下,植物分离用于对一个或多个上述性状进行体细胞克隆变异。除非这导致商业上感兴趣的表型性状的导入,否则弃去这些植物。

[0232] 2.2. 携带 MS 或 RF 性状之品系的产生

[0233] 从组织培养物过渡成不同的 T_0 半合子小植株 (“Ms/-“或“Rf/-“),转移至温室土

壤。用 southern 印迹分析检查转基因的存在及拷贝数（如上所述）。允许植物开花，并分别评估花的不育或育性。T₀ 植物与野生型植物（-/-）杂交以产生 T1 种子（MsT1 和 RfT1）。在温室中种植并生长 T1 种子。评估植物对草铵膦铵盐的耐受性。也评估 Ms-T1 植物的不育 / 育性分离（在未经喷洒的植物中），同时检查 Rf-T1 植物的育性花。

[0234] 使包含转基因的 Ms-T1 植物与育性恢复基因纯合的试验植物（Rf/Rf）杂交，以产生 MsRf-F1 种子。在温室种植该种子（Ms/-，Rf/- 以及 -/-，Rf/-）并喷洒 Liberty™。评估剩下的 F1 子代育性 / 不育分离，以测试在欧洲油菜中是否雄性不育特性可被足够地恢复（育性接近 100%）。

[0235] 选择最佳事件用于进一步试验。Ms-T₁ 植物与纯合的育性恢复植物杂交，并在田间种植种子。评估植物对 Liberty™ 除草剂的耐受性（以 800 克活性成分 / 公顷（g. a. i. /ha），给农民的推荐剂量为 400g. a. i. /ha），评估育性 / 不育分离及评估总体的表型特征。与野生型同基因的对照比较，选择育性 100% 恢复的且其表型或农学特性未观察到负罚分（详见（d））的品系。

[0236] 使包含转基因的 Rf-T1 植物与包含雄性不育基因的试验植物（Ms/-）杂交，以产生 F1 种子。将该种子于温室种植，喷洒 Liberty™ 并评估育性的恢复（接近 100%）。

[0237] 同时使 Rf-T1 植物自花授粉以产生 S1。该 S1 植物于温室生长，喷洒 Liberty™ 并再次自花授粉以产生 S2；从 S2 选择纯合子个体。

[0238] 2.3. MS 和 RF 事件的结合

[0239] 在温室中，将已选择的 Ms-T1 植物与已选择的 Rf-S2 事件杂交，进行育性恢复试验。将种子重新种植在温室，植物喷洒 Liberty™ 并检查花的育性。

[0240] 2.4. 在不同的遗传背景及在不同位置上试验 MS 和 RF 事件

[0241] 将已选择的事件导入两个杂合差异的不同遗传背景，以证实在任一受试背景下 MS 和 RF 事件均可发挥作用并对产量和质量无负罚分。

[0242] 同时对已选择的 MS 和 RF 事件在四个或五个不同的环境中测试，以确保环境和 MS 或 RF 事件之间没有消极的相互作用。

[0243] 在下一阶段，在田间进行了更深入的试验，用已选择的 MS 和 RF 事件产生杂交种子。使已选择的 MS 事件在其最初背景以及在两个不同的和杂合差异的背景下与已选择的 RF 事件杂交。评估 F1 杂种对 Liberty™ 的抗性、育性以及总的农学特性（产量和质量）。

[0244] 2.5. 原种事件的选择

[0245] 在产生转基因 MS 品系的过程中，上述选择步骤产生了一些原种事件，其可显示转基因的最佳表达，即对草铵膦铵盐的抗性、雄性不育表型以及对于用纯合恢复品系更具体地已选择的 RF 原种事件完全恢复育性的易感性。

[0246] 在产生转基因 RF 品系的过程中，上述选择步骤产生了一些原种事件，其可显示转基因的最佳表达，即对草铵膦铵盐的抗性以及 F1 与携带雄性不育基因，更具体地为已选择的 MS 原种事件的植物杂交后恢复育性的能力。

[0247] 实施例 3：将已选择的候选原种事件导入 WOSR

[0248] 如上所述于欧洲油菜中产生的一些 MS 和 RF 原种事件通过反复与 Drakkar 品种植物回交而导入 WOSR 栽培品种。

[0249] 检查植物并确定：

[0250] a) 外源 DNA 的存在并不降低其它所期望有的植物特性,例如那些与农学特性或商业价值相关的特性;

[0251] b) 事件的特征在于分定义的稳定遗传之分子构型;

[0252] c) 在事件杂合(或半合)和纯合的情况下,外源 DNA 中的目标基因在一系列的环境条件下以商业可接受水平显示正确、合适且稳定的空间和时间表型表达,其中携带事件的植物可能处于常规的农业用途;

[0253] 进一步地,与野生型 WOSR 种类比较来评估该植物的农学特性和性能。

[0254] 在田间的广泛试验表明:当某些春油料种子油菜的候选原种事件导入 WOSR 植物时,可使植物表现出与最佳农学性能相结合的、外源 DNA 中目的基因的充分表达。这些事件被选作 WOSR 中的 MS 和 RF 原种事件,并被分别命名为 MS-BN1 和 RF-BN1。

[0255] 实施例 4. 原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 的鉴定

[0256] 一旦 MS-BN1 和 RF-BN1 事件被鉴定为每个转基因的表达及总体农学性能均为最佳的原种事件,则于分子水平上详细分析转基因的位置。这包括详细的 Southern 印迹分析(用多个限制性酶)以及对转基因侧翼区的测序。

[0257] 4.1. 使用多个限制性酶的 Southern 印迹分析

[0258] 从转基因植物及对照植物收获叶组织。按照 Dellaporta 等(1983,植物分子生物学报告者,1,第3卷,19-21页),从叶组织分离总基因组 DNA。用分光光度计在波长为 260nm 处测定光密度来确定每种制品的 DNA 浓度。

[0259] 用限制性酶消化 10 μ g 基因组 DNA,终反应体积为 40 μ l,所用条件为厂商推荐条件。调节限制性酶的消化时间和/或量以确保基因组 DNA 样本的完全消化且无非特异性降解。消化后,将 4 μ l 加样染料加至已消化的 DNA 样本,并将它们加样至 1% 琼脂糖凝胶上。

[0260] 将下列对照 DNA 也加样至凝胶上:

[0261] - 阴性对照,由非转基因芸苔属植物制备的基因组 DNA。该阴性对照用于证实不存在背景杂交。

[0262] - DNA 阳性对照:由将杂合的单拷贝转基因整合入欧洲油菜基因组,10 μ g 基因组 DNA 与 ± 19 皮克的来自 pTHW118DNA 的 1501bpPvuI-HindIII 片段具有相同分子当量数(欧洲油菜二倍体基因组大小:0.8x10⁹bp)。将代表每个基因组一个质粒拷贝的量加至 1 μ g 消化的非转基因欧洲油菜 DNA 中。该重建样本用于显示杂交是在允许探针与靶序列杂交的条件下进行的。

[0263] 将 PstI 消化的噬菌体 λ DNA(CIind 1ts 857Sam 7 株,LifeTechnologies)用作大小标准。

[0264] 电泳后,用毛细管印迹将 DNA 样本(消化的芸苔属基因组 DNA,对照和大小标准 DNA)经 12 至 16 小时转移至尼龙膜。

[0265] 通过用 HindIII 限制性酶切消化 PTW107 制备用作 MS-BN1 事件探针制品的 DNA 模板。产生了一条包含转化 DNA 相关部分的 3942bp DNA 片段(PSSUARA 的部分,3' nos,芽孢杆菌 RNA 酶,PTA29)。

[0266] 通过用 HpaI 限制性酶切消化 PTW118 制备用作 RF-BN1 事件探针制品的 DNA 模板。产生了一条包含转化 DNA 相关部分的 2182bp DNA 片段(PSSUARA 部分,3' nos,芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂,PTA29)。

[0267] 纯化后,按照标准步骤标记 DNA 片段,并用于与膜杂交。

[0268] 在标准的严紧条件下进行杂交:在 95℃ 至 100℃ 水浴中加热 5 至 10 分钟变性标记探针,并于冰上冷却 5 至 10 分钟,加至杂交液中,其中杂交液为 (6X SSC (20X SSC 为 3.0M NaCl, 0.3M 柠檬酸钠, pH 7.0)、5X Denhardt's (100X Denhardt's = 2% Ficoll, 2% 聚乙烯吡咯烷酮, 2% 牛血清白蛋白)、0.5% SDS 和 20 μg/ml 变性载体 DNA (平均长度为 120-3000 个核苷酸的单链鱼精 DNA)。于 65℃ 过夜杂交。用洗液 (2X SSC, 0.1% SDS) 于 65℃ 洗膜三次,持续 20 至 40 分钟。

[0269] 电子扫描放射自显影。

[0270] 4.1.1. MS-BN1

[0271] 用不同的限制性酶消化 MS-BN1 基因组 DNA 后得到的限制性酶切模式于图 2 中给出,并总结在表 3 中。

[0272] 表 3:MS-BN1 的限制性图谱

[0273]

泳道数	加样 DNA	在大小标记物之间移动的杂交 DNA 片段		杂交 DNA 片段的估计长度
		大于	小于	
1	MS-BN1 – EcoRI	2140 14057	2450 -	2266 bp (*) >14 kbp
2	MS-BN1 – EcoRV	1159 14057	1700 -	1.4 kbp (*) >14 kbp
4	MS-BN1- HpaI	1986 2140	2140 2450	1990 bp 2229 bp
5	MS-BN1 – AflIII	2450 2140 514	2838 2450 805	2477 bp (*) 2250 bp 552 bp (*)
6	MS-BN1 – NdeI	5077 5077	14057 14057	10 kbp 6510 bp
7	非转基因 WOSR	-	-	-
8	对照质粒 DNA – BamHI	1700 2450	1986 2838	1966 bp (*) 2607 bp (*)

[0274] (*) 这些片段的长度为从质粒 pTHW107 的限制性图谱预测的长度。

[0275] 4.1.2. RF-BN1

[0276] 用不同的限制性酶消化 RF-BN1 基因组 DNA 后得到的限制性酶切模式于图 3 中给

出,并总结在表 4 中。

[0277] 表 4:RF-BN1 的限制性图谱

[0278]

泳道数	加样 DNA	在大小标记物之间移动的杂交 DNA 片段		杂交 DNA 片段的估计长度
		大于	小于	
1	MS-BN1 – BamHI	805	1099	814 bp
		1700	1986	1849 bp (*)
		2450	2838	2607 bp (*)
		5077	14057	6580 bp
2	MS-BN1 – EcoRI	805	1159	1094 bp
		1986	2450	2149 bp
		5077	14057	7000 bp
		5077	14057	10 kbp
3	MS-BN1 – EcoRV	5077	14057	5.4 kbp
		5077	14057	8 kbp
4	MS-BN1 – HindIII	1700	2140	1969 bp
		2450	2838	2565 bp
		2450	2838	2635 bp
6	非转基因 WOSR	-	-	-
5	对照质粒 DNA – BamHI	1700	1986	1849 bp (*)
		2450	2838	2607 bp (*)
		5077	14057	8100 bp

[0279] (*) 这些片段的长度为根据 BamHI 酶切 pTHW118 载体所得的限制性图谱而预测的长度。

[0280] 4.2. 侧翼区的鉴定

[0281] 首先鉴定已产生了原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 之春 OSR 中这些事件之侧翼区,然后检查 WOSR。

[0282] 4.2.1. MS-BN1 侧翼区的鉴定

[0283] 4.2.1.1. 右 (5') 侧翼区

[0284] 对 MS-BN1 右边界侧翼区序列,使用具延伸捕获的 (Törmanen 等,1993,NAR 20 : 5487-5488) 由连接反应介导的聚合酶链反应 (Mueller 等,1989,科学 780-786 ;Maxine 等,

1994, PCR 方法和应用 (PCR Methods and Applications), 71-75)。

[0285] 用作接头制品的寡核苷酸为：

[0286] MDB248 : (SEQ ID No. 3)

[0287] 5' CAT. GCC. CTG. ACC. CAG. GCT. AAG. TAT. TTT. AAC. TTT. AAC. CAC. TTT. GCT. CCG. ACA. GTC. CCA. TTG

[0288] MDB249 : (SEQ ID No. 4)

[0289] 5' CAA. TGG. GAC. TGT. CGG. AGG. ACT. GAG. GGC. CAA. AGC. TTG. GCT. CTT. AGC. CTG. GGT. CAG. GGC. ATG

[0290] 接头制备后, 用生物素化的基因特异引物, 由经 NcoI 消化的基因组 MS-BN1DNA 合成第一链：

[0291]

	序列(5' → 3')	在 pTHW107 中的位置
生物素化引物 MDB247	CCG.TCA.CCG.AGA.TCT.GAT. CTC.ACG.CG (SEQ ID No. 5)	322 ← 347

[0292] 然后将接头连接至第一链 DNA, 再将接头与磁珠偶联, 从其上洗脱非生物素化的链。用下列引物对该 DNA 进行大规模 PCR 扩增：

[0293]

	序列(5' → 3')	在 pTHW107 中的位置
接头引物 MDB250	GCACTGAGGGCCAAAGCTTGGCTC (SEQ ID No. 6)	-----
T-DNA 引物 MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.AGC.TA G.C (SEQ ID No. 7)	293 ← 317

[0294] 该 PCR 产生一条约 1150bp 的片段。从琼脂糖凝胶洗脱该右边界片段,

[0295] 用下列引物对该 DNA 的 100 倍稀释物进行巢式 PCR：

[0296]

	序列(5' → 3')	在 pTHW107 中的位置
巢式接头引物 MDB254	CTTAGCCTGGGTCAGGGCATG (SEQ ID No. 8)	-----
T-DNA 引物 MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.TG (SEQ ID No. 9)	224 ← 243

[0297] 该反应产生一条约 1000bp 的片段,从琼脂糖凝胶洗脱该片段、纯化,并连接至 pGem[®]-T 载体。用下列引物进行标准 PCR 反应来筛选重组质粒 DNA:

[0298]

	序列(5' → 3')	在 pTHW107 中的位置
SP6 引物	TAA.TAC.GAC.TCA.CTA.TAG.GGC.GA (SEQ ID No. 10)	- (在 pGem [®] -T 载体中的 SP6 启动子)
T7 引物	TTT.AGG.TGA.CAC.TAT.AGA.ATA.C (SEQ ID No. 11)	- (在 pGem [®] -T 载体中的 T7 启动子)
T-DNA 引物 MDB201	gCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GAC (SEQ ID No. 12)	143 ← 163

[0299] 上述反应产生下列片段:SP6-T7:1224bp

[0300] SP6-MDB201:1068bp

[0301] T7-MDB201:1044bp

[0302] 纯化右边界片段并测序(SEQ ID No. 13),得到 953bp,其中的 bp1-867 对应于植物 DNA 且 bp 868 至 953 对应于 pTHW107 的 T-DNA。

[0303] 4.2.1.2. MS-BN1 的左(3')侧翼区

[0304] 在 MS-BN1 事件中插入的转基因之侧翼的左边界区序列用 Liu 等(1995,植物杂志(The Plant Journal)8(3):457-463)所述的热不对称交错(TAIL-)PCR 法测定。该方法采用三条巢式特异引物与一条短的任意简并(AD)引物连续反应,从而可热控制特异和非特异产物的相对扩增效力。特异引物选择为与转基因的边界退火,并基于它们的退火条件。在 1%琼脂糖凝胶上分析小量(5 μl)来纯化的第二次和第三次 PCR 产物。第三次 PCR 产物用

于制备性扩增,纯化并用 DyeDeoxy Terminator 循环试剂盒在自动测序仪上测序。

[0305] 所用引物如下:

[0306]

	序列(5' → 3')	在 pTHW107 中的位置
简并引物 MDB611	NgT.CgA.SWg.TNT.WCA.A (SEQ ID No. 14)	-----
初次 TAIL MDB259	gTg.Cag.ggA.AgC.ggT.TAA.CTg.g (SEQ ID No. 15)	7164→4186
第二次 TAIL MDB260	CCT.TTg.gAg.TAA.ATg.gTg.TTg.g (SEQ ID No. 16)	4346→4366
第三次 TAIL HCA24	gCg.AAT.gTA.TAT.TAT.ATg.CA (SEQ ID No. 17)	4738→4757

[0307] 其中:N = A, C, T 或 g;S = C 或 g;W = A 或 T

[0308] 用 HCA24-MDB611 扩增的片段大约 540bp,其中的 537bp 已测序(3' 侧翼:SEQ ID No 18)。在 bp 1 和 bp 180 之间的序列包含 pTHW107DNA,而 bp 181 和 bp 537 之间的序列对应于植物 DNA。

[0309] 4.2.1.3. 靶位点缺失的鉴定

[0310] 用对应于转基因侧翼区的序列作为引物,以野生型欧洲油菜品种 Drakkar 作为模板,鉴定转基因的插入位点。

[0311] 所用引物如下:

[0312] 在 5' 侧翼中的位置 在 3' 侧翼中的位置

[0313] 序列(5' → 3') (SEQ ID No 13) (SEQ ID No 18)

[0314] VDS51 TgA. CAC. TTT. gAg. CCA. CTC. g 733 → 751 -----

[0315] (SEQ ID No. 19)

[0316] HCA48 GgA. ggg. TgT. TTT. Tgg. TTA. TC ----- 189 ← 208

[0317] (SEQ ID No. 20)

[0318] 反应产生一条 178bp 片段(SEQ ID No 21),其中 bp 132 至 150 对应于靶位点的缺失。

[0319] 4.2.1.4. MS-BN1 插入区的鉴定

[0320] 基于侧翼区的鉴定及靶位点的缺失,可确定 MS-BN1 的插入区(SEQ IDNo 22):

[0321] 1-822:5' 侧翼区 SEQ ID No 13 的 bp 46-867

[0322] 823-841 靶位点缺失 SEQ ID No 21 的 bp 132-150

[0323] 842-1198:3' 侧翼区 SEQ ID No 18 的 bp 181 至 537

[0324] 4.2.2. RF-BN1 侧翼区的鉴定

[0325] 用 Vectorette-PCR 确定 RF-BN1 边界侧翼区 (使用 Vectorette 和 Subvectorette PCR 以分离转基因侧翼 DNA, Maxine J. Allen, Andrew Collick 和 Alec J. Jeffreys PCR 方法和应用 -1994 (4), 71-75 页), 以经过 HindIII 消化的 RF-BN1 基因组 DNA 作为模板。用上述的 MDB248 (SEQ ID No. 3) 引物和 MDB249 (SEQ ID No. 4) 引物制备 Vectorette 接头。

[0326] 4.2.2.1. BN-RF1 的右 (5') 侧翼区

[0327] 所用引物如下:

[0328]

	序列(5' → 3')	在 pTHW118 中的位置
Vectorette 引物 MDB250	GCA.CTG.AGG.GCC.AAA.GCT.T GG.CTC (SEQ ID No. 6)	-----
Vectorette 引物 MDB254	CTT.AGC.CTG.GGT.CAG.GGC.A TG (SEQ ID No. 8)	-----
T-DNA 引物 MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.A GC.TAG.C (SEQ ID No. 7)	293 ← 317
T-DNA 引物 MDB193	TCA.TCT.ACG.GCA.ATG.TAC.CA G.C (SEQ ID No. 23)	226 ← 247
T-DNA 引物 MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.T G (SEQ ID No. 9)	224 ← 243
T-DNA 引物 MDB201	GCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GA C (SEQ ID No. 12)	143 ← 163

[0329] 反应产生了一条 1077bp 片段 (SEQ ID No. 24), 其中 bp 46-881 对应于植物 DNA, 且 bp 882-1060 对应于 pTHW118 的 T-DNA。

[0330] 4.2.2.2. BN-RF1 的左 (3') 侧翼区

[0331] 为鉴定原种事件 BN-RF1 的 3' 侧翼区, 如上所述进行 TAIL PCR, 使用了一条任意简并引物和多条位于 T-DNA 中的左边界附近的引物。

- [0332] 所用引物为：
- [0333] 任意简并引物：
- [0334] MDB286 NTg. CgA. SWg. ANA. WgA. A (SEQ ID No. 25)
- [0335] 其中：N = A, C, T 或 g ; S = C 或 g ; W = A 或 T
- [0336] T-DNA 引物：
- [0337] MDB314 gTA. ggA. ggT. Tgg. gAA. gAC. C (SEQ ID No. 26)
- [0338] MDB315 ggg. CTT. TCT. ACT. AgA. AAg. CTC. TCg. g (SEQ ID No. 27)
- [0339] MDB316 CCg. ATA. ggg. AAg. TgA. TgT. Agg. Agg (SEQ ID No. 28)
- [0340] 得到了一条约 2000bp 片段。将该片段克隆入 pGem[®]-T 载体，并用作使用以下引物的 PCR 反应的模板：
- [0341] 植物 DNA 引物：
- [0342] MDB288 ATg. CAg. CAA. gAA. gCT. Tgg. Agg (SEQ ID No. 29)
- [0343] T-DNA 引物：
- [0344] MDB314 gTA. ggA. ggT. Tgg. gAA. gAC. C (SEQ ID No. 26)
- [0345] 反应产生一条约 1500bp (SEQ ID No. 30) 的片段，其中 bp 17-182 对应于质粒 pTHW118 的 T-DNA，且 bp 183-1457 对应于植物 DNA。
- [0346] 4. 2. 2. 3. 靶位点缺失的分子分析
- [0347] 用 TAIL-PCR 方法克隆靶位点缺失（见上述），用 T-DNA 插入物上游的指向该插入物的野生型基因组 DNA 特异引物和植物 DNA 特异引物：
- [0348] 任意简并引物：
- [0349] MDB286 NTg. CgA. SWg. ANA. WgA. A (SEQ ID No. 25)
- [0350] 其中：N = A, C, T 或 g ; S = C 或 g ; W = A 或 T
- [0351] 植物 DNA 引物：
- [0352] MDB269 ggTTTTTCggAggTCCgAgACg (SEQ ID No. 31)
- [0353] MDB283 CTTggACCCCTAggTAAATgC (SEQ ID No. 32)
- [0354] MDB284 gTACAAAACCTTggACCCCTAgg (SEQ ID No. 33)
- [0355] 得到了一条约 1068bp (SEQ ID No. 34) 的片段，其中：
- [0356] 53-83 : 5' 侧翼区
- [0357] 84-133 : 靶位点缺失
- [0358] 134-1055 : 3' 侧翼区
- [0359] 通过插入 T-DNA，51bp 的靶位点被缺失。比较野生型基因瘤序列与 Rf3 基因瘤序列显示在右边界连接点存在填充 DNA。在右边界的该填充
- [0360] TCTCG 序列的 5' 末端侧翼为 TCA，3' 末端侧翼为 CGA。在靶位点缺失的断点和 T-DNA 的断点也分别发现存在这些三联体。在亲属关系较远的植物序列中搜寻显示了该填充 DNA 的可能起源。该 TCA. TCTCG. CGA 序列也位于植物 DNA 中靶位点缺失的 3' 末端。它是位于靶位点缺失的断点下游 209bp 处两个相同的 13bp 重复的核心序列。
- [0361] RF-BN1 插入区可被定义为包含如下的左侧翼区、靶位点缺失和右侧翼区：
- [0362] 1-836 : 5' 侧翼区 (SEQ ID No. 24 的 bp 46-881)
- [0363] 837-887 : 靶位点缺失 (SEQ ID No. 34 的 bp 84-133)

[0364] 888-21623' 侧翼区 (SEQ ID No. 30 的 bp 183-1457)

[0365] 4.3. 基因瘤的遗传分析

[0366] 对子代植物的多代进行分子和表型分析,以检查两个事件插入的遗传稳定性。

[0367] T_0 , T_1 和 T_2 代植物的 Southern 印迹分析比较事件 MS-BN1 和 RF-BN1。对每个事件而言,所得到的模式在不同的代中是相同的。这表明该转基因的分子构型在含有 MS-BN1 和 RF-BN1 的植物中是稳定的。

[0368] MS-BN1 和 RF-BN1 事件显示了,它们各自的转基因在至少接下来的三代中作为单一的基因瘤的孟德尔分离,表明插入是稳定的。

[0369] 基于上述结果,MS-BN1 和 MS-RF1 被鉴定为原种事件。

[0370] 4.4. 鉴定 WOSR 中 MS-BN1 和 RF-BN1 的侧翼序列

[0371] 用引物确定 WOSR 中原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1,其中所述引物是以春油料种子油菜中这些事件的侧翼序列为基础开发的。

[0372] 用 T-DNA 引物 (SEQ ID No. 12) 和位于 MS-BN1 右边界植物 DNA 的引物确定 MS-BN1WOSR 右 (5') 侧翼序列:

[0373] VDS57 :5' -gCA. TgA. TCT. gCT. Cgg. gAT. ggC-3' (SEQ ID No. 35)

[0374] 反应产生一条约 909bp 的片段 (SEQ ID No. 36),其序列基本上与 SEQID No. 13 序列类似 (从第 98 位核苷酸开始)。

[0375] 用 T-DNA 引物 (SEQ ID No. 17) 和位于 MS-BN1 左边界植物 DNA 的引物确定 MS-BN1WOSR 左 (3') 侧翼序列:

[0376] HCA68 :5' -CCA. TAT. Acg. CCA. gAg. Agg. AC-3' (SEQ ID No. 37)

[0377] 反应产生一条约 522bp 的片段 (SEQ ID No. 38),其序列基本上与 SEQID No. 18 序列类似。

[0378] 用 T-DNA 引物 (SEQ ID No. 12) 和位于 RF-BN1 右边界植物 DNA 的引物 (SEQ ID No. 31) 确定 RF-BN1WOSR 右 (3') 侧翼序列。反应产生一条约 694bp 的片段 (SEQ ID No. 39),其序列基本上与 SEQ ID No. 24 序列类似 (从第 293 至 980 位核苷酸)。

[0379] 用 T-DNA 引物 (SEQ ID No. 26) 和位于 RF-BN1 左边界植物 DNA 的引物 (SEQ ID No. 29) 确定 RF-BN1WOSR 左侧翼序列。反应产生一条约 1450bp 的片段,其中的 1279bp 已测序 (SEQ ID No. 40)。该序列基本上与 SEQ IDNo. 30 序列类似 (从第 141 至 1421 位核苷酸)。

[0380] 由此证实 SOSR 和 WOSR 中,原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 之左和右边界序列基本上类似。

[0381] 实施例 5 :开发用于鉴定对照的诊断工具

[0382] 开发下列方法以鉴定任一包含原种事件 MS-BN1 的 WOSR 植物材料。

[0383] 5.1. MS-BN1 和 RF-BN1 原种事件限制性图谱鉴定方法

[0384] 包含原种事件 MS-BN1 的 WOSR 植物可用与实施例 4.1. 中所述的基本相同步骤进行 Southern 印迹鉴定。这样 WOSR 基因组 DNA,1) 用下列限制性酶 :EcoRI, EcoRV, NdeI, HpaI, AflIII 中的至少两种,优选地至少三种,尤其是用至少四种,更尤其是用所述的全部限制性酶消化,2) 转移至尼龙膜,以及 3) 与质粒 pTHW107 的 3942bp HindIII 片段杂交。如果使用了至少两种限制性酶,用与实施例 4.1.1. 表 3 中所列出的相同长度的片段鉴定 DNA

片段,该 WOSR 植物可确定为拥有原种事件 MS-BN1。

[0385] 包含原种事件 RF-BN1 的 WOSR 植物可用与实施例 4.1. 中所述的基本相同步骤进行 Southern 印迹鉴定。这样 WOSR 基因组 DNA,1) 用下列限制性酶 :BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII 中的至少两种,优选地至少三种,更优选地用所述的全部限制性酶消化,2) 转移至尼龙膜,以及 3) 与质粒 pTHW118 的 2182bp HpaI 片段杂交。如果使用了至少两种限制性酶,用与实施例 4.1.2. 表 4 中所列出的相同长度片段鉴定 DNA 片段,该 WOSR 植物可确定为拥有原种事件 RF-BN1。

[0386] 5.2. MS-BN1 和 RF-BN1 原种事件聚合酶链反应鉴定方法

[0387] 在尝试筛选未知对象前,进行具有所有适当对照的试验。已有的方法可能需要优化在不同的实验室内可能不同的组分(模板 DNA 制品, TaqDNA 聚合酶,引物性质, dNTP's, 热循环仪等)。

[0388] 内源序列的扩增在方法中起到关键作用。必须达到的 PCR 和热循环条件为:对已知的转基因基因组 DNA 模板,可扩增等摩尔量的内源序列和转基因序列。在同样的溴化乙锭染色强度下用琼脂糖凝胶电泳判断时,当目标内源片段未被扩增或目标序列未被扩增时,需要优化 PCR 条件。

[0389] 5.2.1. 模板 DNA

[0390] 按照 Edwards 等,(核酸研究,19,1349 页,1991)用叶钻孔器或单种子制备模板 DNA。当所用的 DNA 是用其它方法制备而得时,需要用不同量的模板进行试验。通常 50ng 基因组模板 DNA 可产生最佳结果。

[0391] 5.2.2. 指定阳性和阴性对照

[0392] 在 PCR 运行中应包括以下阳性和阴性对照:

[0393] -基本的混合物对照(DNA 阴性对照)。此为反应中未加入 DNA 的 PCR。当观察到预期结果即无 PCR 产物时,表明该 PCR 混合物未污染靶 DNA。

[0394] -DNA 阳性对照(已知含有转基因序列的基因组 DNA 样本)。该阳性对照的成功扩增表明 PCR 是在允许靶序列扩增的条件下运行的。

[0395] -野生型 DNA 对照。此为 PCR 反应中所提供的模板 DNA 为制备自非转基因植物制备的基因组 DNA 的 PCR。当观察到预期结果,即转基因 PCR 产物未被扩增而内源 PCR 产物被扩增时,表明在基因组 DNA 样本中无可检测到的转基因背景扩增。

[0396] 5.2.3. 引物

[0397] 使用下列特异识别转基因和 MS-BN1 侧翼序列的引物:

[0398] BNA01 :5' -gCT. Tgg. ACT. ATA. ATA. CCT. gAC-3' (SEQ ID 12)

[0399] (MDB201)(靶:转基因)

[0400] BNA02 :5' -TgA. CAC. TTT. gAg. CCA. CTC. g-3' (SEQ ID 19)

[0401] (VDS51)(靶:植物 DNA)

[0402] 为鉴定包含 RF-BN1 的植物材料,使用下列特异识别转基因和 RF-BN1 侧翼序列的引物:

[0403] BNA03 :5' -TCA. TCT. ACg. gCA. ATg. TAC. CAg. C-3' (SEQ ID 23)

[0404] (MDB193)(靶:转基因)

[0405] BNA04 :5' -Tgg. ACC. CCT. Agg. TAA. ATg. CC-3' (SEQ ID 41)

[0406] (MDB268) (靶:植物 DNA)

[0407] 靶向内源序列的引物总是包含在 PCR 混合物中。这些引物可用作未知样本以及 DNA 阳性对照中的内部对照。内源引物对的阳性结果表明在基因组 DNA 制品中有质量足够好的样本 DNA,以产生 PCR 产物。所用的内源引物为:

[0408] BNA05 :5' -AAC. gAg. TgT. CAg. CTA. gAC. CAg. C-3' (SEQ ID42)

[0409] BNA06 :5' -CgC. AgT. TCT. gTg. AAC. ATC. gAC. C-3' (SEQ ID 43)

[0410] 5.2.4. 扩增片段

[0411] PCR 反应中预期的扩增片段为:

[0412] 引物对 BNA05-BNA06 :394bp (内源对照)

[0413] 引物对 BNA01-BNA02 :280bp (MS-BN1 原种事件)

[0414] 引物对 BNA03-BNA04 :215bp (RF-BN1 原种事件)

[0415] 5.2.5. PCR 条件

[0416] 50 μ l 反应体系的 PCR 混合物包含:

[0417] 5 μ l 模板 DNA

[0418] 5 μ l 10x 扩增缓冲液 (与 Taq 聚合酶同时提供)

[0419] 1 μ l 10mM dNTP's

[0420] 1 μ l BNA01 (MS-BN1) 或 BNA03 (RF-BN1) (10pmoles/ μ l)

[0421] 1 μ l BNA02 (RF-BN1) 或 BNA04 (RF-BN1) (10pmoles/ μ l)

[0422] 0.5 μ l BNA05 (10pmoles/ μ l)

[0423] 0.5 μ l BNA06 (10pmoles/ μ l)

[0424] 0.2 μ l Taq DNA 聚合酶 (5 个单位/ μ l)

[0425] 加水至 50 μ l

[0426] 为得到最佳结果,应遵循下列热循环参数:

[0427] 95°C 4 分钟

[0428] 然后:95°C 1 分钟

[0429] 57°C 1 分钟

[0430] 72°C 2 分钟

[0431] 进行 5 个循环

[0432] 然后 92°C 30 秒

[0433] 57°C 30 秒

[0434] 72°C 1 分钟

[0435] 进行 22 至 25 个循环

[0436] 然后:72°C 5 分钟

[0437] 5.2.6. 琼脂糖凝胶分析

[0438] 将 10 至 20 μ l 的 PCR 样本及合适的分子量标志物 (例如 100bp 梯度 PHARMACIA) 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶 (Tris- 硼酸盐缓冲液)。

[0439] 5.2.7. 结果验证

[0440] 转基因植物 DNA 样本的单一 PCR 循环和单一 PCR 混合物的数据不可采用,除非 1) DNA 阳性对照显示预期的 PCR 产物 (转基因和内源片段), 2) PCR 扩增的 DNA 阴性对照为阴

性（没有片段）以及 3）野生型 DNA 对照显示预期结果（内源片段扩增）。

[0441] 显示可见量的如预期大小的转基因和内源 PCR 产物的泳道表明其对应的植物（由其制备的基因组模板 DNA）已遗传了 MS-BN1 和 / 或 RF-BN1 原种事件。未显示可见量的转基因 PCR 产物之一且显示可见量的内源 PCR 产物的泳道表明其对应的植物（由其制备的基因组模板 DNA）不包含原种事件。未显示可见量的内源和转基因 PCR 产物的泳道表明基因组 DNA 的质和 / 或量不能产生 PCR 产物。这些植物不予以评价。应重复基因组 DNA 的制备，且必须进行具备合适对照的新一轮 PCR 循环。

[0442] 5.2.8. 使用识别 PCR 法鉴定 MS-BN1 和 RF-BN1

[0443] 按照上述方法对来自包含 MS-BN1，RF-BN1 或另一转基因事件之植物的 WOSR 叶材料进行试验。来自 WOSR 野生型的样本用作阴性对照。

[0444] PCR 分析结果于图 4 和 5 中阐述。

[0445] 图 4 阐述了用原种事件 PCR 鉴定法对两种 WOSR 样本中 MS-BN1 的鉴定结果（泳道 1 和 2）。认为泳道 1 包含原种事件，因为检测到了 280bp 的条带，而泳道 2 的样本不包含 MS-BN1。

[0446] 图 5 阐述了用原种事件 PCR 鉴定法对两种 WOSR 样本中 RF-BN1 的鉴定结果（泳道 1 和 2）。认为泳道 1 包含原种事件，因为检测到了 215bp 的条带，而泳道 2 的样本不包含 RF-BN1。

[0447] 实施例 6：用在 WOSR 中的 MS-BN1 和 RF-BN1 产生杂交种子

[0448] 将包含 MS-BN1 的雄性不育 WOSR 植物与 RF-BN1 纯合的 WOSR 植物杂交。收集来自 MS-BN1 的杂交种子，并保藏在 ATCC，其 ATCC 保藏号为 PTA-730。

[0449] 将该杂交种子种植在田地中。发现植物 100% 可育，且显示最佳农学特性。杂交植物或包含 MS-BN1 和 RF-BN1 两者，或只包含 RF-BN1 事件。

[0450] 实施例 7：将 MS-BN1 和 RF-BN1 导入优选的 WOSR 栽培品种

[0451] 通过将包含事件 MS-BN1 或 RF-BN1 的植物反复回交，分别将原种事件 MS-BN1 和 RF-BN1 导入许多农业上重要的 WOSR 栽培品种。

[0452] 观察到原种事件基因掺入这些栽培品种未显著影响后者任一想要的表型或农学特性（非连锁妨碍），而通过草铵膦耐受性测定，转基因的表达满足商业可接受水平。这证实事件 MS-BN1 和 RF-BN1 作为原种事件的地位。

[0453] 除非另外明确指出，在下列权利要求中所用的术语“植物”包含在任一成熟阶段的植物组织，以及取自或衍生于此类植物的任一细胞、组织或器官，没有限制地包括任一种子、叶、茎、花、根、单细胞、配子、细胞培养物、组织培养物或原生质体。

[0454] 包含原种事件 MS-BN1 和原种事件 RF-BN1 的种子或只包含原种事件 RF-BN1 保藏在美国组织培养物保藏中心 (American Tissue Culture Collection)，保藏号为 PTA-730。

[0455] 序列表

[0456] <110> 阿温提斯作物科学公司

[0457] <120> 杂交冬油料种子油菜及其生产方法

[0458] <130> EE-BN1

[0459] <140>

[0460] <141>

[0461] <160>43
 [0462] <170>PatentIn Ver. 2.0
 [0463] <210>1
 [0464] <211>4946
 [0465] <212>DNA
 [0466] <213>人工序列
 [0467] <220>
 [0468] <223>人工序列的描述:质粒 pTHW107 的 T-DNA
 [0469] <220>
 [0470] <221>misc_特征
 [0471] <222>(964)..(4906)
 [0472] <223>Hind III 片段
 [0473] <400>1
 [0474] aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg 60
 [0475] gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatgtt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa 120
 [0476] atatattattg ataaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaatattatt 180
 [0477] gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
 [0478] tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
 [0479] agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
 [0480] gggcgggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccgtg 420
 [0481] cttgaagccg gccgcccga gcatgccgcg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg 480
 [0482] cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc 540
 [0483] cagggacttc agcaggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg 600
 [0484] ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgcgtgcct tccagggggc 660
 [0485] cgcgtaggcg atgccggcga cctcgccgtc cacctcggcg acgagccagg gatagcgctc 720
 [0486] ccgcagacgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt 780
 [0487] gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatggtgcag accgccggca tgtccgcctc 840
 [0488] ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgtcg ttctgggtcc attgttcttc ttactcttt 900
 [0489] gtgtgactga ggttttgtct agtgctttgg tcactatata ataataataa caacaatgag 960
 [0490] aacaagcttt ggagtgatcg gaggtctag gatacatgag attcaagtgg actaggatct 1020
 [0491] acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat ttactttgtt aacggccaca 1080
 [0492] aaggcctaag gagaggtgtt gagaccctta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt 1140
 [0493] ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aatttgttga tgggtggagtg 1200
 [0494] gtgcttgctc attttacttg cctgggtggac ttggcccttt ctttatgggg aatttatatt 1260
 [0495] ttacttacta tagagctttc ataccttttt ttaccttgg atttagttaa tatataatgg 1320
 [0496] tatgattcat gaataaaaaat gggaaatttt tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta 1380
 [0497] ggtgaaactg tggaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgcct ttactagaa 1440
 [0498] ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500
 [0499] acagaactat gtttaaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt 1560

[0500] tacaacaagt cataagccca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620
[0501] aatattacaa atcataagcc caacaaagtt attgatcaaa aaaaaaaaaac gcccaacaaa 1680
[0502] gctaaacaaa gtccaaaaaa aactttctca gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740
[0503] ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctcctacat 1800
[0504] cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtaccttttc cgttgcaatg atattgatag 1860
[0505] tatgtttgtg aaaactaata gggttaacaa tcgaagtcag ggaatatgga tttgggtccaa 1920
[0506] gattttccga gagcttttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat 1980
[0507] caccaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga tttttcaaat 2040
[0508] gaaaacgtat gaatgttatt agtaaaggt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca 2100
[0509] gatattcaac tttaaaaatt cgatcagttg ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160
[0510] atatatataa tgctttacaa cacttggatt tttttttgga ggctggaatt tttaatctac 2220
[0511] atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta ataccttgat tttgtcaaat 2280
[0512] atatgtgttc gtgtatattt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340
[0513] atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400
[0514] tagtgcattt tttctaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460
[0515] taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520
[0516] attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac 2580
[0517] cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtaccggga attcgagctc 2640
[0518] ggtaccgggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc 2700
[0519] tagtttgccg gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760
[0520] atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat tacatgctta 2820
[0521] acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880
[0522] aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga gccggaaagt 2940
[0523] gaaattgacc gatcagagtt tgaagaaaaa tttattacac actttatgta aagctgaaaa 3000
[0524] aaacggcctc cgcaggaagc cgtttttttc gttatctgat ttttgtaaag gtctgataat 3060
[0525] ggtccgttgt tttgtaaate agccagtcgc ttgagtaaag aatccggtct gaatttctga 3120
[0526] agcctgatgt atagttaata tccgcttcac gccatgttcg tccgcttttg cccgggagtt 3180
[0527] tgccttccct gtttgagaag atgtctccgc cgatgctttt ccccgagcgc acgtctgcaa 3240
[0528] ggttcccttt tgatgccacc cagecgaggg cttgtgcttc tgattttgta atgtaattat 3300
[0529] caggtagctt atgatatgtc tgaagataat ccgcaacccc gtcaaactg ttgataaccg 3360
[0530] gtaccatggt agctaatttc ttttaagtaaa aactttgatt tgagtgatga tgttgtactg 3420
[0531] ttacacttgc accacaaggg catatataga gcacaagaca tacacaacaa cttgcaaaac 3480
[0532] taacttttgt tggagcattt cgaggaaaaa ggggagtagc aggctaattct gagggtaaca 3540
[0533] ttaaggtttc atgtattaat ttgttgcaaa catggactta gtgtgaggaa aaagtaccaa 3600
[0534] aattttgtct caccctgatt tcagttatgg aaattacatt atgaagctgt gctagagaag 3660
[0535] atgtttatcc tagtccagcc acccacctta tgcaagctct ctttttagctt gattcaaaaa 3720
[0536] ctgatttaaa ttacattgct aaatgtgcat acttcgagcc tatgtcgctt taattcgagt 3780
[0537] aggatgtata tattagtaca taaaaaatca tgtttgaate atctttcata aagtgacaag 3840
[0538] tcaattgtcc cttcttgttt ggcactatat tcaatctgtt aatgcaaatt atccagttat 3900

[0539] acttagctag atatccaatt ttgaataaaa atagctcttg attagtaaac cggatagtga 3960
 [0540] caaagtcaca tatccatcaa acttctgggtg ctctgggcta agttctgate gacatggggt 4020
 [0541] taaaatttaa attgggacac ataaatagcc tatttgtgca aatctcccca tcgaaaatga 4080
 [0542] cagattgtta catggaaaac aaaaagtcct ctgatagaag tcgcaaagta tcacaatttt 4140
 [0543] ctatcgagag atagattgaa agaagtgacg ggaagcgggt aactggaaca taacacaatg 4200
 [0544] tctaaattaa ttgcattcgc taacacaaaa gtgtattact ctctccgggt cacaataagt 4260
 [0545] tatttttttg cccttttttt atgggtccaaa ataagtgagt tttttagatt tcaaaaatga 4320
 [0546] ttttaattatt tttttactac agtgccttg gagtaaagtg tgttgagta tgtgttagaa 4380
 [0547] atgtttatgt gaagaaatag taaaggttaa tatgatcaat ttcattgcta tttaatgtta 4440
 [0548] aaatgtgaat ttcttaatct gtgtgaaaac aacacaaaaa tcacttattg tggaccggag 4500
 [0549] aaagtatata aatatatatt tggaagcgac taaaaataaa cttttctcat attatacgaa 4560
 [0550] cctaaaaaca gcatatggta gtttctaggg aatctaaatc actaaaatta ataaaagaag 4620
 [0551] caacaagtat caatacatat gatttacacc gtcaaacacg aaattcgtaa atatttaata 4680
 [0552] taataaagaa ttaatccaaa tagcctccca ccctataact taaactaaaa ataaccagcg 4740
 [0553] aatgtatatt atatgcataa tttatatatt aaatgtgtat aatcatgtat aatcaatgta 4800
 [0554] taatctatgt atatggttag aaaaagtaaa caattaatat agccggctat ttgtgtaaaa 4860
 [0555] atccctaata taatcgcgac ggatccccgg gaattccggg gaagcttaga tccatggagc 4920
 [0556] catttacaat tgaatatatc ctgccg 4946
 [0557] <210>2
 [0558] <211>4832
 [0559] <2t2>DNA
 [0560] <213> 人工序列
 [0561] <220>
 [0562] <223> 人工序列的描述 : 质粒 pTHW118 的 T-DNA
 [0563] <220>
 [0564] <221>misc_ 特征
 [0565] <222>(1883).. (4065)
 [0566] <223>HpaI 限制性片段
 [0567] <400>2
 [0568] aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg 60
 [0569] gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatgtt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa 120
 [0570] atattttattg ataaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaaca taaatttatt 180
 [0571] gatgaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
 [0572] tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
 [0573] agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
 [0574] gggcggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccgtg 420
 [0575] cttgaagccg gccgcccga gcatgccgcg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg 480
 [0576] cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaage cctgtgcctc 540
 [0577] cagggacttc agcaggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg 600

[0578] ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgcgtgcct tccaggggcc 660
 [0579] cgcgtaggcg atgccggcga cctcgccgtc cacctcggcg acgagccagg gatagcgctc 720
 [0580] ccgcagacgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt 780
 [0581] gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatgggtgcag accgccggca tgtccgcctc 840
 [0582] ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgtcg ttctgggtcc attgttcttc ttactcttt 900
 [0583] gtgtgactga ggtttggtct agtgctttgg tcatctatat ataataataa caacaatgag 960
 [0584] aacaagcttt ggagtgatcg gaggtcttag gatacatgag attcaagtgg actaggatct 1020
 [0585] acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat ttactttggg aacggccaca 1080
 [0586] aaggcctaag gagaggtgtt gagaccctta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt 1140
 [0587] ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aattgtgtga tgggtggagtg 1200
 [0588] gtgcttgctc attttacttg cctgggtggac ttggcccttt ctttatgggg aatttatatt 1260
 [0589] ttacttacta tagagctttc ataccttttt ttactttgg atttagttaa tatataatgg 1320
 [0590] tatgattcat gaataaaaat gggaaatfff tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta 1380
 [0591] ggtgaaactg tggaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgcct ttactagaa 1440
 [0592] ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500
 [0593] acagaactat gtttaattgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt 1560
 [0594] tacaacaagt cataagccca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620
 [0595] aatattacaa atcataagcc caacaaagtt attgatcaaa aaaaaaaaac gcccaacaaa 1680
 [0596] gctaaacaaa gtccaaaaaa aactttctca gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740
 [0597] ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctcctacat 1800
 [0598] cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtaccttttc cgttgcaatg atattgatag 1860
 [0599] tatgtttgtg aaaactaata ggggttaacaa tcgaagtcac ggaatatgga ttgtgtccaa 1920
 [0600] gattttccga gagcttttca gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat 1980
 [0601] caccaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga ttttcaaat 2040
 [0602] gaaaacgtat gaatgttatt agtaaattgt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca 2100
 [0603] gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtgt ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160
 [0604] atatatataa tgcttttaca cacttggatt tttttttgga ggcttgaatt tttaatctac 2220
 [0605] atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta ataccttgat ttgttcaaat 2280
 [0606] atatgtgttc gtgtatatatt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340
 [0607] atatatatat atatatata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400
 [0608] tagtgcattt ttcttaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460
 [0609] taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520
 [0610] attctttcaa attttagcta aaagtcttgg aataactaaa gaataataca caatctcgac 2580
 [0611] cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtaccggga attcgagctc 2640
 [0612] ggtaccgggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc 2700
 [0613] tagtttgcgc gctatatatt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760
 [0614] atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat tacatgctta 2820
 [0615] acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880
 [0616] aagaaacttt attgccaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga ccaagcttgc 2940

[0617] gggtttgtgt ttccatattg ttcatctccc attgatcgta ttaagaaagt atgatgggtga 3000
 [0618] tgtcgcagcc ttccgctttc gtttcacgga aaacctgaag cacactctcg gcgccatttt 3060
 [0619] cagtcagctg cttgctttgt tcaaaactgcc tccattccaa aacgagcggg tactccaccc 3120
 [0620] atccggtcag acaatcccat aaagcgtcca ggttttcacc gtagtattcc ggaagggcaa 3180
 [0621] gctccttttt caatgtctgg tggaggctgc tgatacttct gatttgttcc ccgttaatga 3240
 [0622] ctgctttttt catcggtagc taatttcttt aagtaaaaac tttagattga gtgatgatgt 3300
 [0623] tgtactgtta cacttgcacc acaagggcat atatagagca caagacatac acaacaactt 3360
 [0624] gcaaaaactaa cttttgttgg agcatttcga ggaaaatggg gagtagcagg ctaatctgag 3420
 [0625] ggtaacatta aggtttcatg tattaatttg ttgcaaact ggacttagtg tgaggaaaaa 3480
 [0626] gtacaaaaat tttgtctcac cctgatttca gttatggaaa ttacattatg aagctgtgct 3540
 [0627] agagaagatg tttattctag tccagccacc caccttatgc aagtctgctt ttagcttgat 3600
 [0628] tcaaaaactg atttaattta cattgctaaa tgtgcatact tcgagcctat gtcgctttta 3660
 [0629] ttcgagtagg atgtatatat tagtacataa aaaatcatgt ttgaatcatc tttcataaag 3720
 [0630] tgacaagtca attgtccctt cttgtttggc actatattca atctgttaat gcaaattatc 3780
 [0631] cagttatact tagctagata tccaattttg aataaaaaata gctcttgatt agtaaaccgg 3840
 [0632] atagtgacaa agtcacatat ccatcaaact tctgggtgctc gtggctaagt tctgatcgac 3900
 [0633] atgggggttaa aattttaaatt gggacacata aatagcctat ttgtgcaaat ctccccatcg 3960
 [0634] aaaatgacag attgttacat ggaaaacaaa aagtcctctg atagaagtcg caaagtatca 4020
 [0635] caattttcta tcgagagata gattgaaaga agtgcaggga agcgggttaac tggaacataa 4080
 [0636] cacaatgtct aaattaattg cattcgctaa ccaaaaagtg tattactctc tccgggtccac 4140
 [0637] aataagttat tttttggccc tttttttatg gtccaaaata agtgagtttt ttagatttca 4200
 [0638] aaaatgattt aattattttt ttactacagt gcccttggag taaatgggtg ttgagtatgt 4260
 [0639] gttagaaatg tttatgtgaa gaaatagtaa aggttaatat gatcaatttc attgctattt 4320
 [0640] aatgttaaaa tgtgaatttc ttaatctgtg tgaaaacacc aaaaaatcac ttattgtgga 4380
 [0641] ccggagaaag tatataaata tatatttggga agcgactaaa aataaacttt tctcatatta 4440
 [0642] tacgaaccta aaaacagcat atggtagttt ctagggaatc taaatcacta aaattaataa 4500
 [0643] aagaagcaac aagtatcaat acatatgatt tacaccgtca aacacgaaat tcgtaaatat 4560
 [0644] ttaatataat aaagaattaa tccaaatagc ctcccaccct atkacttaaa ctaaaaaataa 4620
 [0645] ccagcgaatg tatattatat gcataattta tatattaaat gtgtataatc atgtataatc 4680
 [0646] aatgtataat ctatgtatat ggttagaaaa agtaacaat taatatagcc ggctatttgt 4740
 [0647] gtaaaaaatcc ctaatatataat cgcgacggat ccccggaat tccggggaag cttagatcca 4800
 [0648] tggagccatt tacaattgaa tatatcctgc cg 4832
 [0649] <210>3
 [0650] <211>60
 [0651] <212>DNA
 [0652] <213> 人工
 [0653] <220>
 [0654] <223> 人工序列的描述 : 引物 248
 [0655] <400>3

[0656] catgccctga cccaggctaa gtattttaac tttaaccact ttgctccgac agtcccattg 60
[0657] <210>4
[0658] <211>60
[0659] <212>DNA
[0660] <213> 人工序列
[0661] <220>
[0662] <223> 人工序列的描述 :引物 249
[0663] <400>4
[0664] caatgggact gtcggaggac tgagggccaa agcttggtc ttagcctggg tcagggcag 60
[0665] <210>5
[0666] <211>26
[0667] <212>DNA
[0668] <213> 人工序列
[0669] <220>
[0670] <223> 人工序列的描述 :引物 247
[0671] <400>5
[0672] ccgtcaccga gatctgatct cacgcg 26
[0673] <210>6
[0674] <211>24
[0675] <212>DNA
[0676] <213> 人工序列
[0677] <220>
[0678] <223> 人工序列的描述 :引物 250
[0679] <400>6
[0680] gcactgaggg ccaaagcttg gctc 24
[0681] <210>7
[0682] <211>25
[0683] <212>DNA
[0684] <213> 人工序列
[0685] <220>
[0686] <223> 人工序列的描述 :引物 251
[0687] <400>7
[0688] ggateccccg atgagctaag ctagc 25
[0689] <210>8
[0690] <211>21
[0691] <212>DNA
[0692] <213> 人工序列
[0693] <220>
[0694] <223> 人工序列的描述 :引物 254

[0695]	<400>8	
[0696]	cttagcctgg gtcaggcat g	21
[0697]	<210>9	
[0698]	<211>20	
[0699]	<212>DNA	
[0700]	<213> 人工序列	
[0701]	<220>	
[0702]	<223> 人工序列的描述 :引物 258	
[0703]	<400>9	
[0704]	ctacggcaat gtaccagctg	20
[0705]	<210>10	
[0706]	<211>23	
[0707]	<212>DNA	
[0708]	<213> 人工序列	
[0709]	<220>	
[0710]	<223> 人工序列的描述 :引物 SP6	
[0711]	<400>10	
[0712]	taatacgact cactataggg cga	23
[0713]	<210>11	
[0714]	<211>22	
[0715]	<212>DNA	
[0716]	<213> 人工序列	
[0717]	<220>	
[0718]	<223> 人工序列的描述 :引物 T7	
[0719]	<400>11	
[0720]	tttaggtgac actatagaat ac	22
[0721]	<210>12	
[0722]	<211>21	
[0723]	<212>DNA	
[0724]	<213> 人工序列	
[0725]	<220>	
[0726]	<223> 人工序列的描述 :引物 201	
[0727]	<400>12	
[0728]	gcttgacta taatacctga c	21
[0729]	<210>13	
[0730]	<211>953	
[0731]	<212>DNA	
[0732]	<213> 人工序列	
[0733]	<220>	

- [0734] <223> 人工序列的描述 : 包含 MS-BN1 的 5' 侧翼区的序列
- [0735] <220>
- [0736] <221>misc_ 特征
- [0737] <222>(1).. (24)
- [0738] <223>pGEM[®] -T 载体
- [0739] <400>13
- [0740] cccngccgcc atggccgcgg gattcttagc ctgggtcagg gcatgcatgg tgtgatccaa 60
- [0741] agactttctc ggcccaaata ctaatcatca caagtcatgc atgatctgct cgggatggcc 120
- [0742] aagaaaaatc gaacccatga caatattcac agttgtaagt tttttaccag tagacaaata 180
- [0743] ccacttggtt taacatattg taaacttaat atatagaaga tgttcctatt cagaaaataa 240
- [0744] tatatgtata tatataaaat ttatttggcg actcgaggat gcacagaaat ataaaatggt 300
- [0745] ggctcgcttag accatctcca atgtatttct ctattttttac ctctaaaata aaggagctct 360
- [0746] ataatagagg tgggttttgc tccaatgtat ttcttttaaa tagagatctc tacatataga 420
- [0747] gcaaaatata gaggaatggt atttcttctc ctataaatag aggagaaaat agcaatctct 480
- [0748] attttagagg caaaaataga gathsgttgg agtgattttg cctctaaatg ctattataga 540
- [0749] ggtagaaaata gaggtgggtt ggagatgctc ttactatttt catagtaggt gaaaacttga 600
- [0750] aactagaaag ctttggagtg tacgagtga aaacctctct ttgtagaaac atacacatgc 660
- [0751] catttagtta actagttgac atagattttt gagtcagata actttaagaa tatatatgtt 720
- [0752] tggatgagag ttgacactt tgagccactc gaaggacaaa ttttaaaaac ttgtgggatg 780
- [0753] ctgtggccat aaaccttgag gacvstttga tcatattcta ttaactacag tacgaatatg 840
- [0754] attcgacctt tgcaattttc tcttcaggta ctcggccgct gaactcggcc gtcgagtaca 900
- [0755] tggctgataa gaaaaggcaa tttgtagatg ttaattccca tcttgaaaga aat 953
- [0756] <210>14
- [0757] <211>16
- [0758] <212>DNA
- [0759] <213> 人工序列
- [0760] <220>
- [0761] <223> 人工序列的描述 : 引物 611
- [0762] <400>14
- [0763] ngtcgaswgt ntwcaa 16
- [0764] <210>15
- [0765] <211>22
- [0766] <212>DNA
- [0767] <213> 人工序列
- [0768] <220>
- [0769] <223> 人工序列的描述 : 引物 259
- [0770] <400>15
- [0771] gtgcagggaa gcggttaact gg 22
- [0772] <210>16

[0773]	<211>22	
[0774]	<212>DNA	
[0775]	<213> 人工序列	
[0776]	<220>	
[0777]	<223> 人工序列的描述 :引物 260	
[0778]	<400>16	
[0779]	ccttttgagt aaatggtgtt gg	22
[0780]	<210>17	
[0781]	<211>20	
[0782]	<212>DNA	
[0783]	<213> 人工序列	
[0784]	<220>	
[0785]	<223> 人工序列的描述 :引物 24	
[0786]	<400>17	
[0787]	gcgaatgtat attatatgca	20
[0788]	<210>18	
[0789]	<211>537	
[0790]	<212>DNA	
[0791]	<213> 人工序列	
[0792]	<220>	
[0793]	<223> 人工序列的描述 :包含 MS-BN1 3' 侧翼区的序列	
[0794]	<400>18	
[0795]	gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat	60
[0796]	gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttgtgta	120
[0797]	aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagctta gatccatgga	180
[0798]	tttgttatga taacaaaaa caccctcctt ttattataa aggtagggat agctaactctg	240
[0799]	ttattcgggtt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatttt	300
[0800]	tttgttcggtt ttcattacaa tccaagacaa gttagggtta ttacatttta ccaaaaaaaaa	360
[0801]	aggtttgggtt tattgtgaac attgctgcgg ttattttaaa ttgattcta ttcaaaggtc	420
[0802]	aatccgtatt taacaagtaa actagtcctt atataatcctt aaatctaacg atctttgatt	480
[0803]	tttaaattgc atttancat gtccctctctg gcgtatatgg tctctttgaa aacactc	537
[0804]	<210>19	
[0805]	<211>19	
[0806]	<212>DNA	
[0807]	<213> 人工序列	
[0808]	<220>	
[0809]	<223> 人工序列的描述 :引物 51	
[0810]	<400>19	
[0811]	tgacactttg agccactcg	19

[0812]	<210>20	
[0813]	<211>20	
[0814]	<212>DNA	
[0815]	<213> 人工序列	
[0816]	<220>	
[0817]	<223> 人工序列的描述 :引物 48	
[0818]	<400>20	
[0819]	ggagggtgtt tttggttate	20
[0820]	<210>21	
[0821]	<211>178	
[0822]	<212>DNA	
[0823]	<213> 人工序列	
[0824]	<220>	
[0825]	<223> 人工序列的描述 :包含 MS-BN1 靶位点缺失的序列	
[0826]	<400>21	
[0827]	gacactttga gccactcgaa ggacaaatTT taaaaacttg tgggatgctg tggccataaa	60
[0828]	ccttgaggac gctttgatca tattctatta actacagtac gaatatgatt cgacctttgc	120
[0829]	aattttctct tgttttctaa ttcatatgga tttgttatga taaccaaaaa caccctcc	178
[0830]	<210>22	
[0831]	<211>1198	
[0832]	<212>DNA	
[0833]	<213> 人工序列	
[0834]	<220>	
[0835]	<223> 人工序列的描述 :MS-BN1 插入区	
[0836]	<400>22	
[0837]	catggtgtga tccaaagact ttctcgcccc aaataactaat catcacaagt catgcatgat	60
[0838]	ctgctcggga tggccaagaa aaatcgaacc catgacaata ttcacagttg taagtTTTTT	120
[0839]	accagtagac aaataccact tggtttaaca tattgtaaac ttaatatata gaagatgttc	180
[0840]	ctattcgaaa aataatatat gtatatatat aaaattttat tggecgactcg aggatgcaca	240
[0841]	gaaatataaa atgttgggtcg cttagacat ctccaatgta tttctctatt ttacctcta	300
[0842]	aaataaagga gctctataat agaggtgggt ttigtctcaa tgtatttctt taaaatagag	360
[0843]	atctctacat atagagcaaa atatagagga atgttatttc ttctctata aatagaggag	420
[0844]	aaaatagcaa tctctatttt agaggcaaaa atagagatbs gttggagtga ttttgcctct	480
[0845]	aaatgctatt atagaggtag aaatagaggt gggttggaga tgctcttact attttcatag	540
[0846]	taggtgaaaa cttgaaacta gaaagctttg gagtgtacga gtggaaaacc tctctttgta	600
[0847]	gaaacataca catgccattt agttaactag ttgacataga tttttgagtc agataacttt	660
[0848]	aagaatatat atgtttggat gagagtttga cactttgagc cactcgaagg acaaatttta	720
[0849]	aaaacttgtg ggatgctgtg gccataaacc ttgaggacvs tttgatcata ttctattaac	780
[0850]	tacagtacga atatgattcg acctttgcaa ttttctcttc aggttttcta attcatatgg	840

[0851] atttggttatg ataaccaaaa acaccctcct ttttattata aaggtaggga tagctaattct 900
 [0852] gttattcggt tttgattaga gatattaatc ccgttttatac aagtacagtt tgatgtattt 960
 [0853] ttttgttcgt tttcattaca atccaagaca agttagggtt attacatttt accaaaaaaaa 1020
 [0854] aaggttttgt ttattgtgaa cattgctgcg gtttatttaa atttgattct attcaaaggt 1080
 [0855] caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gatctttgat 1140
 [0856] ttttaaattg catttancta tgcctctctt ggcgtatatg gtctctttga aaacactc 1198
 [0857] <210>23
 [0858] <211>22
 [0859] <212>DNA
 [0860] <213> 人工序列
 [0861] <220>
 [0862] <223> 人工序列的描述 : 引物 193
 [0863] <400>23
 [0864] tcacttacgg caatgtacca gc 22
 [0865] <210>24
 [0866] <211>1077
 [0867] <212>DNA
 [0868] <213> 人工序列
 [0869] <220>
 [0870] <223> 人工序列的描述 : 包含 RF-BN15' 侧翼区的序列
 [0871] <220>
 [0872] <221>misc_ 特征
 [0873] <222>(1)..(45)
 [0874] <223>pGEM[®]-T 载体
 [0875] <220>
 [0876] <221>misc_ 特征
 [0877] <222>(1061)..(1077)
 [0878] <223>pGEM[®]-T 载体
 [0879] <400>24
 [0880] gagctctccc atatggtega cctgcaggcg gccgcactag tgattcttag cctgggtcag 60
 [0881] ggcattggcat gtctgatggt acatgctaaa tgctatatit cctgtttaaa gtgttaaaat 120
 [0882] cattttctga tggaactaaa tccagtttta agagtaactg acaagtacaa ttaagcacia 180
 [0883] caatataata gtagtaattg gcatctttga ttgttaaata tcaaaacagt aaagttacaa 240
 [0884] aaaaaaatac caaaccaata atgaagactt ggcggagaca gtgccgtgcg aaggttttcg 300
 [0885] gaggtccgag acgagttcaa aaatacattt tacataatat atttttcata tatatatata 360
 [0886] tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct tcaccaaaat 420
 [0887] ttataaaact aaatttttaa atcatgaaca aaaagtatga atttgtaata taaatacaaa 480
 [0888] gatacaaatt tttgattgaa atattggttag ctgtcaaaaa agtaaatctt agaattttaaa 540
 [0889] ttaactatag taaactatat attgaaaata ttataaattt ttatcaaatt ctcataaata 600

[0890]	tataaaataa atctaactca tagcatataa aaagaagact aatgtggatc aaaatattta	660
[0891]	cagtttttta gaagtagaat ctttatagtt ttatttataa tatagcaaaa atgatacaca	720
[0892]	acctagttag ttaaggagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaat ctatctaaaa	780
[0893]	aaatatgtta actaccatgc aaaagtattt tttttgtaat tagaaacct gaaatttgta	840
[0894]	caaaacttgg acccctaggt aaatgccttt ttcattctgc gataagaaaa ggcaatttgt	900
[0895]	agatgttaat tcccatcttg aaagaaatat agtttaata ttatttgata aaataacaag	960
[0896]	tcaggtatta tagtccaagc aaaaacataa atttattgat gcaagtttaa attcagaaat	1020
[0897]	atttcaataa ctgattatat cagctggtac atcgccgtag aatcccgcgc catggcg	1077
[0898]	<210>25	
[0899]	<211>16	
[0900]	<212>DNA	
[0901]	<213> 人工序列	
[0902]	<220>	
[0903]	<223> 人工序列的描述 :引物 286	
[0904]	<400>25	
[0905]	ntgcgaswga nawgaa	16
[0906]	<210>26	
[0907]	<211>19	
[0908]	<212>DNA	
[0909]	<213> 人工序列	
[0910]	<220>	
[0911]	<223> 人工序列的描述 :引物 314	
[0912]	<400>26	
[0913]	gtaggaggtt gggaagacc	19
[0914]	<210>27	
[0915]	<211>25	
[0916]	<212>DNA	
[0917]	<213> 人工序列	
[0918]	<220>	
[0919]	<223> 人工序列的描述 :引物 315	
[0920]	<400>27	
[0921]	gggttttcta ctagaaagct ctcgg	25
[0922]	<210>28	
[0923]	<211>24	
[0924]	<212>DNA	
[0925]	<213> 人工序列	
[0926]	<220>	
[0927]	<223> 人工序列的描述 :引物 316	
[0928]	<400>28	

[0929]	ccgataggga agtgatgtag gagg	24
[0930]	<210>29	
[0931]	<211>21	
[0932]	<212>DNA	
[0933]	<213> 人工序列	
[0934]	<220>	
[0935]	<223> 人工序列的描述 :引物 288	
[0936]	<400>29	
[0937]	atgcagcaag aagcttgag g	21
[0938]	<210>30	
[0939]	<211>1501	
[0940]	<212>DNA	
[0941]	<213> 人工序列	
[0942]	<220>	
[0943]	<223> 人工序列的描述 :包含 RF-BN13' 侧翼区的序列	
[0944]	<220>	
[0945]	<221>misc_ 特征	
[0946]	<222>(1)..(16)	
[0947]	<223>pGEM [®] -T 载体	
[0948]	<220>	
[0949]	<221>misc_ 特征	
[0950]	<222>(1458)..(1501)	
[0951]	<223>pGEM [®] -T 载体	
[0952]	<400>30	
[0953]	ccatggccgc gggattgtag gaggttggga agacaggccc agaaagagat ttatctgact	60
[0954]	cgttttgtgt atagttttca atgttcataa aggaagatgg agacttgaga agtttttttt	120
[0955]	ggactttgtt tagctttgtt gggcgttttt tttttttgat caataacttt gttgggctta	180
[0956]	tggtcgataa gcgtgcgcgt gtctgatggg acatgctaaa tgctatatatt ctgtttaaag	240
[0957]	tgttaaaatc attttctgat ggaactaaat ccagttttta gagtaactga caagtacaat	300
[0958]	taagcacaac aataaaatag tagtaattgg catctttgat tgttaaatat caaaacaata	360
[0959]	aagttacaaa aaaaaatacc aaaccaataa tgaagacttg gcggagacag tgccgtgcga	420
[0960]	aggttttcgg aggtccgaga cgagttcaaa aatacatatt acataatata tttttcatat	480
[0961]	atatatatat atataacatt caaaagtttg aattattaca taaacgtttt ctaaattttc	540
[0962]	ttcaccaaaa ttttataaac taaaattttt maatcatgaa caaaaagtat gaatttgtaa	600
[0963]	tataaatacm aagatacaaa tttttgattg aaatattggg agctgtcaaa aaagtaaate	660
[0964]	ttagaattta aattaactat agtaaactat atatggaaaa tattataaat ttttatcaaa	720
[0965]	ttctcataaa tatataaaat aaatctaact catagcatat aaaaaagaaga ctaatgtgga	780
[0966]	tcaaratatt tacagttttt tagaagtaga atctctatag ttttatttta aatatagcaa	840
[0967]	aaatgatcac aaacctagtt actttaacca gaagtcgaat tcaaaatcaa ataaaaataa	900

[0968]	aaatctatct aaaaaaatat gttaactacc atgcaaaagt attttttttt gtaattagaa	960
[0969]	accctgaaat ttgtacaaaa cttggacccc taggtaaatt ccctagaaag tatectatta	1020
[0970]	gcgtcgacaa actgttgctc atatttttct ctccttactt tataatcatac actaatatan	1080
[0971]	gnagatgata taattaatta ttcattttcca tgctagctaa ttcaagaaaa agaaaaaaaa	1140
[0972]	ctattatcta aacttatatt cgagcaacac ctcgagata acaggatata tgtcattaat	1200
[0973]	gaatgcttga actcatctcg cgaactcate tcgcatcgct tatagccaca aagatccaac	1260
[0974]	ccctctcttc aatcatatat cagtagtaca atacaaatag atattgtgag cacatatgcc	1320
[0975]	gtctagtact gatgtgtaca tgtagaggag ccgcaaagt ttagtcactc caacaaatga	1380
[0976]	gcatgaccac gcatcttctg atgatgtaca gccgtccctt ttgctctctc aaatatectc	1440
[0977]	caagcttctt gctgcataaa tcaactagtgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag	1500
[0978]	c	1501
[0979]	<210>31	
[0980]	<211>21	
[0981]	<212>DNA	
[0982]	<213> 人工序列	
[0983]	<220>	
[0984]	<223> 人工序列的描述 :引物 269	
[0985]	<400>31	
[0986]	ggttttcgga ggtccgagac g	21
[0987]	<210>32	
[0988]	<211>21	
[0989]	<212>DNA	
[0990]	<213> 人工序列	
[0991]	<220>	
[0992]	<223> 人工序列的描述 :引物 283	
[0993]	<400>32	
[0994]	cttggacccc taggtaaatg c	21
[0995]	<210>33	
[0996]	<211>22	
[0997]	<212>DNA	
[0998]	<213> 人工序列	
[0999]	<220>	
[1000]	<223> 人工序列的描述引物 284	
[1001]	<400>33	
[1002]	gtacaaaact tggacccta gg	22
[1003]	<210>34	
[1004]	<211>1068	
[1005]	<212>DNA	
[1006]	<213> 人工序列	

- [1007] <220>
- [1008] <223> 人工序列的描述 : 包含 RF-BN1 靶位点缺失的序列
- [1009] <400>34
- [1010] cgcggttgga gctctcccat atggctcgacc tgcaggcggc cgcactagtg attcttggac 60
- [1011] ccctaggtaa atgccttttt caaaagcctc taagcacggt tctgggcggg gagtcagcga 120
- [1012] gaaaaaaga tttttcccta gaaagtatcc tattagcgtc gacaaactgt tgctcatatt 180
- [1013] tttctctcct tactttatat catacactaa tataaaaaga tgatctaatt aattattcat 240
- [1014] ttccatgcta gctaattcaa gaaaaagaaa aaactatta tctaaactta tattcgagca 300
- [1015] acacctcgga gataacagga tatatgttat taatgaatgc ttgaactcat ctcgcgaact 360
- [1016] catctcgcat cgcttatagc cacaaagatc caaccctct cttcaatcat atatcagtag 420
- [1017] tacaatacaa atagatatig tgagcacata tgccgtctag tactgatgtg tatatgtaga 480
- [1018] gganngcaaa tgtttagtca ctccaacaaa tgagcatgac nacgcatctt ctgatgatgt 540
- [1019] acagccgtcc cttttgctct ctcaaatact ctccaagctt cttgctgcat ggaatcttct 600
- [1020] tcttggtgtc ttcatgata acaaaatcta acgagagaga aacccttagt caagaaaaaa 660
- [1021] caaataaaac tctaacgaga gtgtgtgaga aagtagagag tatgtgtgag tgacggagag 720
- [1022] aaagtggagac cataaagatg ttgtgcaaag agagcaagac ttaacctata tatactcaca 780
- [1023] tacacgtaca catcataccc attanagata ataaaaagga aaaaggaaca actaacaagg 840
- [1024] gaactgtatc ccatacttta tctcatcata catgatgcat aatatattct ttcgtatata 900
- [1025] aagaaaaatg agcctgatat ttttttattt cgaaactaaa agagtgtcta tttctctctc 960
- [1026] ttagagatag tgccatgtca aattttctaag aagtagcaag atttaciaag gaatctaaag 1020
- [1027] caaccccacg cgcattgtgt tcattttctct cgaccatccc gcggccat 1068
- [1028] <210>35
- [1029] <211>21
- [1030] <212>DNA
- [1031] <213> 人工序列
- [1032] <220>
- [1033] <223> 人工序列的描述 : 引物 57
- [1034] <400>35
- [1035] gcatgatctg ctcgggatgg c 21
- [1036] <210>36
- [1037] <211>909
- [1038] <212>DNA
- [1039] <213> 人工序列
- [1040] <220>
- [1041] <223> 人工序列的描述 : 包含 WOSR 中 MS-BN15' 侧翼区的序列
- [1042] <400>36
- [1043] tgcgatgact gctcgggatg gccaaagaaa atcgaaccca tgacaatatt cacagttgta 60
- [1044] agttttttac cagtagacaa ataccacttg gtttaacata ttgtaaactt aatatataga 120
- [1045] agatgttctt attcagaaaa taatatatgt atatatataa aattttattg gcgactcgag 180

[1046]	gatgcacaga aatataaaat gttggctcgt tagaccatct ccaatgtatt tctctatatt 240
[1047]	tacctctaaa ataaaggaac tctataatag aggtgggttt tactccaatg tatttcttta 300
[1048]	aaatagagat ctctacatat agagcaaaat atagaggaat gttatttctt cctctataaa 360
[1049]	tagaggagaa aatagcaatc tctatatttag aggcaaaaat agagatgggt tggagtgatt 420
[1050]	ttgcctctaa atgctattat agaggtagaa atagaggtgg gttggagatg ctcttactat 480
[1051]	tttcatagta ggtgaaaact tgaaactaga aagctttgga gtgtacgagt ggaaaacctc 540
[1052]	tctttgtaga aacatacaca tgccatttag ttaactagtt gacatagatt tttgagtcag 600
[1053]	ataactttta gaatatatat gtttggatga gagtttgaca ctttgagcca ctggaaggac 660
[1054]	aaatttttaa aacttgtggg atgctgtggc ccataaacct tgaggacgct ttgatcatat 720
[1055]	tctattaact acagtacgaa tatgattcga cctttgcaat tttctcttca gtactcggcc 780
[1056]	gtcgaactcg gccgtcgagt acatggtcga taagaaaagg caatttgtag atgttaattc 840
[1057]	ccatcttgaa agaaatatag tttaaatatt tattggataa aataacaagt caggatttat 900
[1058]	agtccaagc 909
[1059]	<210>37
[1060]	<211>20
[1061]	<212>DNA
[1062]	<213> 人工序列
[1063]	<220>
[1064]	<223> 人工序列的描述 : 引物 68
[1065]	<400>37
[1066]	ccatatacgc cagagaggac 20
[1067]	<210>38
[1068]	<211>522
[1069]	<212>DNA
[1070]	<213> 人工序列
[1071]	<220>
[1072]	<223> 人工序列的描述 : 包含 WOSR 中 MS-BN13' 侧翼区的序列
[1073]	<400>38
[1074]	gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat 60
[1075]	gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttgtgta 120
[1076]	aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagctta gatccatgga 180
[1077]	tttgttatga taacaaaaa caccctcctt ttattataa aggtagggat agctaattctg 240
[1078]	ttattcgggt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatttt 300
[1079]	tttgttcggt ttcatataaa tccaagacaa gttagggtta ttacatttta ccaaaaaaaaa 360
[1080]	aggtttgggt tattgtgaac attgctgcgg tttatattaa atttgattct attcaaagg 420
[1081]	caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gatacttgga 480
[1082]	tttttaaatt gcatttagct atgtcctctc tggcgtatat gg 522
[1083]	<210>39
[1084]	<211>694

- [1085] <212>DNA
- [1086] <213> 人工序列
- [1087] <220>
- [1088] <223> 人工序列的描述 :包含 WOSR RF-BN15' 侧翼区的序列
- [1089] <400>39
- [1090] gggttttcgga ggtccgagac gagttcaaaa atacatttta cataatatat ttttcatata 60
- [1091] tatatatata tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct 120
- [1092] tcacccaaat ttataaaact aaaattttta aatcatgaac aaaaagtatg aatttgtaat 180
- [1093] ataaatacaa agatacaaat ttttgattga aatattggta gctgtcaaaa aagtaaactct 240
- [1094] tagaatttaa attaactata gtaactata tattgaaaat attataaatt tttatcaaat 300
- [1095] tctcataaat atataaaata aatctaactc atagcatata aaaagaagac taatgtggat 360
- [1096] caaaatatatt acagtttttt agaagtagaa tctttatagt tttattttaa atatagcaaa 420
- [1097] aatgatcaca aacctagtta cttaaccag aagtccaatt caaaatcaaa taaaaataaa 480
- [1098] aatctatcta aaaaaatatg ttaactacca tgcaaaagta ttttttttg taattagaaa 540
- [1099] ccctgaaatt tgtacaaaac ttggaccctt aggtaaatgc ctttttcac tcgcgataag 600
- [1100] aaaaggcaat ttgtagatgt taattcccat ctgaaagaa atatagttaa aatatttatt 660
- [1101] gataaaataa caagtcaggt attatagtc aagc 694
- [1102] <210>40
- [1103] <211>1279
- [1104] <212>DNA
- [1105] <213> 人工序列
- [1106] <220>
- [1107] <223> 人工序列的描述 :包含 WOSR 中 RF-BN13' 侧翼区的序列
- [1108] <400>40
- [1109] ggggggttttt ttttttgatc aataactttg ttgggcttat ggtcgataag cgtgcgcatg 60
- [1110] tctgatggta catgctaaat gctatatctt tgtttaaagt gttaaaatca ttttctgatg 120
- [1111] gaactaaatc cagttttaag agtaactgac aagtacaatt aagcacaaca ataaaatagt 180
- [1112] agtaattggc atctttgatt gttaaataatc aaacaataaa gttcaaaaaa aaataccaac 240
- [1113] ccaataatga agacttggcg gagacagtgc cgtgcgaagg ttttcggagg tccgagacga 300
- [1114] gttcaaaaat acattttaca taatatattt ttcatatata tatatatata taacattcaa 360
- [1115] aagtttgaat tattacataa acgttttcta aattttcttc accaaaattt tataaactaa 420
- [1116] aattttttaa tcatgaacaa aaagtatgaa ttigttaat atatacaaag atacaaattt 480
- [1117] ttgattgaaa tattggtagc tgtcaaaaaa gtaaacttta gaattttaa taactatagt 540
- [1118] aaactatata ttgaaaatat tataaatttt tatcaaattc tcataaatat ataaaaataaa 600
- [1119] tctaactcat agcatataaa aagaagacta atgttgatca aaatatattac agtttttttag 660
- [1120] aagtagaatc tttatagttt tattttaaa atagcaaaaa tgatcacaaa cctagttact 720
- [1121] ttaaccagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaaa tctatctaaa aaaatatgtt 780
- [1122] aactaccatg caaaagtatt tttttttgta attagaaacc ctgaaatttg tacaaaactt 840
- [1123] ggacccttag gtaaattccc tagaaagtat cctattagcg tcgacaaact gttgctcata 900

[1124]	tttttctctc cttactttat atcatacact aatataaaaa gatgatctaa ttaattattc	960
[1125]	atttccatgc tagctaattc aagaaaaaga aaaaaaactt attatctaaa cttatatctg	1020
[1126]	agcaacacct cggagataac aggatatatg tcattaatga atgcttgaac tcatctcgcg	1080
[1127]	aactcatctc gcatcgctta tagccacaaa gatccaaccc ctctcttcaa tcatatatca	1140
[1128]	gtagtacaat acaaatagat attgtgagca catatgccgt ctagtactga tgtgtatatg	1200
[1129]	tagaggagcc gcaaagtgtt agtcactcca acaaatgagc atgaccacgc atcttctgat	1260
[1130]	gatgtacagc cgtccttt	1279
[1131]	<210>41	
[1132]	<211>20	
[1133]	<212>DNA	
[1134]	<213> 人工序列	
[1135]	<220>	
[1136]	<223> 人工序列的描述 :引物 268	
[1137]	(BNA04)	
[1138]	<400>41	
[1139]	tggacccta ggtaaagcc	20
[1140]	<210>42	
[1141]	<211>22	
[1142]	<212>DNA	
[1143]	<213> 人工序列	
[1144]	<220>	
[1145]	<223> 人工序列的描述 :引物 BNA05	
[1146]	<400>42	
[1147]	aacgagtgtc agctagacca gc	22
[1148]	<210>43	
[1149]	<211>22	
[1150]	<212>DNA	
[1151]	<213> 人工序列	
[1152]	<220>	
[1153]	<223> 人工序列的描述 :引物 BNA06	
[1154]	<400>43	
[1155]	cgcagttctg tgaacatga cc	22

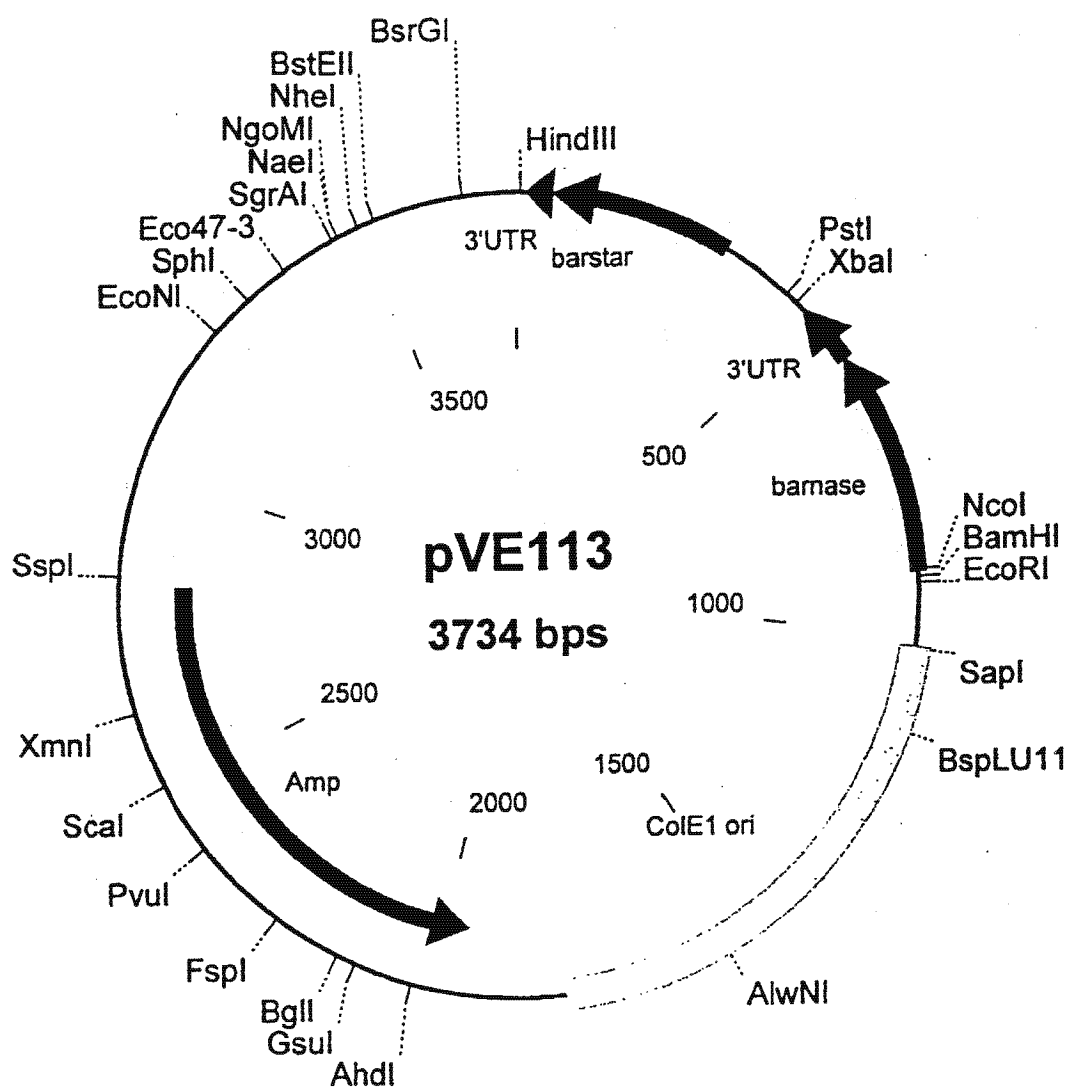


图 1

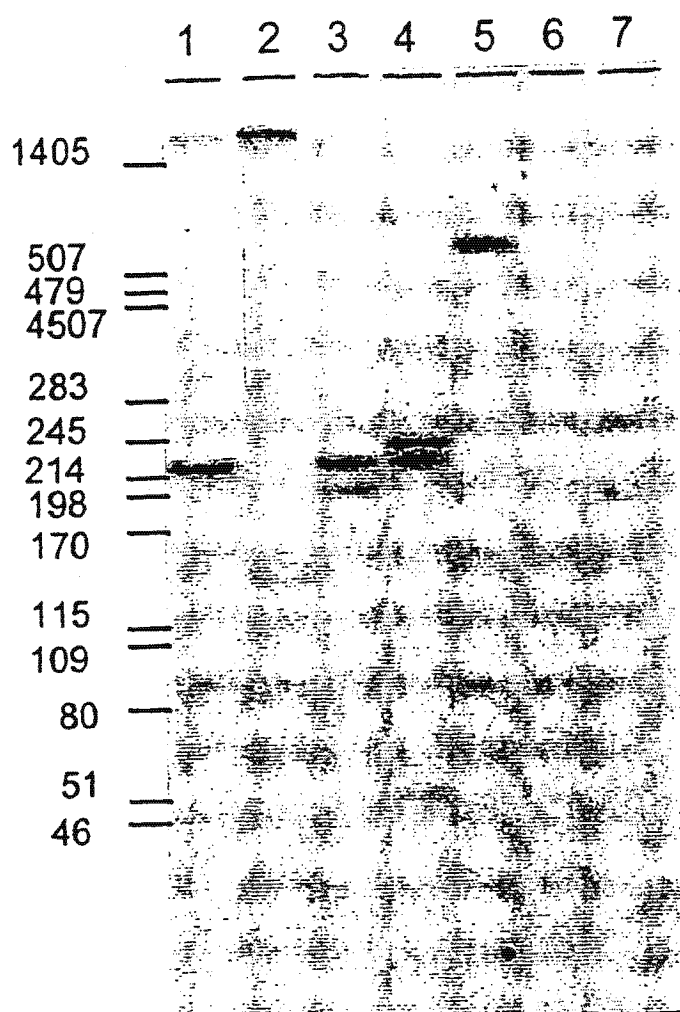


图 2

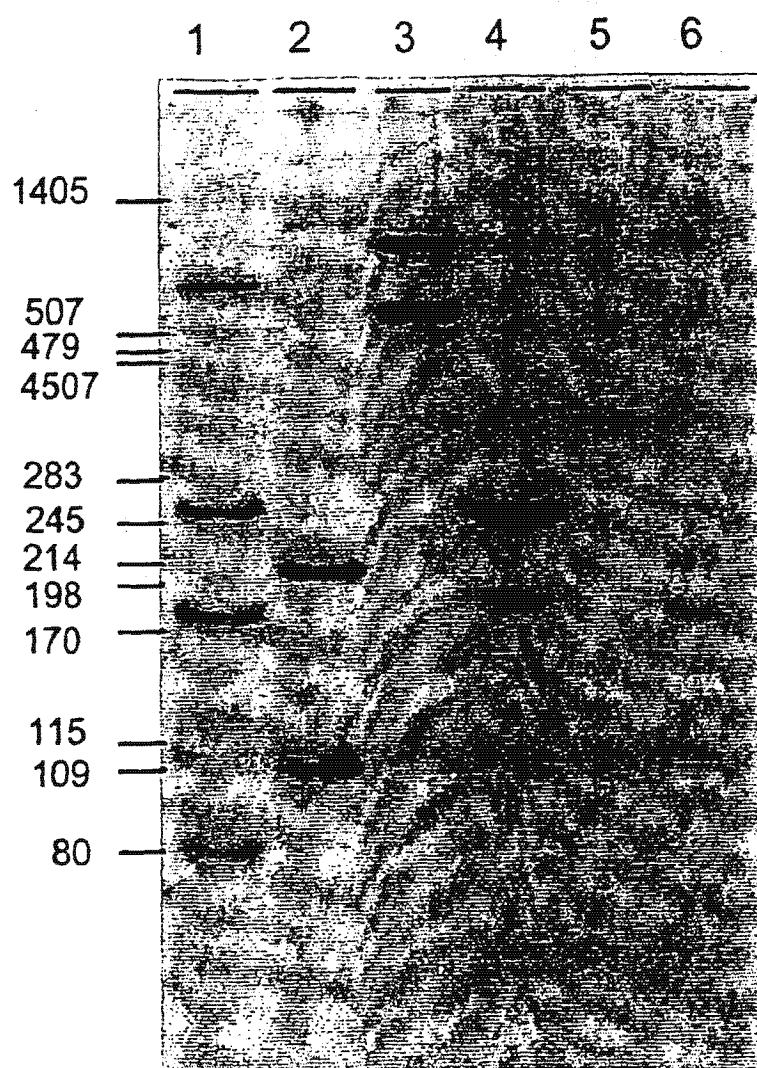


图 3

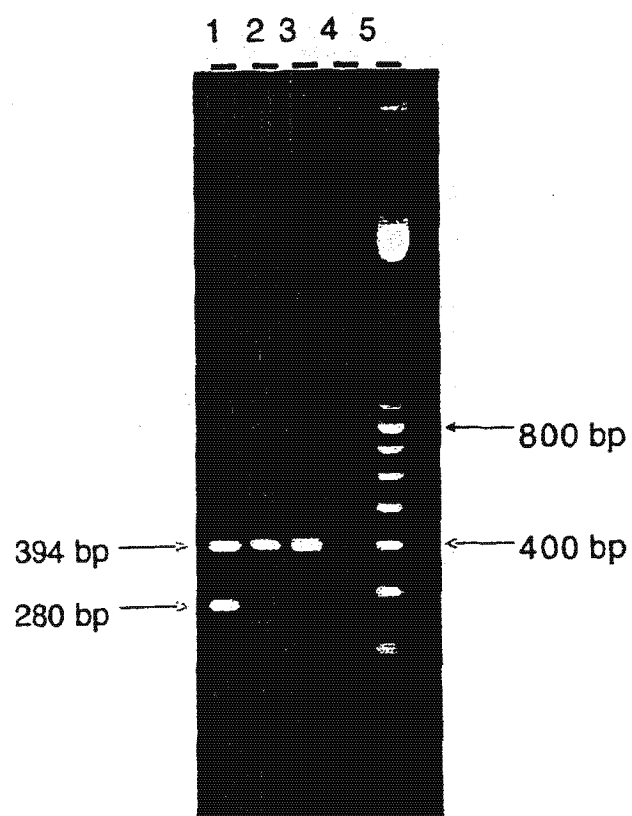


图 4

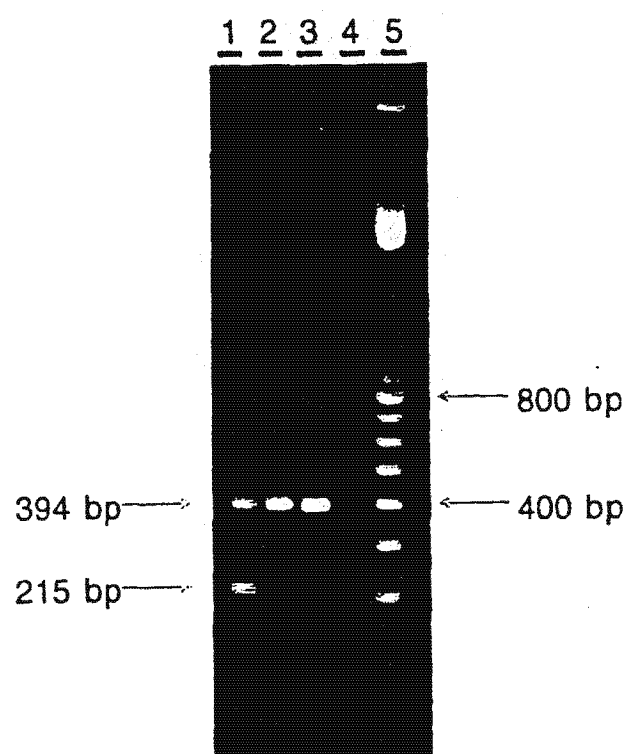


图 5