

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96118812

G01N 33/53 (2006.01)

※ 申請日期： 96.5.25

※IPC 分類：C12N

A01H 1/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

對應於基因轉殖品系MON89034之玉米植物及種子及其檢測方法和用途

CORN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC
EVENT MON89034 AND METHODS FOR DETECTION AND USE
THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商孟山都科技有限責任公司

MONSANTO TECHNOLOGY LLC

代表人：(中文/英文)

約瑟夫 A 沙普

SCHAPER, JOSEPH A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國米蘇里州聖路易市北林堡街 800 號

800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD, ST. LOUIS, MISSOURI 63167

U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 約翰 寇特
KORTE, JOHN
2. 史考特 科瑞 強生
JOHNSON, SCOTT COREY
3. 詹姆斯 F 萊斯
RICE, JAMES F.
4. 蕾貝卡 A 凱莉
KELLY, REBECCA A.
5. 席勒 瑪莉 安德生
ANDERSON, HEATHER MARY
6. 珍娜 R 哥特
GROAT, JEANNA R.
7. 珍妮佛 R 道格拉斯
DOUGLAS, JENNIFER R.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 美國 U.S.A.
4. 美國 U.S.A.
5. 加拿大 CANADA
6. 美國 U.S.A.
7. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年05月26日；60/808,834 、

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種基因轉殖玉米品系 MON89034，及包含該玉米品系之診斷特徵 DNA 的細胞、種子及植物。本發明亦提供包含為樣本中該玉米品系之診斷特徵之核苷酸序列的組合物，用於檢測樣本中該玉米品系核苷酸序列存在之方法，用於檢測為樣本中該玉米品系存在之診斷特徵的核苷酸序列、使該玉米品系之種子生長為玉米植物且育種以產生包含為該玉米品系之診斷特徵之 DNA 之玉米植物的探針及引子。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a transgenic corn event MON89034, and cells, seeds, and plants comprising DNA diagnostic for the corn event. The invention also provides compositions comprising nucleotide sequences that are diagnostic for said corn event in a sample, methods for detecting the presence of said corn event nucleotide sequences in a sample, probes and primers for use in detecting nucleotide sequences that are diagnostic for the presence of said corn event in a sample, growing the seeds of such corn event into corn plants, and breeding to produce corn plants comprising DNA diagnostic for the corn event.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於基因轉殖玉米品系 MON89034 及其植物部分及種子。該品系顯示對來自鱗翅目昆蟲之昆蟲侵襲的抵抗性。本發明亦係關於使用植物及種子之方法，該等植物及種子包含當探測對基因轉殖品系而言獨特之核苷酸序列的存在時為基因轉殖品系存在之診斷特徵的 DNA，且係關於藉由檢測對基因轉殖品系而言獨特之特定核苷酸序列來檢測生物樣本中該玉米品系存在之方法。本發明提供對該品系而言獨特之核苷酸序列。

【先前技術】

本發明係關於玉米(玉蜀黍(*Zea mays*))植物之抗鱗翅目基因轉殖變種(本文中稱作品系 MON89034)，且係關於當在玉米之任何樣本或變種中檢測時為彼樣本或變種中基因轉殖玉米植物品系 MON89034 存在之診斷特徵的所存在之獨特 DNA 序列，且亦係關於檢測玉米 MON89034 中之轉殖基因/基因組插入區，及來源於其之子代植物及種子。

玉米植物品系 MON89034 尤其對鱗翅目家族之昆蟲具抵抗性，該等昆蟲諸如秋黏蟲(草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*))、歐洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、玉米穗夜蛾(*Helicoverpa zea*)、西南玉米螟(巨座玉米螟(*Diatraea grandiosella*))及黑毛蟲(*Agrotis ipsilon*)及類似昆蟲，其中所有皆為農藝學上重要的害蟲。

在世界許多地區中，玉米為重要的農作物且為主要食物

來源。為達成改良產品之農藝性狀及品質之目的，生物技術方法已應用於玉米。一個此種農藝性狀為抗蟲性，例如在經遺傳工程操作以含有一或多個編碼殺蟲劑之基因的玉米植物中所產生之對鱗翅目及鞘翅目物種的遺傳工程化抵抗性（參見，例如，美國專利 6,489,542 及美國專利 6,620,988）。有利地，檢測生物樣本中特定基因轉殖品系的存在以判定有性雜交之一或多個子代是否含有基因轉殖物質。舉例而言，檢測樣本中之品系對許可目的、對建立及維護純度標準而言很重要，對服從管理機構、對遵守食物成份標準、對用於建立在無所有者許可或任何針對基因轉殖品系之專利許可的情況下一或多個特定個體或實體已使用特定品系之法律訴訟，及對確保遵守各種政府法規及/或法律而言很重要。

另外，當遵守需要對來源於重組農作物之食物進行上市前審核及貼標記之法規時，能檢測特定植物之方法將為有用的。對樣本中基因轉殖品系的存在具抵抗性之個體或實體亦需要可靠方法來檢測樣本中轉殖基因的存在以使其能夠由於在商業上利用其產品中無轉殖基因而獲益。

儘管有此等優勢，但可能昆蟲會演化成對僅表現一種蘇雲金芽孢桿菌 (*B. thuringiensis*) δ -內毒素之植物具抵抗性。變得廣泛分布之該抵抗性會明顯限制含有單一 Bt 基因之胚質 (germplasm) 的商業價值。

一種增加經由基因轉殖植物提供及針對控制目標害蟲之殺蟲劑的效用且同時降低出現對該等殺蟲劑具抵抗性之害

蟲的可能性之可能方式將確保基因轉殖農作物表現高含量之此等殺蟲劑，諸如蘇雲金芽孢桿菌 (*Bacillus thuringiensis*) δ -內毒素 (McGaughey 及 Whalon (1992), *Science* 258:1451-55 ; Roush (1994) *Biocontrol. Sci. Technol.* 4:501-516)。另外，具有有效抗害蟲群且經不同作用模式顯示其作用的殺蟲基因庫可預防抵抗性之發展。由於提供表現兩種或兩種以上顯示對同一昆蟲物種之重疊毒性的殺蟲活性之農作物，因此可大體上延遲抵抗性發作。一種用於達成該等雙重作用模式之方式可提供表現對特定昆蟲物種具毒性之Bt基因連同為達成抑制由Bt毒素靶向之同一昆蟲物種之必需基因之靶向目的而提供之dsRNA的植物，該dsRNA在由目標害蟲攝取後即引起RNAi反應，由此提供在昆蟲進化成對dsRNA或對Bt基因具抵抗性之狀況下冗餘(redundancy)之方式。或者，在植物中共同表現兩種或兩種以上對同一昆蟲物種均具毒性但各顯示實行其殺死活性之不同模式的殺蟲毒素(尤其當二者均以高含量表現時)提供有效控制抵抗性之方式。適用於該等組合之該等殺昆蟲劑之實例包括(但不限於)：Bt毒素、嗜線蟲桿菌(*Xenorhabdus* sp.)或發光桿菌(*Photobacterium* sp.)殺蟲蛋白質、經脫敏及脫糖基之馬鈴薯塊莖儲藏蛋白(patatin protein)及/或permutin、植物凝集素，及類似物。

已知植物中外來基因的表現受其染色體位置影響，此可能係歸因於染色質結構(例如異染色質)或接近於整合位點之轉錄調節元件(例如強化子)之接近性(Weising等人(1988)

Ann. Rev. Genet 22:421-477)。出於此原因，通常必需篩選許多品系以鑑別特徵為最佳表現所關注之引入基因的品系。甚至在手頭上有數十個甚至數百個不同基因轉殖品系的情況下，仍不確定成功鑑別提供最佳表現量之至少兩種不同毒素或殺蟲劑且缺少任何不合需要之農藝不足或植物毒性作用的單一基因轉殖品系，此係由於插入植物基因組之一些必需或部分必需區域中，或由於由轉殖基因之表現量所產生之毒性作用。舉例而言，在植物及其他生物體中已觀測到在品系當中所引入之基因的表現量可存在廣泛變化。表現之空間或時間模式亦可存在差異，例如，在各種植物組織中轉殖基因之相對表現的差異，其可能不對應於自存在於所引入之基因構建體中之轉錄調節元件所預期之模式。出於此原因，為達成商業目的，通常產生數百個至數千個不同品系且篩選出該等品系中具有所要轉殖基因表現量及模式之單一品系。具有所要轉殖基因表現量或模式之品系適用於藉由使用習知育種方法進行有性異交而將轉殖基因移入其他遺傳背景中。該等雜交之子代維持原始轉化體之轉殖基因表現特徵。此策略用於確保適宜地適應特定局部生長條件之許多變種中之可靠的基因表現。

可能使用核酸探針藉由任何熟知之核酸檢測方法(諸如聚合酶鏈反應(PCR)或DNA雜交)檢測轉殖基因的存在。此等檢測方法一般集中於頻繁使用之遺傳元件，諸如啟動子、終止子、標記基因或甚至編碼自轉殖基因表現之所關注之蛋白質或dsRNA的編碼序列，等。因此，除非已知鄰

近於所插入之DNA之染色體DNA("側翼DNA")之序列，否則該等方法可能不適用於辨別不同品系，尤其使用同一DNA構建體所產生之彼等品系。視用於將轉殖基因引入植物基因組中之方法而定，可觀測到異常或非正常作用，其通常使位於意欲引入植物中之基因轉殖DNA側翼的植物基因組序列之鑑別變得極為複雜。通常，所插入之DNA的重排、側翼基因組DNA的重排或所插入之DNA與側翼基因組DNA兩者的重排為普遍的，且使評估中之插入性品系的分析變得複雜。因此，有利地，具有用於選擇、鑑別及確保樣本中之特定基因轉殖品系之純度及特徵的方式，且達成此目的之唯一方式為鑑別一或多個僅與所要基因轉殖品系相關之獨特序列，因而，在含有已插入基因轉殖DNA以產生品系之植物物種之DNA的生物樣本中該等序列的存在為該樣本中該品系之診斷特徵。

【發明內容】

本發明係關於命名為MON89034之基因轉殖玉米植物及其與玉米品系MON89034不能區分之子代(至其亦含有至少一個對應於所插入之基因轉殖DNA之等位基因的程度)，該子代具有以寄存編號PTA-7455寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(ATCC)之種子。本發明之另一態樣為含有選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5組成之群之聚核苷酸的玉米品系MON89034之子代植物或種子或植物及種子之可再生部分。本發明亦包括玉米品系

MON89034之植物部分，其包括(但不限於)：花粉、胚珠、花、芽、根、莖、絲、纓、穗及葉，只要此等部分至少含有如上所述之聚核苷酸。在對應於MON89034品系之玉米植物領域中所遺留之含於MON89034之基因組中之新穎遺傳組合物及來自MON89034之產物(諸如粗粉、細粉、油、漿及生命體)為本發明之一態樣。

本發明提供具有玉米品系MON89034之所有生理及形態特徵之抗昆蟲玉米植物。

根據本發明之一態樣，提供用於檢測來自命名為MON89034之新穎玉米植物之轉殖基因/基因組插入區之存在的組合物及方法。提供包含至少一個選自由SEQ ID NO:1(位於SEQ ID NO:5上之2051位至2071位)及SEQ ID NO:2(位於11295位至11314位)及其互補序列組成之群的MON89034之接合序列的DNA序列；其中接合序列跨越插入基因組中之異源性DNA與位於插入位點側翼之來自玉米細胞之DNA之間的接合點且為品系之診斷特徵(圖1)。包含此等DNA分子之玉米品系MON89034及種子為本發明之一態樣。

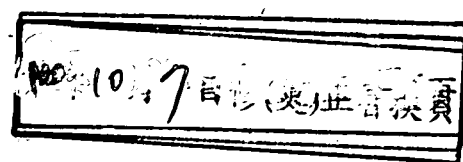
包含來自玉米品系MON89034之新穎轉殖基因/基因組插入區SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4之DNA序列(圖1)為本發明之態樣。包含此等分子之玉米植物及種子亦為本發明之態樣。

根據本發明之另一態樣，提供用於DNA檢測方法中之兩個DNA分子，其中第一DNA分子包含SEQ ID NO:3之DNA

分子之轉殖基因區之任何部分的至少11個或11個以上相連聚核苷酸，及SEQ ID NO:3之5'側翼玉米基因組DNA區之任何部分之類似長度的DNA分子，其中此等DNA分子當一起使用時適用作DNA擴增方法中之DNA引子而產生擴增子。當在DNA擴增方法中使用此等DNA引子所產生之擴增子含有SEQ ID NO:1時，該擴增子為玉米品系MON89034之診斷特徵。由與SEQ ID NO:3之任何部分同源或互補之DNA引子所產生之任何擴增子及包含SEQ ID NO:1之任何擴增子為本發明之一態樣。

根據本發明之另一態樣，提供用於DNA檢測方法中之兩個DNA分子，其中第一DNA分子包含SEQ ID NO:4之DNA分子之轉殖基因區之任何部分的至少11個或11個以上相連聚核苷酸，及SEQ ID NO:4之3'側翼玉米基因組DNA之任何部分之類似長度的DNA分子，其中此等DNA分子適用作DNA擴增方法中之DNA引子。當在DNA擴增方法中使用此等DNA引子所產生之擴增子含有SEQ ID NO:2時，該擴增子為玉米品系MON89034之診斷特徵。由與SEQ ID NO:4之任何部分同源或互補之DNA引子所產生之任何擴增子及包含SEQ ID NO:2之任何擴增子為本發明之一態樣。

根據本發明之另一態樣，提供檢測樣本中對應於玉米品系MON89034之DNA存在的方法。該等方法包含：(a)使包含DNA之樣本與引子組接觸，該引子組當在核酸擴增反應中與玉米品系MON89034之基因組DNA一起使用時產生為玉米品系MON89034之診斷特徵的擴增子；(b)進行核酸擴



增反應，進而產生擴增子；及(c)檢測擴增子，其中該擴增子包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

包含基因組 DNA 之玉米植物或種子或來源於植物或種子 MON89034 之產物包含基本上由 SEQ ID NO:5 及其互補序列組成之 DNA 分子。基因組 DNA 係自玉米植物或種子或產物分離時之玉米植物或種子或來源於植物或種子 MON89034 之產物包含合併 SEQ ID NO:5 及其互補序列之核苷酸 2061 至 11305 的 DNA 分子。

基因組 DNA 係自玉米植物或種子或產物分離時之玉米植物或種子或來源於植物或種子 MON89034 之產物在 DNA 擴增方法中產生擴增子，其中 DNA 引子分子 SEQ ID NO:6 及 SEQ ID NO:7 用於 DNA 擴增方法中。

根據本發明之另一態樣，為檢測樣本中對應於 MON89034 品系之 DNA 存在的方法，該等方法包含：(a)使包含 DNA 之樣本與探針接觸，該探針在嚴格雜交條件下與玉米品系 MON89034 之基因組 DNA 雜交且在嚴格雜交條件下不與對照玉米植物雜交；(b)使樣本及探針經受嚴格雜交條件；及(c)檢測探針與玉米品系 MON89034 DNA 的雜交，其中該探針包含 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2。

本發明之另一態樣為確定玉米品系 MON89034 之子代之接合性的方法，其包含：(a)使包含玉米 DNA 之樣本與包含 SQ2842(SEQ ID NO:6)、SQ2843(SEQ ID NO:7)、SQ6523(SEQ ID NO:10)、SQ6524(SEQ ID NO:11)、PB880(SEQ ID NO:14)及 PB2931(SEQ ID NO:15)之引子組接觸，該引子組

當在核酸擴增反應中與玉米品系 MON89034 之基因組 DNA 一起使用時產生為玉米品系 MON89034 之診斷特徵的第一擴增子；及 (b) 進行核酸擴增反應，進而產生第一擴增子；及 (c) 檢測該第一擴增子；及 (d) 使包含玉米 DNA 之樣本與該引子組接觸，該引子組當在核酸擴增反應中與玉米植物之基因組 DNA 一起使用時產生第二擴增子，該第二擴增子包含與鑑別為玉米品系 MON89034 之轉殖基因插入之玉米基因組區同源的原生玉米基因組 DNA；及 (e) 進行核酸擴增反應，進而產生第二擴增子，及 (f) 檢測該第二擴增子；及 (g) 比較樣本中之第一及第二擴增子，其中兩個擴增子的存在指示該樣本對轉殖基因插入而言為雜合的。

本發明之一態樣中，殺蟲有效量之玉米品系 MON89034 係提供於鱗翅目害蟲之食物中。

本發明之另一態樣提供呈以下形式之組合物或生物樣本：來源於玉米品系 MON89034 之用品或食品；包含以下各物之用品或食品：玉米穗、去玉米穗包葉之玉米、玉米穗絲、玉米花粉、粗碎玉米、玉米粗粉、碾碎玉米、玉米細粉、玉米油、玉米澱粉、玉米漿、玉米麥芽、玉米糖、玉米糖漿、自玉米油所生產之人造奶油、不飽和玉米油、飽和玉米油、玉米片、爆米花、自包含為玉米品系 MON89034 之診斷特徵之 DNA 的玉米或玉米產品所生產之乙醇及/或酒、自該玉米品系發酵所生產之乾酒粕 (DDGS) 及包含該等 DDGS 及/或玉米之動物飼料；抑或全部經壓碎或經碾碎之加工食品、化妝品及膨化劑，發現其中存在為

生物樣本中基因轉殖玉米品系 MON89034 存在之診斷特徵的可檢測量之聚核苷酸。提供玉米作為食品之一替代方式為將玉米提供於呈各種形式之穀物中用於進食，諸如全玉米、粗碎玉米、碾碎玉米，及與高粱、板油、粟、向日葵、燕麥、小麥、稻、豆及類似物摻合之各種形式之前述各物。諸如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或其互補序列所列之在該種用品或食品中之可檢測量之核苷酸序列為樣本中該基因轉殖品系 MON89034 DNA 存在之診斷特徵，且由此為樣本中已發起該 DNA 之基因轉殖品系細胞存在之診斷特徵。

本發明之前述及其他態樣自以下詳述之說明將變得更顯而易見。

【實施方式】

提供以下定義及方法以更佳定義本發明且指導一般熟習此項技術者實施本發明。除非另外指出，否則術語應根據一般熟習相關技術者所知之習知用法理解。分子生物學中常用術語之定義亦可見於 Rieger 等人，Glossary of Genetics: Classical and Molecular，第 5 版，Springer-Verlag: New York, 1991；及 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994 中。

如本文中所使用，術語"玉米(corn)"意謂玉蜀黍或玉米(maize)且包括可與玉米一起育種之所有植物變種，包括野生玉米物種。

如本文中所使用，術語"包含"意謂"包括(但不限於)"。

基因轉殖"品系"係藉由用異源性DNA(亦即包括所關注之轉殖基因之核酸構建體)轉化植物細胞、藉由將轉殖基因插入植物之基因組中使植物群體再生且選擇特徵為插入特定基因組位置中之特定植物來產生。術語"品系"係指包括異源性DNA之原始轉化體及該轉化體之子代。術語"品系"亦係指由包括異源性DNA之轉化體與另一變種之間的有性異交所產生之子代。甚至在與輪回親本重複回交後，經轉化之親本之所插入之DNA及側翼DNA仍存在於同一染色體位置處雜交之子代中。術語"品系"亦係指包含所插入之DNA及直接鄰近於所插入之DNA的側翼基因組序列之原始轉化體的DNA，預期該所插入之DNA將轉移至子代中，該子代由於一包括所插入之DNA之親本株(亦即原始轉化體及由自交所產生之子代)與不含有所插入之DNA之親本株的有性雜交而接收包括所關注之轉殖基因的所插入之DNA。本發明係關於品系MON89034 DNA、植物細胞、組織、種子及來源於MON89034之經加工產品。

咸亦應瞭解，亦可使兩種不同基因轉殖植物配對，以產生含有兩個經獨立隔離加入之外源性基因的後代。適當子代的自交可產生對兩個所加入之外源性基因而言係純合之植物。當為無性繁殖時，亦涵蓋與親本植物回交及與非基因轉殖植物異交。常用於不同性狀及農作物之其他育種方法的描述可見於若干文獻中之一者中，例如 Fehr，於 Breeding Methods for Cultivar Development 中，Wilcox J. 編，American Society of Agronomy, Madison WI (1987)。

"探針"為附著有習知可檢測標記或報導分子(例如放射性同位素、配位體、化學發光劑或酶)之經分離核酸。該探針與靶核酸鏈互補，在本發明之狀況下，可與玉米品系MON89034之基因組DNA鏈互補，其中該玉米品系MON89034係來自玉米植物抑或來自包括該品系之DNA的樣本。本發明之探針不僅包括脫氧核糖核酸或核糖核酸，而且包括特異性結合靶DNA序列且可用於檢測靶DNA序列存在之聚醯胺及其他探針物質。

"引子"係為經分離的核酸，其係藉由核酸雜交而黏接至互補靶DNA鏈，以在引子與靶DNA鏈之間形成雜交體，而後接著由聚合酶(例如DNA聚合酶)沿靶DNA鏈延伸。本發明之引子對係指(例如)藉由聚合酶鏈反應(PCR)或其他習知核酸擴增方法使靶核酸序列擴增之其用途。

探針及引子之長度一般為11個核苷酸或更長，較佳為18個核苷酸或更長，更佳為24個核苷酸或更長，且最佳為30個核苷酸或更長。該等探針及引子在高嚴格雜交條件下可特異性地與靶序列雜交。儘管可由習知方法設計不同於靶序列且保持與靶序列雜交之能力的探針，但較佳地，本發明之探針及引子與靶序列具有全序列相似性。

製備及使用探針及引子之方法描述於(例如)Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，1-3卷，編者Sambrook等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989(在下文中為"Sambrook等人，1989")；Current Protocols in Molecular Biology，編者

Ausubel 等人，Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992(定期更新)(在下文中為"Ausubel 等人，1992")；及Innis 等人，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990。可藉由使用意欲達成目的之電腦程式(諸如Primer(0.5版本，© 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA))而由已知序列獲得PCR引子對。

基於本文中所揭示之側翼DNA及插入序列之引子及探針可用於由習知方法(例如藉由再選殖及對該等序列測序)來確認(且必要時校正)所揭示之序列。

本發明之核酸探針及引子在嚴格條件下與靶DNA序列雜交。任何習知核酸雜交或擴增方法可用於鑑別樣本中基因轉殖品系之DNA的存在。核酸分子或其片段在某些情況下能特異性地與其他核酸分子雜交。如本文中所使用，若兩個核酸分子能形成反平行、雙鏈核酸結構，則該兩個分子被視為能特異性地彼此雜交。若核酸分子顯示完全互補性，則一核酸分子被視為另一核酸分子之"互補股"。如本文中所使用，當分子中之一者之每一核苷酸與另一者之核苷酸互補，則該等分子被視為顯示"完全互補性"。若兩個分子可以足夠穩定性彼此雜交以使其在至少習知"低嚴格"條件下保持彼此黏接，則其被視為"最低程度互補"。類似地，若分子可以足夠穩定性彼此雜交以使其在習知"高嚴格"條件下保持彼此黏接，則其被視為"互補"。習知嚴格條件由 Sambrook 等人，1989 及由 Haymes 等人，於：

Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985)中描述，只要與完全互補性之偏差不完全消除分子形成雙鏈結構之能力，則該等偏差為可允許的。為使核酸分子充當引子或探針，僅須序列充分互補以便能夠在所使用之特定溶劑及鹽濃度下形成穩定雙鏈結構。

如本文中所使用，大體上同源序列為在高嚴格條件下將特異性地與正比較之核酸序列之互補序列雜交的核酸序列。例如在約45°C下6.0×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)，接著在50°C下以2.0 × SSC洗滌之促進DNA雜交之適當嚴格條件為熟習此項技術者所知且可見於Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley及Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中。舉例而言，洗滌步驟中之鹽濃度可選自50°C下約2.0 × SSC之低嚴格度至50°C下約0.2 × SSC之高嚴格度。另外，洗滌步驟中之溫度可自室溫(約22°C)下之低嚴格條件升至約65°C下之高嚴格條件。溫度與鹽均可變化，或者，溫度或鹽濃度在另一變數改變時可保持恆定。在一較佳實施例中，本發明之核酸將在中等嚴格條件下(例如在約2.0 × SSC及約65°C下)特異性地與SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2中所列之核酸分子中之一或多者或其互補股或任一者之片段雜交。在一尤其較佳實施例中，本發明之核酸將在高嚴格條件下特異性地與SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2中所列之核酸分子中之一或多者或任一者之互補股或片段雜交。在本發明之一態樣中，本發明之較佳標記核酸分子具

有 SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2中所列之核酸序列或其互補序列或任一者之片段。在本發明之另一態樣中，本發明之較佳標記核酸分子與SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2中所列之核酸序列或其互補序列或任一者之片段共用80%與100%或90%與100%之間的序列一致性。在本發明之又一態樣中，本發明之較佳標記核酸分子與SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2中所列之序列或其互補序列或任一者之片段共用95%與100%之間的序列一致性。SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2在植物育種方法中可用作標記以類似於"DNA markers: Protocols, applications及 overviews: (1997) 173-185, Cregan等人，編，Wiley-Liss NY"中對於簡單序列重複DNA標記分析所述之方法鑑別遺傳雜交之子代，所有該等文獻均以引用的方式全部併入本文中。可藉由熟習此項技術者已知之許多方法檢測探針與靶DNA分子之雜交，此等方法可包括(但不限於)：螢光標記、放射性標記、基於抗體之標記及化學發光標記。

關於使用特定擴增引子對使靶核酸序列擴增(例如由PCR)，"嚴格條件"為使引子對僅與具有相應野生型序列(或其互補序列)之引子將結合之靶核酸序列雜交且較佳在DNA熱擴增反應中產生獨特擴增產物(擴增子)的條件。

術語"對(靶序列)具特異性"指示探針或引子在嚴格雜交條件下僅與包含靶序列之樣本中之靶序列雜交。

如本文中所使用，"經擴增之DNA"或"擴增子"係指為核酸模板之一部分之靶核酸序列之核酸擴增產物。舉例而

言，為判定由有性雜交所產生之玉米植物是否含有本發明之玉米植物之基因轉殖品系基因組DNA，可使自玉米植物組織樣本提取之DNA經受使用引子對之核酸擴增方法以產生為品系DNA存在之診斷特徵的擴增子，其中該引子對包括來源於鄰近於所插入之異源性DNA之插入位點之植物基因組中之側翼序列之引子及來源於所插入之異源性DNA之第二引子。擴增子具有一定長度且具有亦為品系之診斷特徵的序列。擴增子之長度可在引子對加上一個核苷酸鹼基對、較佳加上約五十個核苷酸鹼基對、更佳加上約兩百五十個核苷酸鹼基對及甚至更佳加上約四百五十個核苷酸鹼基對之組合長度內。或者，引子對可來源於所插入之DNA之兩側上之側翼序列以產生包括整個插入核苷酸序列之擴增子。來源於植物基因組序列之引子對之成員可位於離所插入之DNA分子之一段距離處，此距離可在一個核苷酸鹼基對至約兩萬個核苷酸鹼基對之範圍內。術語"擴增子"的使用特定排除可能在DNA熱擴增反應中形成之引子二聚體。

可藉由包括聚合酶鏈反應(PCR)在內之此項技術中已知之各種核酸擴增方法中之任一方法完成核酸擴增。多種擴增方法在此項技術中已知且尤其描述於美國專利第4,683,195號及第4,683,202號中及於PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications，編者Innis等人，Academic Press, San Diego, 1990中。已開發出擴增高達22 kb之基因組DNA及高達42 kb之噬菌體DNA的PCR擴增方法

(Cheng 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994)。此等方法以及DNA擴增技術中已知之其他方法可用於實施本發明。具有以ATCC號寄存之種子樣本之玉米品系MON89034之異源性DNA插入物之序列或側翼序列可藉由使用來源於本文中所提供之序列之引子使該等序列擴增,繼之以PCR擴增子或經選殖之DNA的標準DNA測序法來驗證(且必要時校正)。

由此等方法所產生之擴增子可由多種技術加以檢測。一個此種方法為遺傳位元分析(Genetic Bit Analysis)(Nikiforov等人Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994),在該分析中,所設計之DNA寡核苷酸與鄰近側翼基因組DNA序列及所插入之DNA序列二者重疊。使寡核苷酸固定於微孔盤之孔中。在所關注之區域的PCR(使用一個在所插入之序列中之引子及一個在鄰近側翼基因組序列中之引子)之後,可使單鏈PCR產物與經固定之寡核苷酸雜交且充當使用DNA聚合酶及對所預期之下一個鹼基具特異性之經標記之ddNTP之單鹼基延伸反應的模板。讀出可基於螢光或基於ELISA。信號指示由成功擴增、雜交及單鹼基延伸所產生之插入物/側翼序列的存在。

另一方法為如由Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000)所述之焦磷酸測序技術。在此方法中,所設計之寡核苷酸與鄰近基因組DNA及插入DNA接合點重疊。使寡核苷酸與所關注之區域之單鏈PCR產物(一個在所插入之序列中之引子及一個在側翼基因組序列中之引子)雜交且在

DNA聚合酶、ATP、硫醯化酶、螢光素酶、腺苷三磷酸雙磷酸酶、5'磷醯硫酸腺苷及螢光素存在下培養。個別添加dNTP且合併產生所量測之光信號。光信號指示由成功擴增、雜交及單鹼基或多鹼基延伸所產生之轉殖基因插入物/側翼序列的存在。

如由Chen等人(Genome Res. 9:492-498, 1999)所述之螢光偏振法為可用於檢測本發明之擴增子之方法。使用此方法，所設計之寡核苷酸與基因組側翼序列及所插入之DNA接合點重疊。使寡核苷酸與所關注之區域之單鏈PCR產物(一個在所插入之DNA中之引子及一個在側翼基因組DNA序列中之引子)雜交且在DNA聚合酶及經螢光標記之ddNTP存在下培養。單鹼基延伸使得合併ddNTP。可使用螢光計將合併量測為偏振之變化。偏振之變化指示由成功擴增、雜交及單鹼基延伸所產生之轉殖基因插入物/側翼序列的存在。

Taqman®(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)被稱作檢測及量化DNA序列存在之方法且在由製造商所提供之說明書中充分瞭解。簡言之，所設計之FRET寡核苷酸探針與基因組側翼序列及插入DNA接合點重疊。在熱穩定聚合酶及dNTP存在下使FRET探針及PCR引子(一個在插入DNA序列中之引子及一個在側翼基因組序列中之引子)環化。FRET探針的雜交使螢光部分自FRET探針上之淬滅部分分裂及釋放。螢光信號指示由成功擴增及雜交所產生之側翼序列/轉殖基因插入序列的存在。

如 Tyangi 等人 (Nature Biotech.14:303-308, 1996) 所述，已描述用於序列檢測的分子信標 (Molecular Beacon)。簡言之，所設計之 FRET 寡核苷酸探針與側翼基因組序列及插入 DNA 接合點重疊。FRET 探針之獨特結構使其含有保持螢光部分及淬滅部分緊密接近之二級結構。在熱穩定聚合酶及 dNTP 存在下使 FRET 探針及 PCR 引子 (一個在插入 DNA 序列中之引子及一個在側翼基因組序列中之引子) 環化。在成功 PCR 擴增後，FRET 探針與靶序列的雜交使探針二級結構得以移除且螢光部分及淬滅部分空間分離，而產生螢光信號。該螢光信號指示由成功擴增及雜交所產生之側翼序列/轉殖基因插入序列的存在。

諸如微流體 (美國專利公開案 2006068398，美國專利第 6,544,734 號) 之其他所述方法提供使 DNA 樣本分離及擴增之方法及裝置。光學染料用於檢測及定量特定 DNA 分子 (WO/05017181)。奈米管裝置 (WO/06024023) 包含用於檢測 DNA 分子之電子感測器或結合特定 DNA 分子且可接著被檢測到之奈米珠粒。

可使用本文中所揭示之組合物及 DNA 檢測技術中所熟知之方法來開發 DNA 檢測套組。套組適用於鑑別樣本中之玉米品系 MON89034 DNA 且可應用於育種含有適當品系 DNA 之玉米植物之方法。套組可含有與 SEQ ID NO:1-7 同源或互補之 DNA 引子或探針或與含於 DNA 之轉殖基因遺傳元件中之 DNA 同源或互補之 DNA 引子或探針，此等 DNA 序列可用於 DNA 擴增反應中或用作 DNA 雜交方法中之探針。

本發明提供命名為玉米品系 MON89034 之轉殖基因玉米植物、植物之子代及植物之細胞，以及自該植物所產生之種子。用於使植物生長、用於產生子代、用於獲得細胞或用於產生包含基因轉殖玉米品系之該種子之農作物的代表性種子已寄存於美國菌種保存中心(ATCC)且寄存編號為 PTA-7455。

自此等實施例及類似實施例所產生之植物及細胞及產物含有為任何生物樣本中來源於基因轉殖玉米品系 MON89034 之任何細胞之 DNA 存在之診斷特徵的 DNA。此係由於此等兩個新穎序列含於基因轉殖玉米品系 MON89034 之細胞內。診斷特徵性 DNA 包含選自由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 組成之群的核苷酸序列。此等序列之關係在本文中及在圖 1 之圖例中且參考圖 1 更明確地描述。

自對為基因轉殖玉米品系 MON89034 之診斷特徵的 DNA 而言純合之種子所生長之玉米植物亦在本發明之範疇內。自對為基因轉殖玉米品系 MON89034 之診斷特徵的 DNA 而言雜合之種子所生長之玉米植物亦在本發明之範疇內，條件為此等種子亦包含診斷特徵性 DNA 序列。自包含診斷特徵性 DNA 之該等植物所產生之細胞、種子及組織亦在本發明之範疇內。

包含為基因轉殖玉米品系 MON89034 之診斷特徵之 DNA 的玉米植物及玉米植物細胞及類似物顯示對鱗翅目昆蟲侵襲具抵抗性。此等細胞及植物含有編碼殺蟲蛋白質(殺昆

蟲劑、毒性劑)Cry2Ab之DNA及具有形成植物細胞之基因組之一部分的SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2之核苷酸序列的DNA。此等植物及植物細胞亦含有編碼殺蟲蛋白質(殺昆蟲劑、毒性劑)Cry1A.105之DNA。此等蛋白質可分別被稱作第一及第二殺蟲蛋白質，或相反。此等蛋白質的表現係自嵌入表現卡匣內之調節組件/遺傳元件達成，該等表現卡匣提供編碼此等毒素之DNA序列中之每一者的表現且在本文中及圖1之圖例中且參考圖1及如SEQ ID NO:5所列之序列充分描述。包含此等序列之玉米植物及玉米植物細胞有效保護植物免受鱗翅目害蟲侵襲，無論對其中存在此等編碼序列之等位基因而言雜合或純合。

本發明亦提供可自本文中所述之序列產生之擴增子，該等擴增子為生物樣本中來源於基因轉殖玉米品系MON89034之DNA的DNA存在之診斷特徵。為生物樣本中基因轉殖玉米品系MON89034 DNA存在之診斷特徵的擴增子含有至少一個由如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所列之核苷酸序列組成之聚核苷酸片段。可使用如下文所述之引子序列自含有至少約0.5飛莫耳(femto-mole)或約0.5皮克(pico-gram)之來源於基因轉殖玉米品系MON89034之DNA的任何生物樣本產生此等擴增子。對應於基因轉殖玉米品系MON89034之DNA之該等生物樣本來源可為由基因轉殖品系得到之玉米粗粉、玉米油、玉米餅、玉米種子、玉米胚芽、玉米澱粉及玉米細粉及類似物。

本發明亦提供顯示相連核苷酸序列(諸如SEQ ID NO:5中

所列之彼等核苷酸序列)之經分離聚核苷酸分子。此等相連核苷酸序列包含：(1)約11個至約12000個核苷酸及之間的任何長度，且進一步包含如SEQ ID NO:1中所列之1-11位或9-20位核苷酸及如SEQ ID NO:2中所列之1-11位或9-20位核苷酸之相連核苷酸；(2)SEQ ID NO:3中所列之約11個至約2000個核苷酸及之間的任何長度之任何相連核苷酸序列，且進一步包含如SEQ ID NO:1所列之1-11位及9-20位核苷酸之相連核苷酸；SEQ ID NO:4中所列之約11個至約914個核苷酸及之間的任何長度之任何相連核苷酸序列，且進一步包含如SEQ ID NO:2所列之1-11位及9-20位核苷酸之相連核苷酸。此等經分離聚核苷酸分子適用於DNA擴增方法中以產生一或多個來自含有玉米DNA之生物樣本之擴增子。該擴增子的檢測為樣本中基因轉殖玉米品系MON89034 DNA存在之診斷特徵。經分離聚核苷酸分子亦適用於各種核苷酸檢測方法中以檢測生物樣本中來源於基因轉殖玉米品系MON89034之DNA的存在。詳言之，包含如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中所列之至少約11個相連核苷酸之聚核苷酸探針適用作該等方法中之探針以檢測樣本中之基因轉殖品系MON89034 DNA。此等經分離聚核苷酸分子之互補序列亦適用於相同檢測及/或擴增方法。

本發明亦提供用於檢測生物樣本中來源於基因轉殖玉米品系MON89034之DNA存在的套組。套組使用探針聚核苷酸分子，與包含如SEQ ID NO:5所列之序列的核苷酸片段顯示大體上同源或顯示大體上互補之含有至少約11個至約

12000個相連核苷酸的該探針分子將適用於檢測樣本中 MON89034 DNA的存在。探針分子應含有如 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2所列之序列中之至少一者。SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2所列之序列亦可被稱作接合序列，亦即在插入玉米植物中以產生基因轉殖玉米品系 MON89034之基因轉殖 DNA之任一端之序列。此等序列分別被任意稱作 5' 及 3' 末端，含有所插入之 DNA 序列之一部分及側翼玉米基因組序列之一部分。舉例而言，SEQ ID NO:1 之 5' 的那一半表示位於所插入之 DNA 之 5' 末端側翼之玉米基因組序列之 3' 末端，所插入之 DNA 之 5' 末端由如 SEQ ID NO:1 所列之序列之 3' 末端的那一半表示。SEQ ID NO:2 之 5' 的那一半表示所插入之 DNA 之 3' 末端，且其 3' 末端的那一半表示位於所插入之 DNA 之 3' 末端側翼之玉米基因組序列之 5' 末端。在 SEQ ID NO:5 中所列之所插入之序列之位置處之天然產生之玉米基因組中，在所插入之 DNA 之 5' 末端處之側翼序列與所插入之 DNA 之 3' 末端處之側翼序列連接，且與 SEQ ID NO:3 所列之序列(除 SEQ ID NO:3 之 3' 末端 21 個核苷酸以外)互補之序列雜交的第一引子分子及與如 SEQ ID NO:4 所列之序列(除 SEQ ID NO:4 之 5' 末端 20 個核苷酸以外)雜交的第二引子分子將在熱擴增反應中與為除 MON89034 DNA 以外之 DNA 之模板一起產生擴增子，該擴增子為 MON89034 中不存在所插入之 DNA 的特徵，且當使用 MON89034 DNA 作為模板時相同引子將產生稍大於 12000 個核苷酸之擴增子(視 SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 中

所列之側翼序列中之引子位置而定)。亦提供其他實施例。

提供檢測生物樣本中玉米品系 MON89034 之接合序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 之套組。該套組含有與選自由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或其互補序列組成之群的序列完全互補之聚核苷酸探針，且亦含有用於核酸擴增反應之引子對。該引子對可被稱作由來自 SEQ ID NO:3 之玉米基因組部分之至少約 15 個至約 50 個相連核苷酸組成的第一引子，及由與 SEQ ID NO:5 之異源性插入 DNA 部分互補之至少約 15 個至約 50 個相連核苷酸組成的第二引子。該聚核苷酸引子對之第一引子特異性地與對應於 SEQ ID NO:3 中所列之約 1 位至約 2050 位核苷酸之反向互補序列雜交，且該聚核苷酸引子對之第二引子特異性地與 SEQ ID NO:5 中所列之約 2060 位至約 12,208 位核苷酸之序列雜交，且關於彼此延伸以形成包含 SEQ ID NO:1 之擴增子，該擴增子為樣本中 MON89034 品系 DNA 存在之診斷特徵。一不同引子對可被稱作由與 SEQ ID NO:4 之玉米基因組部分互補之至少約 15 個至約 50 個相連核苷酸組成的第一引子，及由來自 SEQ ID NO:5 之異源性插入 DNA 部分之至少約 15 個至約 50 個相連核苷酸組成的第二引子。該聚核苷酸引子對之第二引子特異性地與對應於 SEQ ID NO:5 中所列之約 1 位至約 11,305 位核苷酸之反向互補序列雜交，且該聚核苷酸引子對之第一引子特異性地與 SEQ ID NO:4 所列之約 21 位至約 914 位核苷酸之序列雜交，且關於彼此延伸以形成包含

SEQ ID NO:2之擴增子，該擴增子為該樣本中MON89034品系DNA存在之診斷特徵。

此等引子對適用於產生視情況包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2之擴增子，且由此為生物樣本中MON89034 DNA存在之診斷特徵。此等擴增子能夠檢測生物樣本中為玉米品系MON89034之診斷特徵之接合序列的存在。

亦提供一種用於產生及檢測為生物樣本中基因轉殖玉米品系MON89034 DNA之診斷特徵之擴增子的方法。該方法包含在核酸擴增反應中使生物樣本同時與兩個或兩個以上引子接觸，進行核酸擴增反應，接著檢測擴增子。只要擴增子含有SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2所列之約1-11或9-20位核苷酸之相連序列或對應於此等位置之互補序列中之至少一者，則該擴增子的存在為樣本中該品系DNA之診斷特徵。

為生物樣本中基因轉殖玉米品系MON89034存在之診斷特徵的核苷酸序列亦可使用其他方法來檢測。舉例而言，使所懷疑含有MON89034 DNA之生物樣本與探針接觸，該探針在嚴格雜交條件下與如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所列之核苷酸序列中之一或更多者雜交；使樣本及探針經受嚴格雜交條件；且接著檢測探針與核苷酸序列的雜交。檢測到雜交為樣本中MON89034 DNA存在之診斷特徵。

本發明亦提供用於在熱擴增反應中產生為生物樣本中玉米品系MON89034 DNA存在之診斷特徵之擴增子的引子聚核苷酸。通常，引子係成對提供，引子對之成員為方便起

見被稱作第一引子及第二引子。第一引子可由如SEQ ID NO:3中所列之玉米基因組部分之至少約15個相連核苷酸組成，且第二引子可由與如SEQ ID NO:5中所列之異源性插入DNA部分互補之至少約15個相連核苷酸組成。此兩個引子將在熱擴增反應中與自含有如SEQ ID NO:1所列之聚核苷酸序列之玉米品系MON89034 DNA所獲得之模板DNA一起產生擴增子。或者，第一引子可由來自SEQ ID NO:4之玉米基因組部分之至少約15個相連核苷酸組成，且第二引子可由與SEQ ID NO:5之異源性插入DNA部分互補之至少約15個相連核苷酸組成。此兩個引子將在熱擴增反應中與自含有如SEQ ID NO:2所列之聚核苷酸序列之玉米品系MON89034 DNA所獲得之模板DNA一起產生擴增子。

在檢測包含玉米DNA(諸如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)之生物樣本中玉米品系MON89034之接合序列之替代方法由以下步驟組成：使樣本與聚核苷酸探針接觸，該探針在嚴格雜交條件下與接合序列中之一者雜交；使樣本及探針經受嚴格雜交條件；且檢測探針與接合序列的雜交。檢測到探針與接合序列的結合/雜交指示生物樣本中存在MON89034 DNA。當經受本文中所述之方法時其DNA產生包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2之DNA擴增子的經穩定轉化之玉米植物係在本發明之範疇內。例示性引子序列，詳言之，引子序列對，係在本文中之實例中及在SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7中列出。

檢測生物樣本中玉米品系MON89034 DNA存在之替代方

法可由以下步驟組成：使樣本與探針接觸，該探針在嚴格雜交條件下與MON89034 DNA雜交且在嚴格雜交條件下不與非MON89034 DNA之玉米植物基因組DNA雜交；使樣本及探針經受嚴格雜交條件；且接著檢測探針與MON89034 DNA的雜交。符合此實施例之探針為選自由SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2組成之群的序列或與該序列互補。檢測到探針與樣本的雜交為樣本中玉米品系MON89034聚核苷酸存在之診斷特徵。只要生物樣本含有至少可檢測量之為樣本中MON89034品系存在之診斷特徵的聚核苷酸，則樣本可為含有MON89034 DNA之任何樣本，包括(但不限於)：玉米油、玉米粗粉、玉米細粉、玉米麩、玉米餅、玉米澱粉、玉米漿、玉米組織、玉米細胞、玉米粒、玉米花粉、玉米根組織、DDGS，及甚至以該基因轉殖玉米發酵之副產物形式所產生之乙醇。聚核苷酸探針可為選自由脫氧核糖核酸、核糖核酸及核苷酸類似物組成之群的任何核苷酸，且可用至少一種螢光團、含有放射性同位素之分子或可以抗體或其他結合型反應特異性檢測之半抗原型分子來標記。

將包含基因轉殖玉米品系MON89034 DNA之玉米植物與連同除品系MON89034以外之玉米植物進行育種，以產生包含為該品系之診斷特徵之DNA的雜交玉米植物後可獲得包含為MON89034基因轉殖品系DNA存在之診斷特徵DNA的各種玉米。包含為基因轉殖玉米品系MON89034之診斷特徵之DNA的該雜交玉米植物係在本發明之範疇內，如自

雜交體產生之種子(只要包含為基因轉殖玉米品系 MON89034之診斷特徵之DNA)，及雜交玉米植物MON89034之花粉、胚珠、種子、根或葉，亦至含有診斷特徵性DNA序列之此等花粉、胚珠、種子、根或葉之程度，及自該等實施例產生之子代。

本發明提供保護玉米植物免受鱗翅目昆蟲侵襲之方法，其包含在目標鱗翅目害蟲之食物中提供一或多個基因轉殖玉米植物細胞，每個玉米植物細胞在其基因組中包含對應於如 SEQ ID NO:1與SEQ ID NO:2中所列之序列及如 SEQ ID NO:1與SEQ ID NO:2之間的SEQ ID NO:5中所列之相連核苷酸序列的聚核苷酸。以該等基因轉殖玉米植物細胞為食之目標鱗翅目昆蟲被阻止進一步以玉米植物細胞所來源之玉米植物為食。

本發明亦提供對玉米植物之目標鱗翅目害蟲有毒之組合物。提供於目標鱗翅目害蟲之食物中之基因轉殖植物細胞之組合物有效保護玉米植物或玉米植物細胞免受鱗翅目昆蟲侵襲，其中每個基因轉殖玉米植物細胞在其基因組中包含對應於如 SEQ ID NO:1與SEQ ID NO:2中所列之序列連同如 SEQ ID NO:1與SEQ ID NO:2之間的SEQ ID NO:5中所列之相連核苷酸序列的聚核苷酸，條件為該玉米植物或細胞表現來自含於該相連核苷酸序列內之表現卡匣的 Cry1A.105及/或Cry2Ab2。呈基因轉殖玉米種子形式之該等組合物已以寄存編號PTA-7455寄存於美國菌種保存中心。該等抗昆蟲玉米植物或其部分在該植物之細胞之基因

組中將含有具有至少一個選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5組成之群之核苷酸序列的DNA。抗昆蟲玉米植物之子代及種子亦包括於本發明之範疇內，其中該子代及種子具有本文中所提及之診斷特徵性序列。該等抗昆蟲玉米植物可以包含以下步驟之方法產生：使基因轉殖玉米植物品系MON89034與不同玉米植物雜交，及藉由針對至少一個選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5組成之群的核苷酸序列進行分析來選擇抗昆蟲子代。

抗昆蟲基因轉殖玉米品系MON89034可與玉米之其他基因轉殖變種組合，諸如抗除草劑(諸如嘉磷塞(glyphosate)、固殺草(glufosinate)及diacamba及類似除草劑)之玉米，或因插入編碼蛋白質(諸如PS149B1及經修飾之Cry3Bb)之序列而抗食根性昆蟲之玉米，或因插入編碼其他毒素蛋白質(諸如VIP3A、Cry1Ab及Cry1Fa及類似蛋白質)之序列而抗鱗翅目昆蟲侵襲之基因轉殖玉米的其他變種。將所有此等不同基因轉殖品系之各種組合連同本發明之玉米植物(亦即MON89034品系)一起育種以提供抗鞘翅目及鱗翅目侵襲及抗選擇性除草劑之雜交基因轉殖玉米之改良變種。該等變種與非基因轉殖及個別性狀基因轉殖變種相比顯示改良之產量及耐旱性特徵。

提供產生抗昆蟲侵襲之玉米植物之方法，其中該玉米植物包含殺蟲有效量之如SEQ ID NO:5中所列之毒素編碼序

列。該方法包含自基因轉殖玉米品系 MON89034 提取毒素編碼序列且將此等編碼序列單獨或一起引入一或多個玉米細胞中以產生包含此等一或多個毒素編碼序列之基因轉殖玉米細胞。接著使基因轉殖玉米細胞生長(再生)為包含一或多個編碼序列之基因轉殖玉米植物，且基因轉殖植物接著顯示對昆蟲侵襲具抵抗性。

本發明提供一種確定包含玉米品系 MON89034 DNA 之基因轉殖玉米植物之 DNA 關於為生物樣本中該 MON89034 DNA 存在之診斷特徵的 DNA 之接合性的方法。該方法由以下步驟組成：第一步驟，使樣本與包含 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 及 SEQ ID NO:10 之三個不同引子接觸，當一起用於包含玉米品系 MON89034 DNA 之核酸擴增反應時產生為玉米品系 MON89034 之診斷特徵的第一擴增子，且當用於包含除 MON89034 DNA 以外之玉米基因組 DNA 之核酸擴增反應時產生為除 MON89034 DNA 以外之玉米基因組 DNA 之診斷特徵的第二擴增子。以下步驟由進行核酸擴增反應及比較熱擴增反應期間所產生之擴增子組成。檢測到兩種擴增子的存在為樣本接合性之診斷特徵。僅檢測到第一擴增子指示樣本僅含有 MON89034 DNA，亦即純合性樣本。僅檢測到第二擴增子指示樣本不含有 MON89034 DNA。在樣本中同時檢測到第一擴增子與第二擴增子指示樣本含有：(1)關於僅含有雜合起始物質之純樣本之雜合 DNA，或(2)含有純合與雜合起始樣本 DNA 之樣本，或(3)含有純合、雜合及/或除 MON89034 DNA 以外之樣本之一

些組合的樣本。

本發明亦提供包含為插入玉米植物之細胞之基因組中的基因轉殖DNA片段之診斷特徵之DNA的生長中玉米植物。玉米細胞之基因組中之DNA包含選自由以下各序列組成之群的序列中之任一者或全部序列：

(a) 如 SEQ ID NO:5 中所列之核苷酸序列；

(b) 如 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 中所列之核苷酸序列兩者；

(c) 如 SEQ ID NO:3 所列之核苷酸序列；及

(d) 如 SEQ ID NO:4 所列之核苷酸序列。

以下實例包括在內以示範本發明之某些較佳實施例之實例。熟習此項技術者應瞭解，以下實例中所揭示之技術表示本發明者已發現在本發明實施中良好執行之方法，且由此可被視為構成對於其實施而言較佳之模式的實例。然而，熟習此項技術者應瞭解，根據本發明揭示內容，在不脫離本發明之精神及範疇的情況下，可在所揭示之特定實施例中作出許多改變且仍獲得相同或類似結果。

實例

實例 1

本實例說明基因轉殖玉米品系 MON89034 的構建及分子表徵。

藉由利用質體構建體 pMON38850 進行近交玉米株之由土壤桿菌介導之轉化方法來產生玉米植物 MON89034 (表現卡匣如圖 1 所示)。所使用之轉化方法類似於美國專利第

100年(0月)日修(正)正

第 096118812 號專利申請案
中文說明書替換頁(100 年 10 月)

6,603,061 號所述之彼轉化方法。質體構建體 pMON38850 含有具有對玉米植物細胞中 Cry1A.105 殺蟲蛋白質的表現而言必需之調節遺傳元件的連接植物表現卡匣。使玉米細胞再生為由至少約 23,000 個不同基因轉殖品系組成之完整玉米植物。個別基因轉殖品系(植物)係選自顯示完整植物表現卡匣及對鱗翅目昆蟲幼蟲食害具抵抗性之品系群體。在基因組中含有 pMON38850 之連接植物表現卡匣之玉米植物為本發明之一態樣。在大體上分析此等基因轉殖品系後，基於分子表徵及不存在任何不合需要之表型或農藝缺陷作用，選擇 MON89034 基因轉殖品系。

如圖 1 所說明含於 MON89034 玉米基因組中之轉殖基因遺傳元件之序列由下述元件組成，各者彼此可操作地相連接。首先在序列之經任意定義之 5' 末端處(亦即，接近圖 1 所描繪之片段的左中部)標記來自農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之右邊界區域(RB)之一部分。其後依次為由增強之 CaMV 35S 啟動子元件組成之表現卡匣(本文中稱作 P-CaMV35Sen，位於 SEQ ID NO:5 上之 2350 位至 2651 位處)；小麥葉綠素 A/B 結合蛋白質非翻譯前導序列(本文中稱作 L-Ta.lhcb1，位於 SEQ ID NO:5 上之 2678 位至 2738 位處)；水稻肌動蛋白內含子序列(本文中稱作 I-Os.Act1，位於 SEQ ID NO:5 上之 2755 位至 3234 位處)；編碼嵌合基因 Cry1A.105 之非天然產生之序列(位於 SEQ ID NO:5 上之 3244 位至 6777 位處)；及來自小麥之 3' 末端區域(本文中稱作 T-Ta.Hsp17-1:1:1，位於 SEQ ID NO:5 上之

6809位至7018位處)。除邊界序列以外，上文提及之元件之組合當在玉米植物中時共同起作用以使Cry1A.105殺蟲蛋白質得以表現。接著使此等元件依次連接由以下元件組成之另一表現卡匣：玄參花葉病毒啟動子(Figwort mosaic promoter)(位於SEQ ID NO:5上之7086位至7649位處)、玉蜀黍Hsp70前導序列(本文中稱作HSP70或I-Hsp70，位於SEQ ID NO:5上之7672位至8475位處)及玉蜀黍葉綠體轉運肽編碼序列(本文中稱作CTP2或TS-SSU-CTP，位於SEQ ID NO:5上之8492位至8892位處)。此等可操作地連接之片段接著連接編碼殺蟲蛋白質Cry2Ab之核苷酸序列(位於SEQ ID NO:5上之8893位至10800位處)，該核苷酸序列在其3'末端處連接根癌土壤桿菌之胭脂鹼合成酶基因之3'非翻譯區(本文中稱作T-AGRtu.nos-1:1:13，位於SEQ ID NO:5上之10827位至11377位處)。位於Cry2Ab編碼序列側翼之此等元件當存在於玉米植物中時共同起作用以引導Cry2Ab表現。Cry2Ab表現卡匣後面接著依次為由來自根癌土壤桿菌之左邊界(LB)區域之足夠部分組成之核苷酸序列。

適用作DNA擴增方法中之引子的DNA分子可來源於含於MON89034品系中之轉殖基因插入物之遺傳元件的序列。此等引子分子可用作引子組之一部分，該引子組亦包括來源於位於轉殖基因插入物側翼之品系之基因組的DNA引子分子。

由左及右邊界片段及在邊界片段之間的兩個連接植物表現卡匣(編碼Cry1A.105之第一表現卡匣及編碼Cry2Ab之第

100年(0月)日修(正)

第 096118812 號專利申請案
中文說明書替換頁(100 年 10 月)

二表現卡匣，其中每個卡匣關於哪一者被命名為第一或第二卡匣可互換)組成之插入玉米基因組中產生基因轉殖玉米植物品系 MON89034 的 pMON38850 質體 DNA 之部分係由詳細的分子分析來加以表徵。進行此等分析以鑑別僅含有由邊界及在邊界之間的所要兩個表現卡匣組成之單一及完整插入片段的品系(玉米基因組內整合位點的數目)、複本數(一個基因座內轉型(T)-DNA 之複本的數目)及所插入之基因卡匣的完整性(亦即，已知存在於質體 pMON38850 中之序列不存在任何重排或序列變異)。所使用的 DNA 分子探針包括完整 Cry1A.105 編碼區及其個別調節元件、啟動子、內含子，及植物表現卡匣之聚腺苷酸化序列，及質體 pMON38850 骨架 DNA 區。自分析所有品系所獲得之資料證明 MON89034 含有具有 Cry1A.105 表現卡匣之一個複本的單一 T-DNA 插入。在 MON89034 之基因組中未檢測到來自連接或未連接完整基因卡匣之轉化載體 pMON38850 之其他元件。最後，進行 PCR 及 DNA 序列分析以確定 5' 及 3' 插入植物中之基因組接合，確認插入物內元件之組織(參見(例如)圖 1)，且確定產生基因轉殖玉米品系 MON89034 之插入玉米植物基因組中之 DNA 的完整序列。完整插入序列連同在所插入之 DNA 之任一端之玉米基因組側翼序列的一部分在如 SEQ ID NO:5 所列之序列中描述。

在 Harbil 5G-HD 塗料振盪器 (Harbil Inc, Cincinnati, Ohio) 中藉由首先將種子(至多 200 粒種子)加工成細粉而自玉米種子提取來自 MON89034 之基因組 DNA 及來自除

MON89034以外之玉米的非基因轉殖DNA(對照DNA)。簡言之，在提取緩衝液(EM Science目錄號3700，EM Science, Gibbstown, New Jersey, USA)中提取粉末狀種子且用異丙醇(Sigma目錄號I-0398，Sigma，St. Louis, MO, USA)使DNA自溶液沉澱。將經沉澱之DNA纏繞於含有70%乙醇之微離心管中。將DNA在微離心管中以最大速度(約14,000 rpm)粒化約5分鐘，真空乾燥，且再溶解於TE緩衝液(pH 8.0)中。接著將DNA儲存於4°C之冷凍器中。此方法可由熟習此項技術者改進以自單一玉米種子提取DNA。

用於鑑別樣本中之品系MON89034之例示性方法描述於品系特異性端點Taqman PCR中，對於該TAQMAN[®] PCR之條件之實例描述於表1及表2中。檢定中所使用之DNA引子為引子SQ2842(SEQ ID NO:6)、SQ2843(SEQ ID NO:7)、6FAM[™]標記之引子PB880(SEQ ID NO:14)及VIC[™]標記之引子PB2931(SEQ ID NO:15)，6FAM及VIC為附著於DNA引子上之Applied Biosystems (Foster City, CA)之螢光染料產品。對於Taqman MGB探針而言，Taq DNA聚合酶之5'-核酸外切酶活性使探針自5'末端在螢光團與抑止劑之間分裂。當與靶DNA鏈雜交時，抑止劑及螢光團在三維空間中充分分離以產生螢光(螢光團激發波長)信號。

SQ2842(SEQ ID NO:6)及SQ2843(SEQ ID NO:7)當與PB880(SEQ ID NO:14)一起用於此等反應方法中時產生為品系MON89034 DNA之診斷特徵的DNA擴增子。此分析之對照物應包括來自含有品系MON89034 DNA之玉米的陽性

對照物、來自非基因轉殖玉米或來自除品系 MON89034 以外之基因轉殖玉米的陰性對照物，及不含有模板 DNA 之陰性對照物。

SQ1564(SEQ ID NO:17)及 SQ1565(SEQ ID NO:18)當與 PB351(SEQ ID NO:21)一起用於此等反應方法中時產生為 MON89034 中 Cry1A.105 之診斷特徵的擴增子。

將此等檢定最優化而與 Applied Biosystems GeneAmp PCR 系統 9700 或 Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler 梯度溫度循環器一起使用。熟習此項技術者已知之用於產生鑑別品系 MON89034 DNA 之擴增子的其他方法及設備處於技術範圍內。

只要可檢測到結合，則特異性結合生物樣本中之 SEQ ID NO:1 或其完全互補序列且含有如 SEQ ID NO:1 中所列之至少 11 個相連核苷酸或視情況 SEQ ID NO:1 中之序列之反向互補序列的任何探針為彼樣本中玉米品系 MON89034 DNA 存在之診斷特徵。只要可檢測到結合，則特異性結合生物樣本中之 SEQ ID NO:2 或其完全互補序列且含有如 SEQ ID NO:2 中所列之至少 11 個相連核苷酸或視情況 SEQ ID NO:2 中之序列之反向互補序列的任何探針為彼樣本中玉米品系 MON89034 DNA 存在之診斷特徵。

用於或經設計用於自包含玉米 DNA 之生物樣本產生擴增子的任何引子對被視為在本發明之範疇內，且該擴增子包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或視情況包含該兩個序

100年10月7日修(更)正換頁

第 096118812 號專利申請案(劃線)
中文說明書替換頁(100 年 10 月)

列。為達成本文中所揭示之本發明之目的，包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或二者之任何此種擴增子為該生物樣本中玉米品系 MON89034 DNA 存在之診斷特徵。以下僅為例示性實例。

表 1. 玉米 MON89034 品系特異性端點 TAQMAN[®] PCR

步驟	試劑	量	註釋
1	無核酸酶之水	添加至 10 μ l 最終體積	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems 目錄號 4304437)	5 μ l	1 $\times$ 最終濃度
3	引子 SQ2842 (SEQ ID NO:6) 及 SQ2843 (SEQ ID NO:7) (再 懸浮於無核酸酶之水中至各 20 μ M 之濃度)	0.5 μ l	1.0 μ M 最終濃度
4	引子 6FAM TM PB880 (SEQ ID NO:14) (再懸浮於無核酸酶之 水中至 10 μ M 之濃度)	0.2 μ l	0.2 μ M 最終濃度
5	內部對照引子-SQ2842 及內 部對照引子 SQ2843	0.2 μ l	0.2 μ M 最終濃度
6	所提取之 DNA (模板): • 待分析之樣本 (單獨葉) • 陰性對照 • 陰性對照 • 陽性對照 • 陽性對照	3.0 μ l • 4-80 ng 之基因組 DNA • 4 ng 之非基因轉殖玉 米基因組 DNA • 無 DNA 模板 (DNA 再 懸浮於其中之溶液) • 4 ng 之來自已知品系 MON89034 雜合玉米 之基因組 DNA • 4 ng 之來自已知品系 MON89034 純合玉米 之基因組 DNA	於水中稀釋
7	輕柔混合，在每個反應最高 處添加 1-2 滴礦物油。		

在 Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler 梯度溫度循環器或 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 或 MJ Research DNA Engine PTC-225 溫度循環器中使用以下循環參數進行 DNA 擴增。當在 Eppendorf Mastercycler Gradient 或 MJ Engine 中進行 PCR 時，溫度循環器應以所計算之模式運作。當在 Perkin-Elmer 9700 中進行 PCR 時，以設定為最大值之斜坡速度運作溫度循環器。

表 2. 接合性檢定溫度循環器條件

循環編號	設置：Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	
1	50°C	2分鐘
1	95°C	10分鐘
10	95°C	15秒
	64°C	1分鐘(-1°C/循環)
30	95°C	15秒
	54°C	1分鐘
1	10°C	永久

實例 2

本實例說明包含為基因組中基因轉殖玉米品系 MON89034 之診斷特徵之 DNA 的玉米植物之鑑別及該玉米植物之接合性之確定。

用於自在基因組中含有品系 MON89034 DNA 之純合子代鑑別雜合之方法描述於接合性檢定中，對於該接合性檢定之條件例示於表 3 及表 4 中。接合性檢定中所使用之例示性 DNA 引子為引子 SQ2842 (SEQ ID NO:6)、SQ2843 (SEQ ID NO:7)、SQ6523 (SEQ ID NO:10)、SQ6524 (SEQ ID

NO:11)、6FAM™標記之引子PB880(SEQ ID NO:14)及VIC™標記之引子PB2931(SEQ ID NO:15)。如上文所指示，6FAM及VIC為附著於DNA引子上之Applied Biosystems (Foster City, CA)之螢光染料產品。

SQ2842(SEQ ID NO:6)、SQ2843(SEQ ID NO:7)、SQ6523(SEQ ID NO:10)、SQ6524(SEQ ID NO:11)當在含有模板DNA之生物樣本含有為樣本中玉米品系MON89034存在之診斷特徵之DNA的熱擴增反應中一起使用時產生為除玉米品系MON89034 DNA以外之玉米DNA之診斷特徵的DNA擴增子(與玉米DNA來源於非基因轉殖樣本抑或來源於一些其他基因轉殖樣本無關)。或者，該反應將自含有來源於玉米基因組之DNA的生物樣本產生兩個不同的DNA擴增子，其中該玉米基因組對對應於存在於基因轉殖玉米品系MON89034中之所插入之DNA的等位基因而言為雜合的。此等兩個不同的擴增子將對應於來源於野生型玉米基因組基因座之第一擴增子，及為玉米品系MON89034 DNA存在之診斷特徵的第二擴增子。僅產生對應於對於雜合基因組所述之第二擴增子之單一擴增子的玉米DNA之樣本為樣本中玉米品系MON89034存在之診斷特徵，且為確定用作模板之玉米DNA係產生於對對應於基因轉殖玉米品系MON89034插入DNA之等位基因而言純合的玉米種子之診斷特徵。此分析之對照物應包括來自含有品系MON89034 DNA之純合及雜合玉米的陽性對照物、來自非基因轉殖玉米或玉米之任何其他基因轉殖變種的陰性對照物，及不含

有模板 DNA 之陰性對照物。將此檢定最優化而與 Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler 梯度溫度循環器一起使用。熟習此項技術者已知之用於產生鑑別與 MON89034 植物雜交之子代之接合性之擴增子的其他方法及設備處於技術範圍內。

表 3. 接合性檢定反應溶液

步驟	試劑	量	註釋
1	無核酸酶之水	添加至 5 μ l 最終體積	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems 目錄號 4304437)	2.5 μ l	1 $\times$ 最終濃度
3	引子 SEQ ID NO:6 及 SEQ ID NO:7 (再懸浮於無核酸酶之水中至 20 μ M 之濃度)	0.05 μ l	0.25 μ M 最終濃度
4	PB880 SEQ ID NO:14 引子 6FAM TM (再懸浮於無核酸酶之水中至 10 μ M 之濃度)	0.01 μ l	0.4 μ M 最終濃度
5	PB2931 SEQ ID NO:15 引子 VIC TM (再懸浮於無核酸酶之水中至 10 μ M 之濃度)	0.01 μ l	0.15 μ M 最終濃度
6	REDTaq DNA 聚合酶 (1 單位/微升)	1.0 μ l (建議在下一個步驟之前轉換移液管)	1 單位/反應
7	所提取之 DNA (模板): • 待分析之樣本 (單獨葉) • 陰性對照 • 陰性對照	2.0 μ l • 4-80 ng 之基因組 DNA • 4 ng 之非基因轉殖玉米基因組 DNA • 無 DNA 模板 (DNA 再懸浮於其中之溶液)	於水中稀釋

	• 陽性對照 • 陽性對照	• 4 ng之來自已知品系MON89034雜合玉米之基因組DNA • 4 ng之來自已知品系MON89034純合玉米之基因組DNA	
8	輕柔混合，在每個反應最高處添加1-2滴礦物油。		

在 Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler 梯度溫度循環器 或 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 或 MJ Research DNA Engine PTC-225 溫度循環器 中使用以下循環參數進行 DNA 擴增。當在 Eppendorf Mastercycler Gradient 或 MJ Engine 中進行 PCR 時，溫度循環器應以所計算之模式運作。當在 Perkin-Elmer 9700 中進行 PCR 時，以設定為最大值之斜坡速度運作溫度循環器。

表 4. 接合性檢定溫度循環器條件^a

以連續次序之循環編號	溫度及持續時間	
1	50°C	2分鐘
1	95°C	10分鐘
10	95°C	15秒
	64°C	1分鐘(-1°C/循環)
30	95°C	15秒
	54°C	1分鐘
1	10°C	浸泡

a：使用 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700

對應於基因轉殖品系 MON89034 之種子已於 2006 年 3 月 28

日按照布達佩斯條約(Budapest Treaty)寄存於美國菌種保存中心(ATCC)(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110)。ATCC寄存編號或專利寄存名稱為PTA-7455。寄存物將在寄存處保持30年或最後請求後5年之時段，或歷時專利之有效使用期，哪個更長就按哪個，且在彼時段內必要時將替換。

已說明及描述本發明之原則，熟習此項技術者應顯而易見，在不脫離該等原則的情況下本發明可在配置及細節上加以修改。吾人主張在附加申請專利範圍之精神及範疇內的所有修改。

本說明書中所引用之所有公開案及所公開之專利文獻皆以引用的方式併入本文中，其引用程度如同每一單獨公開案或專利申請案係特別及單獨以引用的方式併入之程度一般。

【圖式簡單說明】

圖1展示存在於基因轉殖玉米品系MON89034之基因組內之轉殖基因插入物的組織。中空或白條表示所插入之DNA。在白條下方為表示所插入之DNA內各種元件之圖。所插入之DNA之末端已被任意命名為5'(圖左側)及3'(圖右側)。在圖之每一端下面標記右邊界及左邊界序列或片段說明所插入之DNA內之各種元件。所插入之DNA內表現卡匣中之經標記之元件以連續次序自右邊界起始為：e35S啟動子、小麥CAB非翻譯前導序列、水稻肌動蛋白內含子、Cry1A.105之編碼序列、小麥HSP17 3'末端及聚腺苷酸化

序列、FMV啟動子、hsp70內含子、核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(rubisco)小次單元葉綠體靶肽編碼序列、Cry2Ab編碼序列、nos 3'末端及聚腺苷酸化信號序列，及接著左邊界。在中空或白條之任一端處垂直畫線之條對應於任意標記之5'及3'玉米基因組側翼序列。經畫線及空或白條上方之最長黑線表示SEQ ID NO:5(由描繪5'側翼序列、所插入之DNA序列及3'側翼序列之圖所表示之全長序列)。在標記為SEQ ID NO:5之黑線上方及下方之較短黑線表示SEQ ID NO:5內可見經特異標記之序列中之每一者的接近位置(亦即SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4)。SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2及來源於含有SEQ ID NO:1及/或SEQ ID NO:2之玉米品系MON89034之任何序列為生物樣本中玉米品系MON89034 DNA之診斷特徵。

序列表

<110> 對應於基因轉殖品系MON89034之玉米植物及種子及其檢測方法和用途

<120> 美商孟山都科技有限責任公司

<130> 38-21(53618)0000

<140> 096118812

<141> 2007-05-25

<150> 60/808,834

<151> 2006-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'接合序列；對應於SEQ ID NO:5之2051-2071位

<400> 1

aatgagtatg atggatcagc a

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3'接合序列；對應於SEQ ID NO:5之11295-11314 位

<400> 2

actcattgca tccccgaaa

20

<210> 3

<211> 2071

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'側翼序列加上接合序列；對應於SEQ ID NO:5之1-2071位

<400> 3

aatattttaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60

tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttgaaatac 120

aagcgaaaag agagctaatt agggggacat ccatattttc tatgggtgtt gaataagagt 180

cacgcgggaa taagalgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgttgt tccaaaaaat 240

cgagtagacg gtgtcgcttc caccatatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg 300

cgcccgccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc 360

ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcgggggtg 420

cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta cataatgatt gtcgtgaac ctgtgagggtg 480

ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctgggtgtgt tgacggactc gaacggggcc 540

100年10月 日修(正)換頁

第 096118812 號專利申請案
中文序列表替換頁(100 年 10 月)

```

gggcgtgtgg tgggctagc tgggtgggt tgcctgccag ccagccagcc acacatcagc 600
gagcatgcag agcctaagca tgtatgtacg gatcggttg cttagcgggt aagggttgt 660
ttggtttggc ttttggcttt ggcttttggc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
atttggtttg acttttggct ttttggcttt gtccctaaa agccaaaagc caaacaagg 780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag 840
caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960
tacaacagct ttttccacag ctacagccc acagcaactt ttttccagc cacagcccaa 1020
ccaaacagac ccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcctttagt ggcttttggc tggaaactgt 1140
aaaacatata tcgaagaact ttaacgact ttagtggtt tccaccaaac gatttctagc 1200
tttttaacag cacacagctt acaacagctt ttttccagc tcacagccca caacaactt 1260
ttctacagcc acaaccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg 1320
tcagcttga ttgcatgcc atctctgtct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac 1380
catccaacaa ggccgtgtct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct 1440
ccaccgttcg ccgccgtcca ctaccaatc aacacggaac gccaaaaca cacacacag 1500
cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc 1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
ggctccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgtca 1740
cgcatgttac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg ccgcctgccg 1800
gccggctttt ttattattat tgaacatga ggctatttct cctccacac gggctacgac 1860
gtgagcacga gtactgggat ccccggtacc gccctctctg tccctgtctg tactccagcc 1920
actgaaatgt tgcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaacc catgcacggc 1980
cattcaaatt caggtgccca cgtacgtcag ggtgtgtgtg ctactactat caagccaata 2040
aaaggatggt aatgagtag atggatcagc a 2071

```

<210> 4
 <211> 914
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3'側翼序列加上接合序列；對應於SEQ ID NO:5之11295-12208 位

```

<400> 4
actcattgca tccccggaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggattattata gataccgtgt 60
tattttttga gtattggaaa ttcatattca acccaaagtt tcttcatggc acatctagct 120
tttgcctaatt accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
atcaaatcag caccgtccgg tccgtgcgca cctctctctc cgctattcag ttgcatactt 300
gcagcagggt ctccctctct accatttctt ctgcctctct tctcgtctac tggtcagatt 360

```

catcctgcct cccccgatg cgctccctcc ccatgccccg tctcgacta tggccacacc 420
 tcaccgctgg gagacgaaga cggtaggacgc atcctcacct cctccgctag ttgtcgtct 480
 tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcgggt cggcgctccg acgccgccgc 540
 ttctcccttc cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
 tctgcataga ggagggttgt agtggcaagc agcaatgcca acaccgaggc ggccaagac 660
 taggcaacaa taggacggca cggccgggtg tcagcgaggt ggcgggcatcg tgtgccgcta 720
 ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccacccgga cgccctcaat 780
 gcactgatat ctaccgggc tccatcgccg cccttccctc ctccctctc cctgtgcctc 840
 cctctcttgc cctctccctt ccaactgtct ccgccccagc cctagcccaa ccacctcccg 900
 cgcagggtca ccaa 914

<210> 5
 <211> 12208
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5'側翼序列加插入之 DNA 序列加 3'側翼序列

<400> 5
 aatatltaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60
 tttltgaagt tttcaaaagg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttgaaatac 120
 aagcgaagaag agagctaatg agggggacat ccataatttc tatggtgttt gaataagagt 180
 cacgcgggaa taagaatgaac accgaaacaa ttttttltga gctacgttgt tccaaaaaat 240
 cgagtagacg gtgtcgcttc caccctcatc tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg 300
 cgcccccggt gtgtccgtc gtcctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc 360
 ggctttgttc atgtttcgaa agaagattac aggtccctta gaagagagga cgcgggggtg 420
 cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta cataatgatt gtctgtgaac ctgtgaggtg 480
 ggtaggtagg taggtggaga tttltgttaa ctgggttgtt tgacggactc gaacggggcc 540
 gggcgtgtgg tgtggctagc tgtgtgtgtt tgcctgccag ccagccagcc acacatcagc 600
 gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggtttg cttagcgggt aagggttgtt 660
 ttggtttggc ttttggcttt ggcttttggc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
 atttgtttg acttttggct tttggctttt gtccctaaa agccaaaagc caaacaagg 780
 gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtga aatctgaaag 840
 cacccttgaa ctgtcttlla gttgcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
 acttllaacg acttlttagt gtttccacca aacagttag ctlttllaacg gcttacagcc 960
 tacaacagct ttttccacag ctacagccc acagcaactt ttttccagc cacagcccaa 1020
 ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt tttctaaaagc cgactttctc 1080
 gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgccttttagt ggcttttggg tggaaactgt 1140
 aaaacatata tcgaagaact ttttaacgact ttttagtggt tccaccaaac gatltctagc 1200
 ttttlaacag cacacagcct acaacagctt ttttccagc tcacagccca caacaacttt 1260
 ttttccagcc acaaccaaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg 1320
 tcagcttltga ttgcatgcc atctcttgcct ccacttgtct ctctggccgt cgicagccac 1380

catccaacaa ggccgggtgt actggcgggt cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct	1440
ccaccgttcg ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg	1500
cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tatgttacgc	1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct	1620
ggctccggcg caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga	1680
cacggaccgc ggctgtgtgc gatcgcgggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgtca	1740
cgcattgtac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg ccgccgtccg	1800
gccggctttt ttattattat tggaaatga ggctatttct cctccacac gggctacgac	1860
gtgagcacga gtactgggal ccccgatcc gccctctctg tccctgtctg tactccagcc	1920
actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgattctcg cacggaaacc catgcacggc	1980
catlcaaatl caggigccca cgtacgtcag ggtgtgtctg ctactactat caagccaata	2040
aaaggatggt aatgagtag atggatcagc aatgagtag atggtaata tggagaaaaa	2100
gaaagagtaa ttaccaattt tttttcaatt caaaaatga gatgtccgca gcgttattat	2160
aaaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgac cgtcgtattt ataggcgaaa	2220
gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttct acgtgtctac attcacgtcc	2280
aaatgggggc tttagatgaga aacttcacga ttggcgcgcc caaagcttgg tcgagtggaa	2340
gctagctttc cgatcctacc tgcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggct	2400
cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca	2460
gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa	2520
ccacgtcttc aaagcaagtg gatgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac	2580
aatcccacta tcttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt catttggaga	2640
ggacacgttg acaagctgac tctagcagat cctctagaac catcttccac acactcaagc	2700
cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaaggagag gcctccgccg	2760
ccgccggtaa ccaccccgcc cctctcctct tctttctcc gttttttt ccgtctcggt	2820
ctcgatcttt ggcttggta gtttgggtgg cgcagaggcg gcttcgtgcg cgccagatc	2880
ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggct ggggtctctg ccggcgltga tccggcccgg	2940
atctcgcggg gaatggggct ctcggaatga gatctcgat ccgccgttgt tgggggagat	3000
gatggggggt ttaaaatttc cgcctgtcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac	3060
tatggtttat atttttatat atttctgtg ctctgtcagg cttagatgtg ctagatcttt	3120
cttctctctt ttgttggta gaattgaat ccttcagcat gtltcatcgg tagttttct	3180
tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt cgcggagctt ttgttaggta gaagtgatca	3240
accaaggaca acaacccaaa calcaacgag tgcatccgtt acaactgcct cagcaacct	3300
gaggctcagg tgcctggcgg tgagcgcatc gagaccggtt acaccccat cgacatctcc	3360
ctctccctca cgcagtctct gctcagcgag ttctgtccag gcgttggctt cgtcctgggc	3420
ctcgtggaca tcatctgggg catctttggc ccttccagt gggacgcctt cctggtgcaa	3480
atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gatttcgcca ggaaccaggc calcagccgc	3540
ctggaggggc tcagcaacct ctaccaaalc tacgctgaga gcttccgca glgggaggcc	3600

gacccccacta acccagctct cgcgaggag atgcgcattc agttcaacga catgaacagc	3660
gcccigacca ccgccatccc acitctcgcc gtccagaact accaagtccc gctccctgtc	3720
gtgtacgtcc aggccgcaa cctgcaccic agcgtgtcga gggacgtcag cgtgtttggc	3780
cagaggtaggg gcttcgacgc cgcaccatc aacagccgct acaacgacct caccaggctg	3840
atcggcaact acaccgacca cgtgttcgc tggtaacaac ctggccgtcc tggacattgt	3900
gtccctcttc ccgaactacg actcccgac ctaccgatc cgcaccgtgt cccaactgac	3960
ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcttggg gaacttcgac ggtagcttca ggggcagcgc	4020
ccaggggcalt gagggctcca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagcatcac	4080
tactacacc gatgccacc gcggcgagta ctactggctc ggccaccaga tcatggcttc	4140
cccggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac ctctctctc tacggcacga tgggcaacgc	4200
cgtccacaa caacgcaltc tcgctcagct gggccagggc gtctaccgca ccctgagctc	4260
cacctgttac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcttggg	4320
tggcactgag ttcgcttacg gcacctctc caacctgccc tccgtgtct accgcaagag	4380
cggcacggtg gattcccttg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca	4440
gggtttttcc cacaggctca gccacgtgtc catgttccgc tccggcttca gcaactcgtc	4500
cgtgagcalt atcagagctc ctatgtctc ttggatacac cgtagtgtc agttcaacaa	4560
catcatgtca tccgacagca ttactcaaat accttgggt aaagcacata cacttcagtc	4620
aggtaactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtgcacaag	4680
tggaggacct ttigtctaca ctattgttaa calcaatggc caattgcccc aaaggatcgc	4740
tgaagaatc cgctatgctt ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcaggtag	4800
aaggatcttt gctggctagt tcaacaagac tatggatacc ggtgacctt tgacattcca	4860
atcttttagc tacgcaacta tcaacacagc ttltacatt ccaatgagcc agagtagctt	4920
cacagtaggt gctgacactt tcagctcagg gaatgaagtt tacatcgaca ggtttgaatt	4980
gattccagtt actgcaacct tcgaggctga glacaacctt gagagagccc agaaggctgt	5040
gaacgccctc ttacctcca ccaatcagct tggcttgaaa actaacgtta ctgactatca	5100
catlgaccaa gtgtccaact tggtcacctt ccttagcgt gagttctgcc tcgacgagaa	5160
gcgtgaactc tccgagaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatctctt	5220
gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac	5280
cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttaaggag aactacgtca ccctctccgg	5340
aactttcgac gattgttacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa	5400
agccttacc aggtatcaac tttagaggcta catgaagac agccaagacc ttgaaatcta	5460
ctcgatcagg tacaatgcca agcacgagac cgtgaatgt ccaggtagtg gticctctg	5520
gccactttct gcccaatctc ccatlgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgtccaca	5580
ccttgagtag aatcctgact tggactgtct ctgcagggat ggcgagaagt gtgccacca	5640
ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg	5700
agctgggtc atcttcaaga tcaagacca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga	5760
gtttctgaa gaaaaacat tggtcgttga agctctcgt cgtgtgaaga gagcagagaa	5820
gaagtggagg gacaaactg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc	5880

caaagagtcg	gtggatgcct	tgctcgtgaa	ctcccaatat	gatacagttgc	aagccgacac	5940
caacatcgcc	atgatccacg	ccgcagacaa	acgtgtgcac	agcattcgtg	aggcttactt	6000
gcctgagttg	tccgtgatcc	ctgggtgigaa	cgctgccatc	tlcgaggaac	ttgagggacg	6060
tatctttacc	gcattctcct	tgtaacgaic	cagaaacgtc	atcaagaacg	gtgacttcaa	6120
caatggccct	agctgtctga	atgtgaaagg	tcattgtggc	gtggaggaac	agaacaatca	6180
gcgttccgtc	ctgggtgtgc	ctgagtggga	agctgaagtg	tccaagagg	ttagagttct	6240
tccaggtaga	ggctacattc	tccgtgtgac	cgcttacaag	gagggatacg	gtgaggggtg	6300
cgtagccatc	cacgagatcg	agaacaacac	cgacgagctt	aagttctcca	actgcgtcga	6360
ggaagaaatc	tatcccaaca	acaccgttac	ttgcaacgac	tacactgtga	atcaggaaga	6420
gtacggaggt	gcctacacta	gccgtaacag	agggttacaac	gaagctccct	ccgttccctgc	6480
tgactatgcc	tccgtgtacg	aggagaaatc	ctacacagat	ggcagacgtg	agaacccttg	6540
cgagttcaac	agagggttaca	gggactacac	accacttcca	gttggctatg	ttaccaagga	6600
gcttgagttc	tttcttgaga	ccgacaaaat	gtggatcgag	atcgggtgaa	ccgagggaac	6660
cttcatcgtg	gacagcgtgg	agcttctctt	gatggaggaa	taatgagatc	tatcgattct	6720
agaaggccct	aattctgcat	gcgtttggac	gtatgcicac	tcagggttga	gccaattttg	6780
ttgatgtgtg	tgcgagttct	tgcgagttct	atgagacatc	tctgtattgt	gtttctttcc	6840
ccagtgtttt	ctgtactttg	gtaatcggct	aatcgccaac	agattcggcg	atgaataaat	6900
gagaaataaa	ttgttctgat	tttgagtgc	aaaaaaaaag	aattagatct	gtgtgtgttt	6960
tttggatccc	cggggcggcc	gcgttaacaa	gcttgagctc	aggatttagc	agcattccag	7020
attgggttca	atcaacaagg	tacgagccat	atcactttat	tcaaatttgt	atcgccaaaa	7080
ccaagaagga	actcccatcc	tcaaagggtt	gtaaggaaga	attctcagtc	caaagcctca	7140
acaaggtcag	ggtacagagt	ctccaaacca	ttagccaaaa	gctacaggag	atcaatgaag	7200
aattcttcaat	caaagttaac	tactgttcca	gcacatgcat	catggtcagt	aagtttcaga	7260
aaaagacatc	caccgaagac	ttaaagttag	tgggcattct	tgaagtaat	cttgtcaaca	7320
tgcagcagct	ggcttgtggg	gaccagacaa	aaaaggaatg	gtgcagaatt	gttaggcgca	7380
cctacccaaa	gcatctttgc	ctttatttga	aagataaagc	agattccctc	agtacaagtg	7440
gggaacaaaa	taacgttgaa	aagagctgtc	ctgacagccc	actactaat	gcgtatgacg	7500
aacgcagtga	cgaccacaaa	agaattccct	ctatataaga	aggcattcat	tcccatttga	7560
aggatcatca	gatactcaac	caatctttct	aggatctacc	gtcttcggta	cgcgctcact	7620
ccgccccttg	cctttgttac	tgccacgttt	ctcigaalgc	tctcttgtgt	ggtagattgt	7680
gagagtgggt	tagctggatc	tagaattaca	ctcigaaatc	gtgttctgcc	tgtgtgtatt	7740
acttgccgtc	cctttagtga	gcaaaatata	gggacatggg	aglacgaaac	gaagatagaa	7800
cctacacagc	aatacgagaa	atgtgttaatt	tgggtgcttag	cggtatttat	ttaaagcaca	7860
gttgggtgta	tagggcactt	ggattcagaa	gtttgctgtt	aatttaggca	caggcttcat	7920
actacatggg	tcaatagiat	agggattcat	attataggcg	atactataat	aattttgttcg	7980
tctgcagagc	ttattatttg	ccaaaattag	atacttctat	tctgtttttg	tttgtgtgct	8040
gttaaatgtt	taacgcctga	aggaataaat	ataaatgacg	aaattttgat	gtttatctct	8100

gctcccttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaaata ttgttgtctg 8160
 aagaaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt 8220
 taaaaataaaa gagtttccctt ttgttgtctc tccctacctc ctgatgggtat ctagtatcta 8280
 ccaactigaca ctatattgct tctctttaca tacgtatctt gctcgaatgcc ttctccctag 8340
 tgttgaccag tgttactcac atagtccttg ctcaatttcat tgaatgcag ataccaagcg 8400
 gcccttagag gatcagcatg gcgcccaccg tgaatgatggc ctctcgggc accgccgtcg 8460
 ctccgttcca ggggcctcaag tccaccgcca gccctcccgt cgcgcggcg tcctccagaa 8520
 gccctcgga cgtcagcaac ggcggaagga tccggtgcat gcaggtaaca aatgcatcct 8580
 agctagtagt tctttgcat ggcagcagct cagctagcga gttagtaata ggaagggaac 8640
 tgatgatcca tgcattgact gatgttgtt gcccatccca tccatttcc caaccccaaa 8700
 cgaacaaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccgggc tacggcaaca agaagtcca 8760
 gacgctgtcg tacctgccgc cgtgtctgac gcgcccggcg atccgctgca tgcaggccat 8820
 ggacaactcc gtcttgaact ctggtcgcac caccatctgc gacgcctaca acgtcgcggc 8880
 gcatgatcca ttacagcttc agcacaagag cctcgacact gtccagaagg agtggacgga 8940
 gtggaagaag aacaaccaca gcctgtacct ggaccccatc gtcggcacgg tggccagctt 9000
 ccttctcaag aaggctggct ctctcgtcgg gaagcgcac ctctcggaa tccgcaacct 9060
 gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctacaggaga ccgagaagtt 9120
 tctcaaccag gccttcaaca ctgataacct tgcctcgtc aacgctgagc tgacgggtct 9180
 gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttctcaacc ccaaccgcaa 9240
 tgcggtgctt ctgtccatca ctcttccgt gaacaccatg caacaactgt tctcaaccg 9300
 ctgtccctcag ttccagatgc aaggctacca gctgtcctc ctgccactct ttgctcaggc 9360
 tgccaacctg cacctctctt tcatctgta cgtgatctc aacgctgac agtggggcat 9420
 ctctgcagc acgctgagga cctaccgca ctaccgaag aactaccca gggactactc 9480
 caactattgc atcaaacctt accagtcggc ctccaagggc ctcaatacga ggcttcacga 9540
 catgtggag ttacaggacct acatgttctt gaacgtgtt gagtacgtca gcatctgtc 9600
 gctcttcaag taccagagcc tgcgtgtgtc cagcggcgcc aacctctac ccagcggctc 9660
 tggctcccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattctgtt attcgttgtt 9720
 ccaagtcaac tccaactacg tctcaaccg ctctcttgtt gctcgcctct ccaacacctt 9780
 cccaacatt gtggccctc ccggctccac cacaactcat gctctgtctg ctgccagagt 9840
 gaactactcc ggcggtatct ctagcggcga cattgtgtga tgcggttca accagaactt 9900
 caactgtcc accttctgc cgcgctgtct caccctgtc gtgaggctct ggctcgacag 9960
 cggctccgac cgcgaggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ccttcgagac 10020
 caccctggc ctccggagcg gcgccttcac ggcgctgga aattctaact acttccccga 10080
 ctacttact aggaacatct ctggtgttcc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140
 tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgcctctccg tccgggacgc ccggaggtgc 10200
 aaggcgctac atgggtgagc tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcattgaga 10260
 cggctccatg atccacctgg cgcctaatga ttacaccggc ttaccatct ctccaatcca 10320
 cgcacccaa gtgaacaacc agacacgcac cttaacttcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380

cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gcggcaacgg 10440
caacagctac aaccigtacc tgcgcgtcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500
catcaacggg agggigtaca cagccaccaa tlggaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
caacgacaac ggcgcccgtc tcagcgacat caacattggc aacgtggigg ccagcagcaa 10620
ctccgacgtc ccgttgga tcaacgtgac cctgaacctt ggacccaggt tgcacctcat 10680
gaacatcatg ctggtgccaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
atgggaattc ccgactgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 10800
gccggctctt cgaigattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgaataatt 10860
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 10980
gcggigtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgcgg ggaattcggg 11040
accaagcttt ggcgcgccaa atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 11100
tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgccta 11160
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcat ttataataacg 11220
ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt cttttctcc 11280
ataatgacca tcatactcat tgcattcccc gaaattatgt ttttttaaaa accacggtat 11340
tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400
tggcacatct agcttttggc taataccaatg tagggctaca tcttaaaaa ctatactact 11460
ataataaagc tgcaggggia gccgtgtctc accitgttct gccctcgagcc aatctaaacc 11520
gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggtccgtg cgcacctcct ctcccgtat 11580
tcagttgcat acttgcagca gggtctccct cctcaccatt tccctcgtct cctctctcgc 11640
tcactggtea gaticatcct gccctctccg catgcgtctc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
actatcgcca caccicaccg cggggagacg aagacggigg acgcatctc acctcctccg 11760
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggc gggtcggcgt 11820
cccagcgccg ccgtctctcc cctccccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
ggcgaatgct ccgtctgtca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
aggcggggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccc gtgttcagcg aggtggcggc 12000
atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctccg gcgttgaggt cggtaglta ctgcgccacc 12060
cggacgccc ctcaatgactg atacttacc ggcttccat gccgcccctc ctcccctccc 12120
tctcccgtg cctcccctc ttgcccctc ccttccaact gctcccggcc cagccctagc 12180
ccaaccacct cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列；對應於SEQ ID NO:5之2034-2055位

<400> 6

gccaataaaa ggaatggtaat ga 22

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列；對應於SEQ ID NO:5之11345-11367位

<400> 7

ctttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 8

ggatatccctc cagaccagca 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 9

gtggactccl tctggatggt gtaa 24

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 10

gtcagggigc tgcctgctgct a 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 11

ggttttaagaa ccatitttgct ccc 23

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列；對應於SEQ ID NO:5之2003-2026位

<400>	12	
tacgtcaggg	tgctgcigct	acta
		24
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成序列	
<400>	13	
atratttlycg	gggaigcaac	caac
		24
<210>	14	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成序列；對應於SEQ ID NO:5之2061-2076位	
<400>	14	
atggatcagc	aatgag	
		16
<210>	15	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成序列	
<400>	15	
ctgtcaagcc	aataaaaggg	ttgttt
		26
<210>	16	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成序列	
<400>	16	
ctgtcaagcc	aataaaaggg	ttgttt
		26
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成序列	
<400>	17	
caactcgtcc	gtgagcatca	
		20
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>			
<223>	合成序列；對應於SEQ ID NO:5之4605-4628位之序列的反向互補序列		
<400>	18		
aactcagcac	tacggtgtat	ccaa	24
<210>	19		
<211>	16		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列		
<400>	19		
gccctgccgca	gaccaa		16
<210>	20		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列		
<400>	20		
caatgcagag	ctcagcttca	tc	22
<210>	21		
<211>	17		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列；對應於SEQ ID NO:5之4587-4603位		
<400>	21		
cagagctcct	atgttct		17
<210>	22		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成序列		
<400>	22		
tccagttacgt	gcagtccttc	ctccct	26

十、申請專利範圍：

1. 一種基因轉殖玉米植物細胞，其包含SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2之核苷酸序列，並表現對鱗翅目昆蟲侵襲之抗性，其中編碼Cry2Ab及Cry1A.105之DNA插入物、具有SEQ ID NO:1之核苷酸序列之DNA、及具有SEQ ID NO:2之核苷酸序列之DNA(位於該DNA插入物之反側)係形成該細胞基因組之一部分。
2. 如請求項1之基因轉殖玉米植物細胞，其包含SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4之核苷酸序列。
3. 如請求項1之基因轉殖玉米植物細胞，其包含SEQ ID NO:5之核苷酸序列。
4. 一種組合物，其係衍生自如請求項1至3中任一項之基因轉殖玉米植物細胞，其中該組合物包含可偵測量之該核苷酸序列或DNA，且其中該組合物為選自由以下組成之群之商品：玉米粗粉、玉米油、玉米餅、玉米種子、玉米胚芽、玉米澱粉、玉米細粉、玉米花粉、玉米穗絲、玉米漿、玉米麥芽、玉米糖、玉米糖漿、自玉米油所生產之人造奶油、乾酒粕(DDGS)、化妝品及膨化劑。
5. 一種產生抗昆蟲玉米植物之方法，其包含：
 - (a) 使包含如請求項1至3中任一項之轉殖基因玉米植物細胞之轉殖基因玉米植物與另一玉米植物雜交；
 - (b) 產生至少一子代植物，其係衍生自(a)之雜交；以及
 - (c) 選擇包含SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2核苷酸序列之子代，其中該經選擇子代為抗昆蟲玉米植物。

6. 如請求項5之方法，其中該選擇步驟(c)包括使得自(b)之該至少一子代植物接受核酸擴增反應，其中選擇產生包含至少一SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2核苷酸序列之擴增子之子代，或使得自(b)之該至少一子代植物接受核酸雜交反應，其中選擇雜交至在嚴格條件下可與一或多個選自SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2之DNA序列雜交之探針的子代。
7. 一種產生抗昆蟲玉米植物之方法，其包含：
 - (a) 以包含SEQ ID NO:5之核苷酸序列轉化玉米植物細胞；及
 - (b) 自該經轉化細胞再生玉米植物，其中該玉米植物包含該DNA分子且可抗昆蟲。
8. 一種用於保護玉米植物免受昆蟲侵襲之方法，其包含在玉米鱗翅目害蟲之食物中提供殺蟲有效量之如請求項1至3中任一項之基因轉殖玉米植物細胞。
9. 如請求項8之方法，其中該鱗翅目害蟲係選自由以下組成之群：秋黏蟲(草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*))、歐洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)、玉米穗夜蛾(*Helicoverpa zea*)、西南玉米螟(巨座玉米螟(*Diatraea grandiosella*))及黑毛蟲(*Agrotis ipsilon*)。
10. 一種DNA分子對，其包含：第一DNA分子及第二DNA分子，其中該DNA分子具至少11個或更多之SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5之相連核苷酸或其互補股，其作為診斷提取自玉米植物或其子代之DNA之DNA引子，其中該玉

米植物或其子代包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之多核苷酸。

11. 如請求項10之DNA分子對，其中該第一DNA分子包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5之轉殖基因區域任何部分之至少20個相連核苷酸或其互補股，且該第二DNA分子包含相似長度之SEQ ID NO:3之5'側翼玉米基因組DNA區域或其互補股。
12. 如請求項11之DNA分子對，其中該第一DNA分子包含與SEQ ID NO:5之異源性插入DNA部分互補之至少20個相連核苷酸，且其中該第二DNA分子包含SEQ ID NO:3之玉米基因組部分之至少20個相連核苷酸。
13. 如請求項11之DNA分子對，其中該第一DNA分子於嚴格條件下可特異性地與SEQ ID NO:5中約2060位置之核苷酸至約12,208位置之核苷酸雜交，且其中該第二DNA分子於嚴格條件下可特異性地與對應於SEQ ID NO:3中約1位核苷酸至約2050位核苷酸的反向互補序列雜交。
14. 一種DNA分子對，其包含：第一DNA分子及第二DNA分子，其中該DNA分子具至少11個或更多之SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5之相連核苷酸或其互補股，其作為診斷提取自玉米植物或其子代之DNA之DNA引子，其中該玉米植物或其子代包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之多核苷酸。

15. 如請求項 14 之 DNA 分子對，其中該第一 DNA 分子包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 之轉殖基因區域任何部分之至少 20 個相連核苷酸或其互補股，且該第二 DNA 分子包含相似長度之 SEQ ID NO:4 之 3' 側翼玉米基因組 DNA 區域或其互補股。
16. 如請求項 15 之 DNA 分子對，其中該第一 DNA 分子包含 SEQ ID NO:5 之異源性插入 DNA 部分之至少 20 個相連核苷酸，且其中該第二 DNA 分子包含與 SEQ ID NO:4 之玉米基因組部分互補之至少 20 個相連核苷酸。
17. 如請求項 15 之 DNA 分子對，其中該第一 DNA 分子於嚴格條件下可特異性地與對應於 SEQ ID NO:5 中約 1 位核苷酸至約 11,305 位置之核苷酸的反向互補序列雜交，且其中該第二 DNA 分子於嚴格條件下可特異性地與 SEQ ID NO:4 中約 21 位置之核苷酸至約 914 位置之核苷酸雜交。
18. 如請求項 10 至 17 中任一項之 DNA 分子對，其中該第一 DNA 分子包含 SEQ ID NO:6 且該第二 DNA 分子包含 SEQ ID NO:7。
19. 一種偵測生物樣本中選自由 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所組成之群之 DNA 分子存在之方法，該方法包含：
 - (a) 使該生物樣本與 DNA 引子對接觸，該 DNA 引子對包含具至少 11 個或更多之 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 之相連核苷酸或其互補股，其係作為診斷提取自玉米植物或其子代之 DNA 之 DNA 引子，其

中該玉米植物或其子代包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之多核苷酸；

(b) 提供核酸擴增反應條件；

(c) 進行核酸擴增反應，進而產生DNA擴增子分子；及；

(d) 偵測該DNA擴增子分子，其中偵測出包含SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2之至少一者之擴增子代表該DNA分子存在於該生物樣本。

20. 如請求項19之方法，其中該生物樣本為提取自玉米植物之DNA樣本。

21. 一種偵測生物樣本中選自由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5所組成之群之DNA分子之存在之方法，該方法包含：

(a) 使該生物樣本與一DNA探針接觸，該探針在嚴格條件下可與該DNA分子雜交，且在該等嚴格條件下不會與不含有該DNA分子之生物樣本雜交；

(b) 使該生物樣本及DNA探針進行嚴格雜交條件；及

(c) 偵測該DNA探針與該生物樣本的雜交；其中偵測出雜交代表該DNA分子存在於該生物樣本。

22. 如請求項21之方法，其中該生物樣本為提取自玉米植物之DNA樣本。

23. 如請求項21或22之方法，其中該DNA探針包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

24. 如請求項21或22之方法，其中該DNA探針係經以至少一種螢光團標記。
25. 如請求項19或21之方法，其中該生物樣本係選自由以下組成之群：玉米粗粉、玉米油、玉米餅、玉米種子、玉米胚芽、玉米澱粉、玉米細粉、玉米花粉、玉米穗絲、玉米漿、玉米麥芽、玉米糖、玉米糖漿、自玉米油所生產之人造奶油、乾酒粕(DDGS)、化妝品及膨化劑。
26. 一種DNA偵測套組，其包含：至少一具至少11個或更多之與SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5同源或互補之相連核苷酸的DNA分子，其作為對玉米植物及/或其子代有特異性之DNA引子或探針，其中該玉米植物及/或其子代包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之多核苷酸。
27. 如請求項26之DNA偵測套組，其中該至少一DNA分子包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其互補股。
28. 如請求項27之DNA偵測套組，其中該至少一DNA分子係SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其互補股。
29. 如請求項26之DNA偵測套組，其中該套組包含如請求項10至18中任一項之DNA分子對。
30. 一種判斷生物樣本中包含選自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5之多核苷酸之玉米植物之DNA合子性的方法，該方法包含：
 - (a) 使該樣本與包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:10之引子組接觸，(1)當用於包含該玉米植

物之DNA之核酸擴增反應時，會製備為該玉米植物之診斷特徵的第一擴增子，及(2)當用於包含除該玉米植物之DNA以外之玉米基因組DNA之核酸擴增反應時，會製備為除該玉米植物DNA以外之玉米基因組DNA之診斷特徵的第二擴增子；

(b) 進行核酸擴增反應；及

(c) 偵測所產生之擴增子，其中偵測出兩個擴增子之存在表示該樣本針對該玉米植物之DNA為雜合性，其中只偵測出第一擴增子表示該樣本針對該玉米植物之DNA為純合性。

31. 如請求項30之方法，其中該引子組係進一步與SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:15一起使用。

32. 一種抗昆蟲玉米植物細胞，該植物細胞之基因組包含圖1所示轉殖基因遺傳元件及跨越含有SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4之插入點的接合序列。

33. 一種經分離DNA多核苷酸引子分子，其包含SEQ ID NO:3之至少30個相連核苷酸或其互補股，當其用於DNA擴增方法時，可製備包含SEQ ID NO:1之擴增子。

34. 一種經分離DNA多核苷酸引子分子，其包含SEQ ID NO:4之至少30個相連核苷酸或其互補股，當其用於DNA擴增方法時，可製備包含SEQ ID NO:2之擴增子。

35. 一種DNA偵測套組，其包含至少一具有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4之30個或更多相連核苷酸或其互補序列之分子，當其用於DNA擴增方法時，可製備包含SEQ ID

NO:1 或 SEQ ID NO:2 之擴增子。

36. 一種偵測樣本中選自由 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所組成之群之 DNA 分子存在之方法，該方法包含：

(a) 使該包含 DNA 之樣本與引子對接觸，當其與包含選自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 之多核苷酸之玉米植物之 DNA 使用於核酸擴增反應時，可製備包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 之擴增子；

(b) 進行核酸擴增反應，進而產生該擴增子；及

(c) 偵測該擴增子。

37. 一種偵測樣本中選自由 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所組成之群之 DNA 分子之存在之方法，該方法包含：

(a) 使該包含 DNA 之樣本與探針接觸，該探針在嚴格雜交條件下可與包含選自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 之多核苷酸之玉米植物之 DNA 雜交，且在該等嚴格雜交條件下不會與對照玉米植物雜交，其中該探針與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 同源或互補；

(b) 使該樣本及探針進行嚴格雜交條件；及

(c) 偵測該探針與該 DNA 的雜交。

十一、圖式：

公告本

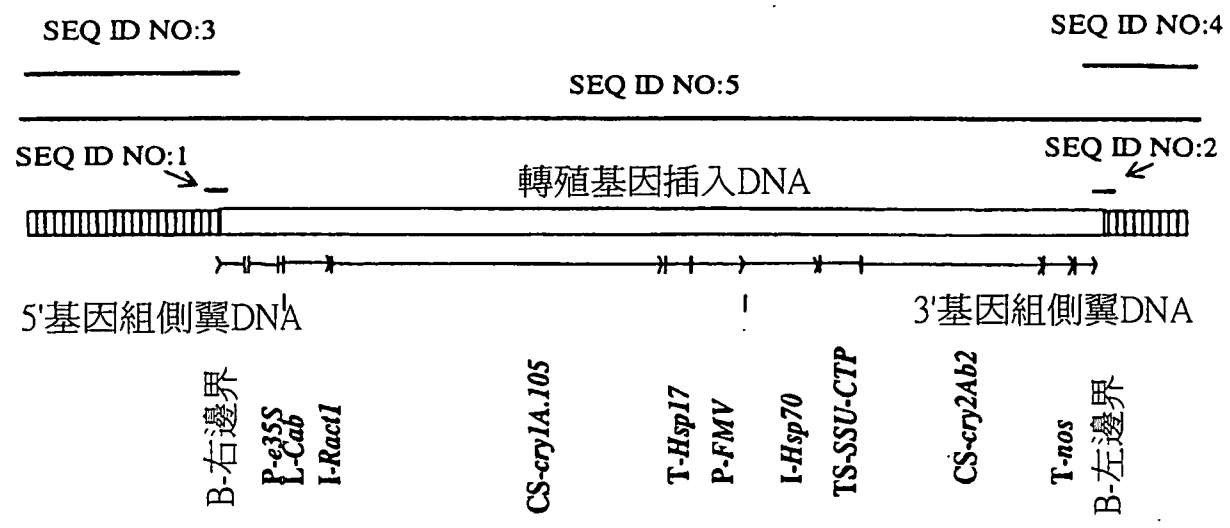


圖1