



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112273114 B

(45) 授权公告日 2023.02.28

(21) 申请号 202010365523.1

B · 威金斯 N · 周 A · T · 伍斯利

(22) 申请日 2013.06.25

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 罗天乐

申请公布号 CN 112273114 A

(51) Int.CI.

C12N 15/11 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.01.29

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 2012075426 A1, 2012.06.07

61/663,700 2012.06.25 US

CN 102066566 A, 2011.05.18

(62) 分案原申请数据

WO 2011066384 A1, 2011.06.03

201380044436.4 2013.06.25

CN 101861392 A, 2010.10.13

(83) 生物保藏信息

CN 101297040 A, 2008.10.29

PTA-12588 2012.02.23

CN 101370940 A, 2009.02.18

(73) 专利权人 美国陶氏益农公司

CN 1643147 A, 2005.07.20

地址 美国印第安纳州

CN 1390259 A, 2003.01.08

(72) 发明人 N · 巴德 G · A · 布拉德菲希

AR 044244 A1, 2005.09.07

Y · C · 崔 J · E · 德里普斯

审查员 熊健

T · 霍夫曼 D · 帕雷迪

权利要求书1页 说明书36页

D · M · 帕克赫斯特 S · G · 托莱多

序列表15页 附图2页

(54) 发明名称

昆虫抗性和除草剂耐受性大豆事件

pDAB9582.816.15.1

(57) 摘要

大豆事件9582.816.15.1包含编码Cry1F、Cry1Ac (synpro) 和PAT的基因，其对含有该事件的大豆作物提供昆虫抗性和除草剂耐受性，并使得作物保护和贮存产品保护的方法能够实现。本公开的实施方案涉及一种新的昆虫抗性和除草剂耐受性转基因大豆转化事件，称为大豆事件 pDAB9582.816.15.1，包含cry1F v3 (cry1F)、cry1Ac synpro (cry1Ac) 和pat v6 (pat)，如本申请中公开的，插入大豆细胞基因组内的特定位点 B 中。代表性的大豆种子已经保存于美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，登录号为ATCC保藏号PTA-12588。含有此事件的大豆植物的DNA包含如本文所述的接点/侧翼序列，它们可表征大豆基因组内插入的DNA的位置。

1. 一种控制鳞翅目昆虫的方法,所述方法包括使所述昆虫暴露于转基因大豆植物,所述大豆植物包含具有SEQ ID NO:14的序列的DNA。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述转基因大豆植物包含事件pDAB9582.816.15.1,所述事件包括编码cry1 F,cry1 Ac和PAT的基因,如以保藏号PTA-12588保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的代表性大豆种子中存在的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述昆虫为大豆尺蠖(*Pseudoplusia includens*)。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述昆虫为黎豆毛虫(*Anticarsia gemmatalis*)。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述昆虫为秋粘虫(*Spodoptera frugiperda*)。

6. 权利要求1或2的方法,其中所述昆虫为烟青虫(*Heliothis virescens*)。

7. 一种控制大豆作物中杂草的方法,所述方法包括向所述大豆作物施用草胺膦除草剂,所述大豆作物包括转基因大豆植物,该大豆植物包含具有SEQ ID NO:14的序列的DNA。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述转基因大豆植物包含事件pDAB9582.816.15.1,所述事件包括编码cry1 F,cry1 Ac和PAT的基因,如以保藏号PTA-12588保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的代表性大豆种子中存在的。

9. 一种分离的DNA,其包含选自下组的核酸序列:SEQ ID NO:1的bp1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275。

10. 一种分离的DNA分子,其包括SEQ ID NO:14的DNA序列,或其完全互补物。

11. 一种控制大豆颗粒、种子、粕或粉中害虫的方法,其包括:在所述颗粒、种子、粕或粉中包含大豆事件9582.816.15.1,其表现为该颗粒、种子、粕或粉包含具有SEQ ID NO:14的序列的DNA。

## 昆虫抗性和除草剂耐受性大豆事件pDAB9582.816.15.1

[0001] 本申请是2013年6月25日提交的申请号为201380044436.4 (PCT申请号为PCT/US2013/047539)、发明名称为“昆虫抗性和除草剂耐受性大豆事件pDAB9582.816.15.1”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 优先权声明:本公开文本要求于2012年6月25日提交的美国临时申请61/663,700的优先权。将其信息整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 编码Cry1F和Cry1Ac synpro (Cry1Ac) 的基因能够对转基因植物赋予昆虫抗性,例如对鳞翅目 (lepidopteran) 昆虫的抗性;而编码PAT (膦丝菌素乙酰转移酶) 的基因能够对转基因植物赋予对除草剂膦丝菌素 (草胺膦) 的耐受性。PAT已经在大豆中成功表达,既在生成昆虫抗性转基因作物中用作选择标志物,又在转基因植物中赋予对除草剂草胺膦的产业水平的耐受性。

[0005] 已知转基因在植物中的表达受到其在植物基因组中位置的影响,这可能是由于染色质结构(例如异染色质)或整合位点附近的转录调节元件(例如增强子)的接近性所致(Weising等, Ann. Rev. Genet. 22:421-477, 1988)。同时,转基因在基因组中不同位置处的存在会以不同方式影响植物的总体表型。由于此原因,常常有必要筛选大量转基因事件以鉴定以引入的兴趣基因的最佳表达为特征的具体转基因事件。例如,在植物中及在其它生物体中已经观察到引入基因的表达水平在事件与事件之间可以有较大的变化。还可能有空间或时间上的表达差异,例如转基因在各种植物组织中的相对表达差异,这样的差异可能与从导入的基因构建体中存在的转录调节元件预期的方式不对称。出于此原因,常见的做法是生成数百至数千个不同事件,并且从这些事件中筛选具有对于产业目的有利的转基因表达水平和方式的单一事件。具有期望的转基因表达水平或方式的事件可用来将转基因渗入 (introgress) 其它遗传背景中,方法是使用常规育种方法进行有性异性杂交 (outcrossing)。此类杂交的后代维持初始转化体的转基因表达特征。该策略被用于确保完全适合于局地生长条件的多种品种的可靠的基因表达。

[0006] 人们期望能够检测特定事件的存在以确定有性杂交的后代是否含有感兴趣的转基因或转基因群组。另外,用于检测特定事件的方法会有助于例如遵守要求自重组作物植物衍生的食物的销售前批准和标签的监管,或者有助于用于环境监测,监测田间作物的性状,或者监测自作物收获物衍生的产品,以及用于确保服从管理或合同条款的各方的顺应性。

[0007] 有可能通过本领域中已知的任何核酸检测方法,包括但不限于聚合酶链式反应 (PCR) 或使用核酸探针的DNA杂交,来检测转基因事件的存在。这些检测方法一般聚焦于常用的遗传元件,诸如启动子、终止子、标志物基因,等等,因为对于许多DNA构建体,编码区是可互换的。这导致此类方法可能无法用于区别不同的事件,特别是使用相同DNA构建体或非常相似的构建体生成的那些事件,除非与插入的异源DNA相邻的侧翼DNA的DNA序列是已知的。例如,对于玉米事件DAS-59122-7,事件特异性PCR测定法记载于美国专利申请2006/0070139。希望有一种简单而有区分力的方法来鉴定大豆事件pDAB9582.816.15.1。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开的实施方式涉及新的昆虫抗性和除草剂耐受性转基因大豆转化事件,称作大豆事件pDAB9582.816.15.1,包括插入大豆细胞基因组内的特定位点中的如本文中所述的cry1F v3(cry1F), cry1Ac synpro(cry1 Ac)和pat v6(pat)。代表性大豆种子已经以段落[0033]中标识的登录号保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。含有此事件的大豆植物的DNA包括本文中描述的接点序列/侧翼序列,这些序列表征大豆基因组内插入DNA的位置。SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1。更具体而言,SEQ ID NO:1的bp 1273/1274、以及SEQ ID NO:2的bp 175/176和316/317处的接点周围的序列能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1。下文段落[0012]描述了包含含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆DNA的特征的这些接点的序列的例子。

[0010] 在一个实施方式中,本公开提供了大豆植物或其部分,其对大豆夜蛾(*Pseudoplusia includens*) (大豆尺蠖(大豆尺蠖))有抗性,并且具有包含选自下组的一个或多个序列的基因组:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。在另外的实施方式中,本公开本文提供此类植物的种子。

[0011] 在另一个实施方式中,本公开提供一种控制昆虫的方法,其包括将昆虫暴露于抗昆虫大豆植物,由此以控制所述昆虫,其中所述大豆植物具有包含一种或多种选自下组的序列的基因组:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列;这些序列是对于大豆事件pDAB9582.816.15.1的存在而言是特征性的。大豆事件pDAB9582.816.15.1中cry1F v3(cry1F)和cry1Ac synpro(cry1Ac)基因的存在赋予对例如大豆夜蛾(大豆尺蠖)、黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis*) (黎豆毛虫(velvetbean caterpillar))、夜小卷蛾(*Epinotia aporema*)、*Omoiodes indicatus*、薄荷灰夜蛾(*Rachiplusia nu*)、草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)、*Spodoptera cosmoides*、南方灰翅夜蛾(*Spodoptera eridania*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、美洲棉铃虫(*Heliooverpa zea*)、*Spilosoma virginica*和南美玉米苗斑螟(*Elasmopalpus lignosellus*)的抗性。

[0012] 在另一个实施方式中,本公开提供一种控制大豆作物中杂草的方法,其包括对大豆作物施用草胺膦除草剂,所述大豆作物包含具有基因组的大豆植物,所述基因组含有一种或多种选自下组的序列:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列;其能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1的存在。在大豆事件pDAB9582.816.15.1中pat基因的存在赋予对草胺膦除草剂的抗性。

[0013] 在另一个实施方式中,本公开提供一种检测包含大豆DNA的样品中大豆事件pDAB9582.816.15.1的方法,所述方法包括:

[0014] (a)使所述样品与长度至少10bp的第一引物和长度至少10bp的第二引物接触,所述第一引物选择性结合SEQ ID NO:1的bp 1-1273或其互补序列内的侧翼序列,所述第二引

物选择性地结合SEQ ID NO:1的bp 1274-1577或其互补序列内的插入物序列;并

[0015] 测定所述引物间生成的扩增子;或

[0016] (b)使所述样品与长度至少10bp的第一引物和长度至少10bp的第二引物接触,所述第一引物选择性地结合SEQ ID NO:2的bp 1-175或其互补序列内的插入物序列,所述第二引物选择性地结合SEQ ID NO:2的bp 176-1687或其互补序列内的侧翼序列;以及

[0017] (c)测定所述引物间生成的扩增子。

[0018] 在另一个实施方式中,本公开提供一种检测大豆事件pDAB9582.816.15.1的方法,其包括:

[0019] a)使所述样品与第一引物和第二引物接触,所述第一引物选择性结合选自下组的侧翼序列:SEQ ID NO:1的bp 1-1273和SEQ ID NO:2的bp 176-1687,以及其互补序列;所述第二引物选择性结合SEQ ID NO:3或其互补序列;

[0020] b)对所述样品实施聚合酶链式反应;以及

[0021] c)测定所述引物间生成的扩增子。

[0022] 在另一个实施方式中,本公开提供一种大豆植物育种方法,其包括:将第一植物与第二大豆植物杂交以生成第三大豆植物,所述第一植物包含含有一种或多种选自下组的序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列;并对所述第三大豆植物测定包含一种或多种选自下组的序列的DNA的存在:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0023] 在另一个实施方式中,本公开提供一种分离的DNA分子,其能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1。除SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2外,此类分子还包括:长度至少25bp的分子,其包含SEQ ID NO:1的bp 1273-1274、以及SEQ ID NO:1中自bp 1273/1274接点起沿每个方向的至少10bp;长度至少25bp的扩增子,其包含SEQ ID NO:2的175-176、以及SEQ ID NO:2中从bp 175/176接点起沿每个方向的至少10bp。实例有:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225和SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0024] 在另一个实施方式中,本公开提供一种控制大豆颗粒、种子或种子粕中害虫的方法,其包括使所述颗粒、种子或种子粕包括大豆事件pDAB9582.816.15.1,其表现为该颗粒、种子或种子粕包含含有一种或多种选自下组的DNA:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225和SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0025] 本公开的实施方式还包括含有大豆事件pDAB 9582.816.15.1的大豆植物细胞和植物部分,包括但不限于花粉、胚珠、花、枝、根和叶,以及营养细胞的核、花粉细胞、种子和种子粕、以及卵细胞。

[0026] 在一些实施方式中,可以将大豆事件pDAB 9582.816.15.1与其他性状组合,其他

性状包括,例如,其他除草剂耐受性基因和/或昆虫抑制性蛋白质和转录调节序列(即RNA干扰、dsRNA、转录因子等等)。新的性状可以通过植物育种、对含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的转基因植物的再转化、或通过经由同源重组的靶向整合的新性状添加,而叠加到植物基因组中。

[0027] 其他实施方式包括切出包含大豆事件pDAB9582.816.15.1的多核苷酸序列,包括例如pat基因表达盒。在切出多核苷酸序列后,可以将经修饰的事件再靶定到特定的染色体位置,其中将大豆事件pDAB9582.816.15.1与别的多核苷酸序列叠加。

[0028] 在一个实施方式中,本公开涵盖位于染色体03上如SEQ ID N0:1和2所示的侧翼序列之间的大豆染色体靶位点。

[0029] 在一个实施方式中,本公开涵盖制备转基因大豆植物的方法,其包括在染色体03上如SEQ ID N0:1和2所示的基因组序列之间、即SEQ ID N0:1的bp 1-1273和SEQ ID N0:2的bp 176-1687之间的位置插入异源核酸。

[0030] 另外,本公开的实施方式还提供了用于检测样品(例如大豆样品)中的主题事件的存在的测定法。测定法可以基于插入大豆基因组中的重组构建体的DNA序列,以及基于位于插入位点侧翼的基因组序列。还提供了可用于实施测定法的试剂盒和条件。

[0031] 本公开的实施方式还部分涉及转基因大豆品系中由于来自pDAB9582的T-DNA的插入所致的边界区的DNA序列的克隆和分析。这些序列是唯一的。基于插入序列和接点序列,可以生成事件特异性引物。PCR分析证明了这些事件可以通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子来鉴定。因此,这些规程和其它相关的规程可以用于唯一地鉴定包含本公开事件的大豆品系。

[0032] 一个实施方式提供一种控制昆虫的方法,其包括使昆虫暴露于抗昆虫大豆植物,从而控制昆虫,所述大豆植物包含含有选自下组的序列的DNA:SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225、以及SEQ ID N0:2的bp 75-275,所述序列能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1的存在。

[0033] 一个实施方式提供一种控制大豆夜蛾、黎豆夜蛾或草地夜蛾的方法,其包括使大豆夜蛾、黎豆夜蛾、烟芽夜蛾或草地夜蛾暴露于抗昆虫大豆植物,从而控制昆虫,所述大豆植物包含含有选自下组的序列的DNA:SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225、以及SEQ ID N0:2的bp 75-275,所述序列能够检测大豆事件pDAB9582.816.15.1的存在。

[0034] 一个实施方式提供一种控制大豆作物中杂草的方法,其包括向大豆作物施用草胺膦除草剂,所述大豆作物包含含有选自下组的序列的DNA:SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225、以及SEQ ID N0:2的bp 75-275,所述序列能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1的存在。

[0035] 一个实施方式提供一种分离的DNA序列,其包含选自下组的一个或多个序列:SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225、以及SEQ

ID NO:2的bp 75-275。

[0036] 一个实施方式提供一种育种大豆植物的方法,其包括:使第一植物与第二大豆植物杂交以制备第三大豆植物,所述第一植物包含含有选自下组的一种或多种序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225、以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列;以及针对所述第三大豆植物测定包含一种或多种选自下组序列的DNA的存在:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225、以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0037] 一个实施方式提供一种分离的DNA分子,其包括接点序列,该接点序列包括至少一个选自下组的序列:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225、以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。一个实施方式提供一种大豆植物或其部分,其对于大豆夜蛾(大豆尺蠖)有抗性,并且包括具有至少一种选自下组的核苷酸序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225和SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0038] 一个实施方式提供一种来源于所述大豆植物或其部分的组合物,其中,所述组合物是选自下组的商业产品:大豆粕、大豆粉、大豆蛋白质浓缩物以及大豆油。

[0039] 一个实施方式提供一种控制大豆颗粒、种子、粕或粉中害虫的方法,其包括:使所述颗粒、种子、粕或粉包含大豆事件pDAB9582.816.15.1,表现为该颗粒、种子、粕或粉包含含有选自下组的一种或多种序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225和SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0040] 一个实施方式提供一种大豆种子,其在该种子的基因组中包括选自下组的DNA序列:SEQ ID NO:1的bp1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225和SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。另一个实施方式提供一种大豆种子,该种子的基因组中包括大豆事件pDAB9582.816.15.1的cry1F、cry1Ac和pat,且其代表性的大豆种子以保藏号PTA-12588保藏在美国典型培养物保藏中心。另一个实施方式提供一种通过种植这两种实施方式中任意一种的大豆种子而得到的大豆植物。另一个实施方式提供一种通过该大豆植物获得的大豆种子,其中所述种子在其基因组中包括大豆事件pDAB9582.816.15.1的cry1F、cry 1Ac和pat基因,大豆事件pDAB9582.816.15.1存在于以保藏号PTA-12588保藏在美国典型培养物保藏中心的大豆种子中。又一个实施方式提供该大豆植物的部分,其中所述部分选自下组:花粉、胚珠、花、枝、根和叶,所述部分包括所述事件。另一实施方式提供一种来源于该大豆植物或其部分的组合物,其中所述组合物是选自下组的商业产品:大豆粕、大豆粉和大豆油。

[0041] 在另一实施方式中,大豆植物包括与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的DNA序列。一个实施方式提供上述实施方式的植物的后代大豆植物,其中所述植物显示对草

胺膦除草剂的抗性,所述抗性是缘于所述事件或所述基因组中编码的蛋白质的表达。

[0042] 还一个实施方式提供大豆种子,其包含含有与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的DNA序列的基因组。还一个实施方式提供通过种植该大豆种子得到的植物。

[0043] 一个实施方式提供转基因大豆植物或其部分,其包括大豆事件pDAB9582.816.15.1,其中包括大豆事件pDAB9582.816.15.1的代表性大豆种子已经以保藏号PTA-12588保藏在美国典型培养物保藏中心。

[0044] 种子保藏

[0045] 作为本公开内容的一部分,已将包含大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆品系的至少2500粒种子保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110,并且可公众不受限制地得到(但是受专利权保护)。保藏物,称为ATCC保藏No.PTA-12588,于2012年2月23日以Dow AgroSciences LLC的名义建立。这些保藏物系依照且基于布达佩斯条约关于用于专利程序目的的种子保藏的条款而建立,并将依照且基于布达佩斯条约关于用于专利程序目的的种子保藏的条款而维持。

[0046] 序列简述

[0047] SEQ ID NO:1是大豆事件pDAB9582.816.15.1的5' DNA侧翼边界序列。核苷酸1-1273是基因组序列。核苷酸1274-1577是插入物序列。

[0048] SEQ ID NO:2是大豆事件pDAB9582.816.15.1的3' DNA侧翼边界序列。核苷酸1-175是插入物序列。核苷酸176-316是来自pDAB9582的重排序列。核苷酸317-1687是基因组序列。

[0049] SEQ ID NO:3是pDAB9582的T链序列,其在下文表1中注释。

[0050] SEQ ID NO:4是用于确认5'边界基因组DNA的寡核苷酸引物81615\_FW2。

[0051] SEQ ID NO:5是用于确认3'边界基因组DNA的寡核苷酸引物81516\_RV1。

[0052] SEQ ID NO:6是用于确认3'边界基因组DNA的寡核苷酸引物81516\_RV2。

[0053] SEQ ID NO:7是用于确认3'边界基因组DNA的寡核苷酸引物81516\_RV3。

[0054] SEQ ID NO:8是用于确认5'边界基因组DNA的寡核苷酸引物5' IREnd-01。

[0055] SEQ ID NO:9是用于确认5'边界基因组DNA的寡核苷酸引物5' IREnd-02。

[0056] SEQ ID NO:10是用于确认5'边界基因组DNA的寡核苷酸引物AtUbi10RV1。

[0057] SEQ ID NO:11是用于确认5'边界基因组DNA的寡核苷酸引物AtUbi10RV2。

[0058] SEQ ID NO:12是用于确认3'边界基因组DNA的寡核苷酸引物3TATEnd05。

[0059] SEQ ID NO:13是用于确认3'边界基因组DNA的寡核苷酸引物3' PATEnd06。

[0060] SEQ ID NO:14是大豆事件pDAB9582.816.15.1.的预期序列。包括5'基因组侧翼序列,pDAB9582 T-链插入物,以及3'基因组侧翼序列。

[0061] 附图简述

[0062] 图1是含有cry1F v3、cry1Ac synpro和pat v6基因表达盒的pDAB9582的质粒图。

[0063] 图2描绘了用于确认大豆事件pDAB9582.816.15.1的5' 和3' 边界序列的引物位置。

[0064] 图3描绘了大豆事件pDAB9582.816.15.1中的基因组序列重排。

[0065] 发明详述

[0066] 事件大豆事件pDAB9582.816.15.1插入物的两端已经得以测序并表征。开发了事件特异性测定法。还已经将该事件定位至大豆基因组(大豆染色体03)。可以将事件渐渗入

别的良种系中。

[0067] 如上文在发明背景部分中提到的,转基因向植物基因组中的导入和整合牵涉一些随机事件(因此被表达的给定插入物名为“事件”)。也就是说,由于转化技术有多种,诸如土壤杆菌(*Agrobacterium*)转化,生物射弹转化(即基因枪),和碳化硅介导的转化(即WHISKERS<sup>TM</sup>),转基因会插入基因组中的何处是不可预测的。如此,鉴定插入物两侧的侧翼植物基因组DNA对于鉴定具有给定插入事件的植物可能有重要意义。例如,可以设计这样的PCR引物,它们生成跨越插入物和宿主基因组的接合区的PCR扩增子。可以使用此PCR扩增子来鉴定唯一的或与众不同的插入事件。

[0068] 本文中提供的定义和实例是为了帮助描述本公开的实施方式,并指导本领域一般技术人员实施这些实施方式。除非另有指明,术语应根据相关领域的一般技术人员的常规习惯来理解。使用如列于37CFR§1.822的DNA碱基命名法。

[0069] 如用于本文,术语“后代”指包含大豆事件pDAB9582.816.15.1的亲本植物的任何世代的后代。

[0070] 转基因“事件”通过如下产生:用异源DNA,即包含感兴趣的转基因的核酸构建体转化植物细胞,再生所述转基因插入植物基因组而得的植物的群体,并选择以特定基因组位置中的插入为特征的特定植物。术语“事件”指含有异源DNA的原始转化体和转化体后代。术语“事件”还指通过转化体与另一品种(其后代含有基因组DNA/转基因DNA)之间的有性杂交(outcross)产生的后代。即使在与轮回亲本反复回交之后,插入的转基因DNA和来自转化的亲本的侧翼基因组DNA(基因组DNA/转基因DNA)仍存在于杂交后代的相同染色体位置处。术语“事件”还指来自原始转化体及其后代的、包含插入DNA和直接邻接于该插入DNA的侧翼基因组序列的DNA,可以预期其被转移给后代,后代作为有性杂交(一个包含插入DNA的亲本系(例如原始转化体和从自交产生的后代)与不含所述插入DNA的亲本系的有性杂交)的结果而接受插入DNA,包括感兴趣的转基因。

[0071] “接点序列”或“边界序列”跨越了插入基因组的DNA与来自插入点侧翼的大豆天然基因组的DNA连接的点,其中植物基因物质中一种或其他接合序列的鉴定或检测足以诊断所述事件。包括了跨越本文中所述的大豆事件中的插入和类似长度的侧翼DNA的DNA序列。本文中提供了此类诊断性序列的具体实例;然而,其他与插入的接合或插入和基因组序列的接合重叠的序列也具诊断性,并可根据本公开实施方式使用。

[0072] 本公开的实施方式部分涉及使用此类侧翼、接点和插入物序列的事件鉴定。本公开的实施方式包括相关的PCR引物和扩增子。根据本公开的实施方式,可以利用跨越插入DNA及其边界的扩增子进行PCR分析方法,来检测或鉴定商业化的转基因大豆品种或来源于本主题专利的转基因玉米品系的品系。

[0073] 侧翼/接点序列能够诊断大豆事件pDAB9582.816.15.1。基于这些序列,生成事件特异性引物。PCR分析证明,通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子,可以在不同的玉米基因型中鉴定这些大豆品系。因此,这些规程和其他相关规程可用于唯一地鉴定这些玉米品系。本文中鉴定的序列是唯一的。

[0074] 本主题公开的实施方式的检测技术特别有用的是与植物育种结合,用来确定在为了将一种或多种其他感兴趣的性状赋予后代而将包含感兴趣的事件的亲本植物与另一种植物品系杂交之后,哪些后代植物包含给定事件。这些PCR分析方法有利于大豆育种项目以

及质量控制,特别是对于商品化转基因大豆种子而言。现在亦可制备并使用用于这些转基因大豆品系的PCR检测试剂盒。这亦可帮助产品登记和产品管理。

[0075] 此外,可使用侧翼大豆/基因组序列以特异性鉴定每个插入物的基因组位置。该信息可用于制作特异于每一个事件的分子标志物系统。它们可用于加速育种策略和构建连锁数据。

[0076] 此外,侧翼序列信息可用于研究和表征转基因整合过程,基因组整合位点特征,事件分选,转基因及其侧翼序列的稳定性,和基因表达(特别涉及基因沉默,转基因甲基化样式,位置效应,和潜在的表达相关元件,如MARS(基质连接区)等)。

[0077] 考虑本主题的全部公开,容易想到本主题公开的实施方式包括可根据段落[0033]中标识的ATCC保藏号获得的种子。本公开的实施方式还包括从以段落[0033]中标识的ATCC保藏号保藏的种子种植的除草剂耐受性大豆植物。本公开的实施方式进一步包括所述植物的部分,如叶、组织样品、由所述植物产生的种子、花粉等(其中这些植物的部分包含cry1F, cry1Ac, pat, 和SEQ ID N0:1和2)。

[0078] 此外,本公开的实施方式还包括从保藏的种子培育的植物的后裔和/或后代植物,优选为除草剂抗性大豆植物,其中所述植物具有包含如本文所述的可检测的野生型接点/侧翼序列的基因组。如用于本文,术语“大豆”意指大豆(*Glycine max*),并包括其所有可与大豆植物育种得到的品种。

[0079] 本公开进一步包括使用本主题公开的植物作为至少一个亲本来进行杂交的过程。举例而言,本主题公开包括具有本文中例示的任何植物作为一个或两个亲本的 $F_1$ 杂交植物。本主题公开还包括由此类本主题公开的 $F_1$ 杂合体产生的种子。本公开包括用于产生 $F_1$ 杂合体的方法,即将例示的植物与不同(例如,近交的亲本)植物杂交并收获所得的杂交种子。本主题公开包括作为母本或父本的示例性植物。所得的植物的特征可通过仔细选择亲本植物来改善。

[0080] 本主题公开的昆虫抗性/草胺磷耐受性大豆植物可通过下述方式育种,首先将第一亲本大豆植物,其由本文中提及的任何一种品系种子种植出的大豆植物组成,与第二亲本植物有性杂交,由此产生多个第一后代植物,然后选择对草胺磷有抗性的第一后代植物;使第一后代植物自交,由此产生多个第二后代植物,然后从第二后代植物选择对草胺磷有抗性的植物。这些步骤可进一步包括将第一后代植物或第二后代植物与第二亲本大豆植物或第三亲本大豆植物回交。然后可种植包含本主题公开或其后代的大豆种子的大豆作物。

[0081] 亦可理解的是,亦可使两种不同转基因植物交配以产生含有两种独立分离的、附加的外源基因的后代。合适后代的自交可产生对于两种附加的外源基因而言为纯合的植物。亦考虑了对亲本植物的回交和与非转基因植物的异交,以及营养繁殖。其他常用于不同性状和作物的育种方法在本领域是已知的。回交育种已被用于以将简单遗传的高度可遗传性状的基因转移至期望的纯合栽培种或近交系,其为回归亲本。待转移的性状的来源称为供体亲本。期待所得的植物具有回归亲本(例如栽培种)的特征和从供体亲本转移的期望的性状。在起始杂交之后,选择了拥有供体亲本的表型的个体,并将其反复与回归亲本杂交(回交)。预期所得的植物具有回归亲本(例如栽培种)的特征,和从供体亲本转移的期望的性状。

[0082] 同样地,可以使用本领域中已知的方法,用别的转基因来转化本公开实施方式的

昆虫抗性/草胺磷耐受性大豆植物。转化技术诸如土壤杆菌转化、生物射弹转化(即基因枪),和碳化硅介导的转化(即WHISKERS<sup>TM</sup>)可以用于将一种或多种别的转基因导入大豆事件pDAB9582.816.15.1的基因组中。可以对含有新插入的转基因的转基因植物完成选择和表征,以鉴定除本公开实施方式的cry1F,cry1Ac,pat基因之外还含有新转基因的稳定整合子(integrand)的植物。

[0083] 本公开的实施方式的DNA分子可作为分子标志物用于标志物辅助育种(MAB)方法。本公开的实施方式的DNA分子可以,如本领域已知地,用于鉴定遗传连锁的农艺学上可用的性状的方法(如AFLP标志物,RFLP标志物,RAPD标志物,SNP和SSR)。可使用MAB方法在与本主题公开的实施方式的大豆植物的杂交(或其后代和任何其他大豆栽培种或品种)的后代中追踪昆虫抗性和除草剂耐受性性状。所述DNA分子是针对该性状的标志物,且MAB方法是本领域中公知的,在至少一种本主题公开实施方式的大豆品系或其后代为亲本或祖先的场合,MAB方法用于追踪大豆植物中的除草剂抗性性状。本公开实施方式的方法可用于鉴定具有本主题事件的任何大豆品种。

[0084] 本主题公开实施方式的方法包括产生昆虫抗性/除草剂耐受大豆植物的方法,其中所述方法包括用本主题公开中实施的植物育种。更具体而言,所述方法可包括将两个本主题公开中实施的植物杂交,或一个本主题公开中实施的植物与任何其他植物杂交。优选的方法进一步包括通过分析所述后代的可根据本主题公开的实施方式检测的事件和有利的品种性能(例如产量),来选择所述杂交的后代。举例而言,本主题公开的实施方式可用于通过与包含其他所需的性状,如农艺学性状、疾病耐受性或抗性,线虫耐受性或抗性和成熟日期的植物的育种循环来追踪本主题事件。可检测、鉴定、选择包含本主题事件和所需的性状的植物,并例如在进一步的育种轮次中快速使用。本主题事件/性状亦可通过育种来与其它昆虫抗性性状和/或其他的除草剂耐受性状组合,并根据本主题公开的实施方式进行追踪。后者的实施方式为包含与cry1F和cry1Ac基因结合的主题事件的植物,cry1F和cry1Ac基因赋予对鳞翅类(Lepidopteran species)的抗性,鳞翅类包括大豆夜蛾(大豆尺蠖)、黎豆夜蛾(黎豆毛虫)、Epinotia aporema、三纹螟蛾(Omiodes indicata)、薄荷灰夜蛾、草地夜蛾、Spodoptera cosmoides、南方灰翅夜蛾(Spodoptera eridania)、烟芽夜蛾、谷实夜蛾(Heliocoverpa zea)、Spilosoma virginica和Elasmopalpus lignosellus。

[0085] 因此,本主题公开的实施方式可与,例如编码草甘膦抗性(例如抗性植物或细菌EPSPS,GOX,GAT),草铵膦抗性(例如dsm-2,bar),乙酰乳酸合酶(ALS)抑制性除草剂抗性(例如咪唑啉酮[如咪草烟(imazethapyr)]、磺酰脲、三唑并嘧啶磺酰苯胺、嘧啶基硫代苯甲酸类和其他化学物[Csr1,SurA等]),溴苯腈抗性(例如Bxn),对HPPD酶(4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶)抑制剂的抗性,对八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase)(PDS)的抑制剂的抗性,对光系统II抑制性除草剂(例如psbA)的抗性,对光系统I抑制性除草剂的抗性,对原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase IX(PPO))抑制性除草剂(例如PPO-1)的抗性,对苯基脲除草剂(例如CYP76B1)的抗性,麦草畏降解酶(dicamba-degrading enzyme)(参见,例如US20030135879),和其他可单独或以多种组合叠加的性状相组合,以提供有效控制或预防杂草演替(weed shift)的能力和/或对于任何前述类型的除草剂的抗性。

[0086] 此外,大豆事件pDAB9582.816.15.1可与一种或多种其他输入(例如,昆虫抗性,病原体抗性,或应激耐受性等)或输出(例如增加的产量,改善的油分布(profile),改善的纤

维品质等)性状叠加。因此本主题公开的实施方式可用于提供优良作物品质的农艺组合,同时具有灵活且合算地控制任何数量的农艺学病虫害的能力。

[0087] 本领域内已描述了通过同源重组将多核苷酸序列整合在植物细胞的特定染色体位点内的方法。举例而言,描述于美国专利申请公开号2009/0111188A1(其通过提及并入本文)的位点特异性整合描述了使用重组酶或整合酶介导将供体多核苷酸序列导入染色体靶。此外,国际专利申请号W0 2008/021207(其通过提及并入本文)描述了锌指介导的将一种或多种供体多核苷酸序列整合入基因组特定位置内的同源重组。可应用重组酶,如描述于美国专利号6,720,475(其通过提及并入本文)的FLP/FRT或描述于美国专利号5,658,772(其通过提及并入本文)的CRE/LOX,将多核苷酸序列整合入特定染色体位点。最后,Puchta等,PNAS USA 93 (1996) pp.5055-5060描述了大范围核酸酶(meganucleases)将供体多核苷酸靶向具体染色体位置的应用。

[0088] 其他用于在植物细胞内位点特异性整合的方法一般是已知的,并可加以使用(Kumar等,Trands in Plant Sci.6 (4) (2001) pp.155-159)。此外,在数种原核和低等真核生物中鉴定的位点特异性重组系统可适用于在植物中使用。此类系统的实例包括但不限于:来自酵母Zygosaccharomyces rouxii的pSR1质粒的R/RS重组酶系统(Araki等(1985)J.Mol.Biol.182:191-203),和噬菌体Mu的Gin/Gix系统(Maeser和Kahlmann(1991)Mol.Gen.Genet.230:170-176)。

[0089] 在本公开的一些实施方案中,可需要将新的转基因整合或叠加至既存的转基因事件附近。该转基因事件可视为基于下述独特的特征而选择的优选的基因组位点:如单个插入位点,正常的孟德尔分离和稳定表达,以及优越效力的组合(包括在多个环境位置中及跨多个环境位置的除草剂耐受性和农艺学表现)。包括整合的转基因的后代植物应维持现存转化体的转基因表达特征。而且,因为包含事件的后代植物的基因组侧翼序列和染色体位置已经得到鉴定,包含整合事件的后代植物可以使用先前开发的测定法加以检测和确认。最后,将新转基因整合入与既存转基因紧密连锁的特定染色体位置会加速该转基因通过使用常规育种方法的有性异交渗入其他遗传背景的过程。

[0090] 在本公开的一些实施方案中,从转基因事件切出多核苷酸序列是理想的。举例而言,美国专利申请公开号2011/0191877(其通过提及并入本文)描述了转基因切出,其描述了使用锌指核酸酶从染色体整合的转基因事件中移出由基因表达盒组成的多核苷酸序列。移出的多核苷酸序列可以是选择标志物。在切出并移出多核苷酸序列时,经修饰的转基因事件可通过插入多核苷酸序列重新打靶。多核苷酸的切出及之后对修饰的转基因事件的重新打靶提供了若干优势,如选择标志物的重复使用、或能够克服特定基因的表达所致的对植物转录组(transcriptome)的非意图变化等。

[0091] 本文中公开了大豆基因组中染色体03上的特定位点,其可用于插入异源核酸。因此,本主题公开的实施方式提供了将感兴趣的异源核酸导入该预先建立的靶位点或该靶位点附近的方法。本主题公开的实施方式还涵盖了包含任何在公开的靶位点处或在该位点附近的插入的异源核苷酸序列的大豆种子和/或大豆植物。实现此种靶向整合的一种选择是切出其他的插入物和/或用其他的插入物替换(代替本文中例示的pat表达盒)。在此一般方面,可根据本主题公开的实施方式使用例如靶向同源重组,但不限于此。

[0092] 如用于本文,将基因、事件或性状“叠加”是将所需的多个性状组合到一个转基因

品系中。植物育种者通过在各自具有所需性状的亲本之间进行杂交，然后鉴定具有所有这些所需性状的后代，来将转基因性状叠加。另一种叠加基因的方式是通过在转化过程中同时将两种或更多种基因转移至植物细胞核中。另一种叠加基因的方式是通过将转基因植物用另一种感兴趣的基因再次转化。举例而言，可使用基因叠加以组合两种或更多种不同性状，包括例如两种或更多种不同昆虫性状，昆虫抗性性状和疾病抗性性状，两种或更多种除草剂抗性性状，和/或昆虫抗性性状和除草剂抗性性状。在感兴趣的基因之外还使用选择标志物亦可视为基因叠加。

[0093] “同源重组”指任何具有包含类似核苷酸序列的对应位点的核苷酸序列对之间的反应，且通过该反应两种核苷酸序列可相互作用(重组)形成新的、重组的DNA序列。类似核苷酸序列的位点在本文中各自称作“同源序列”。一般地，同源重组的频率随着同源序列的长度的增加而增加。因此，尽管同源重组可在两种并非完全相同的核苷酸序列之间发生，但其重组频率(或效率)随着两种序列之间的差异的增加而衰减。重组可使用每个供体和靶分子上各一个同源序列来实现，由此生成“单交换”重组产物。或者，可在每个靶和供体核苷酸序列上配置两个同源序列。供体上的两个同源序列与靶上的两个同源序列之间的重组生成“双交换”重组产物。若供体分子上的同源序列位于待操纵的序列(例如，感兴趣的序列)两侧，与靶分子的双交换重组会得到这样的重组产物：其中感兴趣的序列替代了原先位于靶分子上的同源序列之间的DNA序列。靶和供体之间通过双交换重组事件所致的DNA序列交换称为“序列替代”。

[0094] 本主题公开实施方式的优选的植物或种子在其基因组中包含起作用的cry1F, cry1Ac synpro和pat核苷酸序列，如本文中鉴别的，以及本文中鉴别的在所述插入物的两侧至少20-500或更多个连续的侧翼核苷酸。除非另行指明，当提及侧翼序列时，是指相对于SEQ ID NO:1和2鉴别的那些侧翼序列。这些侧翼序列的全部或部分可望被转移至作为含有该事件的亲本品系的有性杂交的结果而接收该插入的DNA的后代。

[0095] 本主题公开的实施方式包括本主题公开的实施方式的植物的可再生细胞的组织培养。还包括了从此种组织培养再生的植物，特别是当所述植物能够表达例示的品种的所有形态和生理特性时。本主题公开的实施方式的优选植物具有从保藏的种子种植的植物的所有生理和形态特征。本公开的实施方式进一步包括此种种子的后代和拥有感兴趣的品质性状的种子。

[0096] 如用于本文，“品系”为一组对于至少一种性状在个体间显示很少或没有遗传差异的植物。此类品系可通过几个世代的自花授粉和选择，或从单个亲本使用组织或细胞培养技术进行的营养繁殖来构建。

[0097] 如用于本文，术语“栽培种”和“品种”是同义词，并指用于商业生产的品系。

[0098] “稳定性”或“稳定的”意指对于给定组分，该组分在世代间，且优选至少三个世代保持。

[0099] “商业实用性”定义为具有良好的植物活力(vigor)和高可育性，使得该作物可由农民使用常规耕作设备来产生，且可使用常规压榨和提取设备从种子提取具有所述组分的油。

[0100] “农艺学良种的”意指品系除了由于本主题事件的昆虫抗性和除草剂耐受性之外，还具有期望的农艺学特征如产率、成熟性、疾病抗性等。这些农艺学特征和数据点中的任何

和全部可用于鉴定这类植物,或者作为一系列用于鉴定这类植物的特征中的一个点或者作为任一端或两端。

[0101] 如本领域技术人员根据本公开可知,检测试剂盒的优选实施方案,例如,可含有涉及和/或包含“接点序列”或“过渡序列”(插入物序列与大豆基因组侧翼序列相遇之处)的引物和/或探针。举例而言,这包括涉及用于鉴定一个或两个接点序列(插入物与侧翼序列相遇之处)的多核苷酸探针、引物和/或扩增子。一种常见设计是让一个引物在侧翼区中杂交,让另一个引物在插入物中杂交。此类引物各自的长度常为约至少~15个残基。有了这种配置,所述引物可用于生成/扩增可检测的扩增子,该扩增子指示本主题公开实施方式的事件的存在。这些引物可用于生成跨越(并含有)如上所指示的接点序列的扩增子。

[0102] 在侧翼序列中“触地(touch down)”的引物通常设计为不在超过接点约1200个碱基处杂交。因此,通常的侧翼引物应设计为包含每条链上从插入起始位置起向侧翼序列延伸1200个残基以内的范围中的至少15个残基。即,包含SEQ ID NO:1的碱基对1至1273和/或SEQ ID NO:2的碱基对176至1687(或其与杂交)的合适大小的序列的引物落在本主题公开的实施方式的范围内。同样,插入物引物可以在插入物上的任何地方设计,但是,举例而言,SEQ ID NO:14的碱基对1273至1873和13058至13658之间可以非排他性地用此类引物设计。

[0103] 本领域技术人员亦会想到,可将引物和探针设计为在一定范围的标准杂交和/或PCR条件下杂交,其中所述引物或探针并不完美地互补于所例示的序列。即,可容忍一定程度的错配或简并。对于大约20个核苷酸的引物,例如,若错配的碱基在引物的内部或与扩增子相反的末端,通常一个或两个左右的核苷酸并不需要与相反链结合。下面提供了多种适当的杂交条件。合成的核苷酸类似物,如次黄嘌呤核苷,亦可用于探针。亦可使用肽核酸(PNA)探针,以及DNA和RNA探针。重要的是,此类探针和引物能够诊断(能够唯一地鉴定和区分)本主题公开实施方式的事件的存在。

[0104] 应指出的是,PCR扩增中可发生错误,其可例如导致次要的测序错误。即,除非另行指明,本文中列出的序列是通过从大豆基因组DNA生成扩增子,然后克隆所述扩增子并对其测序而确定的。考虑到为了从基因组DNA测序而生成充足的扩增子所需的扩增轮次较多,在此方式生成和确定的序列中发现细微差别和次要差异并不罕见。本领域技术人员应理解并留意由于这些类型的常见测序错误或差异所需的任何调整均落入本主题公开的实施方式的范围内。

[0105] 亦应指出一些基因组序列的缺失并非罕见,例如,当在构建事件过程中插入序列时。因此,本主题的侧翼序列与例如GENBANK中列出的基因组序列之间也有可能出现一些差异。

[0106] DNA序列“插入物”的组分图示于附图中,并在下文实施例中更加详细地讨论。这些组分或其片段的DNA多核苷酸序列可在本公开的实施方式的方法中用作DNA引物或探针。

[0107] 在本公开的一些实施方案中,提供了用于检测来自大豆植物的植物和种子等中转基因/基因组插入区的存在的组合物和方法。提供了这样的DNA序列,它们包含本文中提供的本主题5'转基因/基因组插入区接点序列(SEQ ID NO:1碱基对1至1273和SEQ ID NO:14的碱基对1至1273之间)、其区段、及例示序列的互补物及其任何区段。提供了如下的DNA序列,其包含本文中提供的主题3'转基因/基因组插入区接点序列(SEQ ID NO:2的碱基对176

至1687和SEQ ID NO:14的碱基对13659至15170之间),其区段,及例示序列的互补物及其任何区段。该插入区接点序列跨越插入基因组的异源DNA和来自所述插入位点侧翼的大豆细胞的DNA之间的接点。此类序列可能能够诊断给定事件。

[0108] 基于这些插入和边界序列,可生成事件特异性引物。PCR分析证明,通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子,能够在不同大豆基因组中鉴定出本主题公开的实施方式的大豆品系。这些和其他相关的方法可用于唯一地鉴定包括大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆品系。因此衍生自此类引物对的PCR扩增子是唯一的,且可用于鉴定这些大豆品系。

[0109] 在一些实施方案中,包含新的转基因/基因组插入区的连续片段的DNA序列是本公开的一个方面。包括了这样的DNA序列,其包含充分长度的转基因插入序列的多核苷酸和充分长度来自三种前述大豆植物中的一种或多种的大豆基因组序列的多核苷酸和/或可用作引物序列的序列以供产生能够诊断一种或多种这些大豆植物的扩增子产物。

[0110] 相关的实施方案涉及本文中鉴别的DNA序列的转基因区(如SEQ ID No:1及其片段)包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸或其互补物的DNA序列,和来自这些序列的类似长度的侧翼大豆DNA序列,或其互补物。此类序列可作为DNA引物用于DNA扩增方法。使用这些引物产生的扩增子能够诊断本文中提及的任意大豆事件。因此,本公开的实施方式还包括通过此类DNA引物产生的扩增子。

[0111] 本公开的实施方式还包括在样品中检测对应于本文中提及的大豆事件的DNA存在的方法。此类方法可包括:(a)将包含DNA的样品与引物组相接触,所述引物组当用于用来自这些大豆事件至少之一的DNA进行的核酸扩增反应时,产生能够诊断所述事件的扩增子;(b)进行核酸扩增反应,由此产生所述扩增子;和(c)检测所述扩增子。

[0112] 本主题公开的实施方式的进一步的检测方法包括在样品中检测对应于所述事件的DNA的存在方法,其中所述方法包括:(a)将包含DNA的样品与探针相接触,所述探针在严格杂交条件下与来自所述大豆事件的DNA杂交、而不在严格杂交条件下与对照大豆植物(非感兴趣的事件的DNA)杂交;(b)对所述样品和探针施以严格杂交条件;和(c)检测所述探针对所述DNA的杂交。

[0113] 在进一步的实施方案中,本主题公开包括产生大豆植物的方法,所述大豆植物包括本主题公开的实施方式的大豆事件pDAB9582.816.15.1,其中所述方法包括下述步骤:(a)将第一亲本大豆品系(包含本公开实施方式的表达盒,其赋予所述品系的植物以草胺膦耐受性)与第二亲本大豆品系(其缺乏该除草剂耐受性性状)有性杂交,由此产生多株后代植物;和(b)通过使用分子标志物选择后代植物。此方法可任选地包括将所述后代植物与第二亲本大豆品系回交以产生包含所述昆虫抗性和草胺膦耐受性性状的纯育(true-breeding)大豆植物的额外步骤。

[0114] 根据本公开的另一个方面,提供了确定与所述事件杂交的后代的接合性(zygosity)的方法。所述方法可包括将包含大豆DNA的样品与本主题公开的实施方式的引物组相接触。此种引物,当用于使用来自所述大豆事件的基因组DNA的核酸扩增时,产生能够诊断所述大豆事件的第一扩增子。此方法进一步包括进行核酸扩增反应,由此产生第一扩增子;检测所述第一扩增子,并将包含大豆DNA的样品与第二引物组相接触(所述第二引物组,当将其用于来自大豆植物的基因组DNA的核酸扩增反应时,产生包含天然大豆基因组

DNA内源序列的第二扩增子,该内源序列不含所述事件的多核苷酸序列);并进行核酸扩增反应,由此产生第二扩增子。所述方法进一步包括检测所述第二扩增子,和比较样品中的第一和第二扩增子,其中两种扩增子的存在指示转基因插入的接合性。

[0115] 可使用本文中公开的组合物和DNA检测领域公知的方法开发DNA检测试剂盒。所述试剂盒可用于在样品中鉴定本主题大豆事件DNA,并可应用于含有该DNA的大豆植物的育种方法。所述试剂盒含有与所述扩增子(例如本文中公开的扩增子)互补的DNA序列,或与本主题事件的转基因遗传元件中所含的DNA互补的DNA序列。这些DNA序列可用于DNA扩增反应,或作为DNA杂交方法中的探针。试剂盒亦可含有进行检测方法所需的试剂和材料。

[0116] “探针”是附于常规的可检测标记或报道分子(如放射性同位素、配体,化学发光剂或酶)的分离的核酸分子。此种探针可以杂交于靶核酸的链,在本公开的实施方式的情况下,杂交于来自所述大豆事件之一的基因组DNA的链,无论其来自大豆植物或来自含有由所述事件的DNA的样品。根据本公开的实施方式的探针不仅包括脱氧核糖核酸或核糖核酸,且还包括聚酰胺和其他特异性结合靶DNA序列并可用于检测所述靶DNA序列的存在的探针物质。

[0117] “引物”是通过核酸杂交与靶DNA链退火以形成引物和靶DNA链之间的杂合体,然后由聚合酶例如DNA聚合酶沿所述靶DNA链延伸的分离的/合成的核酸。本公开的实施方式的引物对涉及其用于扩增靶核酸序列(例如通过聚合酶式反应(PCR)或其他常规核酸扩增方法)的用途。

[0118] 探针和引物的长度一般为5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,

421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,或1000,或2000,或5000个核苷酸或更长。此类探针和引物在严格杂交条件下与靶序列特异性杂交。优选地,根据本公开实施方式的探针和引物与靶序列具有完全的序列类似性,尽管可通过常规方法设计与靶序列不同并保留与靶序列杂交能力的探针。

[0119] 用于制备和使用探针和引物的方法描述于例如Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., vol.1-3, ed. Sambrook等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989。PCR-引物对可从已知序列,例如通过使用为此目的的计算机程序来获得。

[0120] 基于本文中公开的侧翼DNA和插入序列的引物和探针可用于通过常规方法,例如通过对此类序列的再克隆和测序,来确证(且视需要,改正)公开的序列。

[0121] 本公开实施方式的核酸探针和引物在严格条件下与靶DNA序列杂交。可使用任何常规核酸杂交或扩增方法以鉴定样品中来自转基因事件的DNA的存在。核酸分子或其片段能够在某些情况下特异性杂交于其他核酸分子。如用于本文,若两个核酸分子能够形成反平行双链核酸结构,则称该两个分子能够彼此特异性杂交。若两个核酸分子呈现完全互补性,则称一个核酸分子为另一个核酸分子的“互补物”。如用于本文,当一个分子的每一个核苷酸互补于另一个分子的核苷酸时,称这些分子呈现“完全互补性”。呈现完全互补性的分子通常以足够的稳定性相互杂交以允许其在常规的“高严格”条件下维持彼此粘合(anneal)。常规的高严格条件描述于Sambrook等, 1989。

[0122] 若两个分子可以以足够的稳定性相互杂交以允许其在至少常规的“低严格”条件下维持彼此退火(anneal),则称两个分子呈现“最低限度互补(minimally complementary)”。常规的低严格条件描述于Sambrook等, 1989。为了使核酸分子充当引物或探针,序列仅需呈现最低限度互补以能够在采用的特定溶剂和盐浓度下形成稳定的双链结构。

[0123] 术语“严格条件”或“严格性条件”是功能限定的,与核酸探针对靶核酸(即对感兴趣的特定核酸序列)通过Sambrook等, 1989中9.52-9.55处讨论的特异性杂交步骤而杂交相关(还可见于Sambrook等, 1989, 9.47-9.52和9.56-9.58)。

[0124] 取决于考虑到的应用,可使用严格条件的多种条件或探针或引物的多核苷酸序列简并以获得探针对靶序列的不同程度的杂交选择性。对于需要高选择性的应用,通常可采用使一种多核苷酸序列与第二多核苷酸序列杂交的相对严格的条件,例如,会选择相对低盐和/或高温度的条件,如由约0.02M至约0.15M NaCl在约50°C至约70°C的温度提供的条件。严格条件,例如,可涉及用高严格性洗涤缓冲液(0.2X SSC, 0.1% SDS, 65°C)洗涤杂交滤纸至少两次。促进DNA杂交的适当严格条件,例如在约45°C的6.0X氯化钠/柠檬酸钠(SSC),接着在50°C用2.0X SSC的洗涤,对于本领域技术人员是已知的。举例而言,洗涤步骤中的盐浓度可选自在50°C的约2.0X SSC的低严格度至在50°C的约0.2X SSC的高严格度。此外,洗涤步骤中的温度可从室温约22°C的低严格条件增加至约65°C的高严格条件。温度和盐均可变化,或可将温度或盐浓度之一维持恒定的同时改变另一个变量。此类选择性条件几乎不

容忍探针和模板或靶链之间的错配(若有的话)。通过杂交检测DNA序列对于本领域技术人员是公知的,且美国专利号4,965,188和5,176,995的教导是杂交分析方法的实例。

[0125] 在一个特别优选的实施方案中,本公开实施方式的核酸会在高严格条件下特异性杂交于本文中例示或提出的一种或多种引物(或扩增子或其他序列),包括其互补物和片段。在本公开的一个方面,本公开的实施方式的标志物核酸分子具有如本文在例示性序列之一中列出的核酸序列,或其互补物和/或片段。

[0126] 在本公开的另一个方面,本公开实施方式的标志物核酸分子与此类核酸序列享有80%至100%或90%至100%的序列同一性。在本公开的进一步的方面,本公开实施方式的标志物核酸分子与此种序列享有95%至100%的序列同一性。此类序列可用作植物育种方法中的标志物以鉴定遗传杂交的后代。探针对靶DNA分子的杂交可通过任何本领域技术人员已知的数种方法来检测,其可包括但不限于荧光标记,放射性标记,基于抗体的标记和化学发光标记。

[0127] 对于使用特定扩增引物对扩增靶核酸序列(例如,通过PCR),“严格条件”为允许引物对仅杂交于会与具有对应的野生型序列(或其互补物)的引物结合并优选产生独特扩增产物即扩增子的靶核酸序列的条件。

[0128] 术语“特异于(靶序列)/对(靶序列)特异性的”表明探针或引物在严格杂交条件下仅与包含所述靶序列的样品中的靶序列杂交。

[0129] 如用于本文,“扩增的DNA”或“扩增子”指作为核酸模板一部分的靶核酸序列的核酸扩增产物。举例而言,为了确定从有性杂交获得的大豆植物是否含有来自本公开的实施方式的大豆植物的转基因事件基因组DNA,可对从大豆植物组织提取的DNA进行使用引物对的核酸扩增方法以产生能够诊断所述事件DNA的存在扩增子,所述引物对包括来源于所述植物基因组中邻近插入的异源DNA插入位点的侧翼序列的引物,和来源于插入的异源DNA的第二引物。所述扩增子的长度和序列亦能够诊断该事件。所述扩增子的长度的范围可为引物对的总长度加上一个核苷酸碱基对,和/或引物对的总长度加上约2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,

317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,或500,750,1000,1250,1500,1750,2000或更多个核苷酸碱基对(加上或减去任何上述列出的增量)。或者,引物对可来源于插入的DNA两侧的侧翼序列从而产生包括整个插入核苷酸序列的扩增子。来源于植物基因组序列的引物对的成员可位于距插入的DNA序列一定距离处。该距离的范围可为一个核苷酸碱基对至约两万个核苷酸碱基对。术语“扩增子”的使用特别排除了可在DNA热扩增反应中形成的引物二聚体。

[0130] 核酸扩增可通过任何本领域中已知的多种核酸扩增方法,包括聚合酶链式反应(PCR)来实现。多种扩增方法在本领域是已知的,并描述于,例如,美国专利号4,683,195和美国专利号4,683,202。开发了PCR扩增方法以扩增高至22kb的基因组DNA。这些方法,以及本领域已知的其他DNA扩增的方法可用于本公开实施方式的实践。可验证(视需要,还可校正)来自主题大豆事件的异源转基因DNA插入的序列或侧翼基因组序列,即使用来源于本文中提供的序列的引物来扩增此类序列,接着对PCR扩增子或克隆的DNA进行标准DNA测序。

[0131] 可通过多种技术检测由这些方法产生的扩增子。琼脂糖凝胶电泳和用溴乙锭的染色是检测DNA扩增子的常见公知方法。另一此类方法是Genetic Bit Analysis,其中设计了与邻接的侧翼基因组DNA序列和插入的DNA序列两者重叠的DNA寡核苷酸。将所述寡核苷酸固定于微孔板的孔中。在对感兴趣的区域的PCR(使用一个在插入序列中的引物和一个在邻接侧翼基因组序列中的引物)之后,可将单链PCR产物与固定的寡核苷酸杂交,并充当模板用于单碱基延伸反应,所述反应使用DNA聚合酶和对预期的接下来的碱基具有特异性的标记的ddNTP。通过定量发光的量可以完成边界产物的分析。发光信号表明由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸所致的插入/侧翼序列的存在。

[0132] 另一种方法是如Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000) 所述的Pyrosequencing技术。在该方法中,设计了与邻近基因组DNA和插入DNA连接处重叠的寡核苷酸。设计所述寡核苷酸杂交于来自感兴趣的区的单链PCR产物(一个引物在插入序列中,而一个在侧翼基因组序列中),并在DNA聚合酶、ATP、硫酸化酶(sulfurylase)、萤光素酶、腺苷三磷酸双磷酸酶(apyrase)、腺苷5'磷硫酸(adenosine 5' phosphosulfate)和萤光素的存在下温育。单独添加DNTP,且其组入导致光信号,对该光信号进行测量。光信号表明由于成功的扩增、杂交和单碱基或多碱基延伸而导致的转基因插入/侧翼序列的存在。

[0133] 荧光偏振是另一种可用于检测本公开实施方式的扩增子的方法。遵循该方法,设计了与基因组侧翼和插入的DNA连接处重叠的寡核苷酸。将寡核苷酸杂交于来自感兴趣的区的单链PCR产物(一个引物在插入的DNA中,一个在侧翼基因组DNA序列中),并在DNA聚合

酶和荧光标记的ddNTP的存在下温育。单碱基延伸导致ddNTP的组入。发光标记的ddNTP的组入可使用荧光计作为偏振改变来测量。偏振中的改变表明由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸所致的转基因插入/侧翼序列的存在。

[0134] **TAQMAN®** (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) ,是检测和量化DNA序列存在的方法。简言之,设计了与基因组侧翼和插入DNA连接处重叠的FRET寡核苷酸探针。在热稳定性聚合酶和dNTP存在下循环FRET探针和PCR引物(一个引物在插入DNA序列中,一个在侧翼基因组序列中)。在特异性扩增过程中,Taq DNA聚合酶校对机理将FRET探针上的荧光模块从淬灭模块释放。荧光信号表明由于成功的扩增和杂交所致的侧翼/转基因插入序列的存在。

[0135] 已描述了分子信标(Molecular Beacon)用于多核苷酸序列检测。简言之,设计了与侧翼基因组和插入DNA连接处重叠的FRET寡核苷酸探针。FRET探针的独特结构导致其含有保持荧光和淬灭模块彼此接近的二级结构。在热稳定性聚合酶和dNTP的存在下循环FRET探针和PCR引物(一个引物在插入DNA序列中,一个在侧翼基因组序列中)。在成功的PCR扩增之后,FRET探针对靶序列的杂交导致探针二级结构的去除和荧光和淬灭模块的空间上的分离。结果产生荧光信号。荧光信号表明由于成功的扩增和杂交所致的侧翼基因组/转基因插入序列的存在。

[0136] 在已经公开了对插入而言优秀的大豆基因组中的位置的基础上,本主题公开的实施方式还包括这样的大豆种子和/或大豆植物,其在该基因组位置的附近包含至少一个非大豆事件pDAB9582.816.15.1插入物。一种选项是用不同插入物替换本文中例示的大豆事件pDAB9582.816.15.1的插入物。通常来说,例如,在具体的实施方式中使用靶向同源重组。该类型的技术是例如W0 03/080809A2及其相应的公开的美国申请(US 20030232410)的主题。因此,本主题公开的实施方式包括植物和植物细胞,其包含侧翼为本文中鉴定的侧翼序列(SEQ ID N0:1的bp 1-1273和SEQ ID N0:2的bp 176-1687)的全部或可识别部分的异源插入(取代多拷贝cry1F,cry1Ac,或pat基因,或与多拷贝的cry1F,cry1Ac,或pat基因一起)。也可以以此/这些方式靶向cry1F,cry1Ac,或pat的一个额外拷贝(或多个额外拷贝)以供插入。

[0137] 将本文中提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和公开通过提述全文并入本文,以其不与本说明书的明确教导矛盾为限。包括了下述实施例以说明执行本公开实施方式的步骤,和阐明本公开的某些优选实施方案。这些实施例不应视为限制性的。本领域技术人员应理解下述实施例中公开的技术代表用于说明供其实践的优选模式的具体方法。然而,本领域技术人员根据本公开,应理解可在这些具体实施方案中进行许多变化,而仍旧获得相似或类似的结果,而不背离本公开的精神和范围。除非另行指明,所有百分比为重量百分比,而所有溶剂混合物部分为体积,除非另行指明。

[0138] 除非另行指明,使用下述缩写:

- [0139] bp 碱基对
- [0140] °C 摄氏度
- [0141] DNA 脱氧核糖核酸
- [0142] EDTA 乙二胺四乙酸
- [0143] kb 千碱基

- [0144]  $\mu\text{g}$  微克
- [0145]  $\mu\text{L}$  微升
- [0146] mL 毫升
- [0147] M 分子量
- [0148] PCR 聚合酶链式反应
- [0149] PTU 植物转录单元或表达盒
- [0150] SDS 十二烷基硫酸钠
- [0151] SSC 含有氯化钠和柠檬酸钠的混合物的缓冲溶液, pH 7.0
- [0152] TBE 含有Tris碱, 硼酸和EDTA的混合物的缓冲溶液, pH 8.3

## 实施例

- [0153] 实施例1:Cry1F,Cry1Ac和PAT大豆事件pDAB9582.816.15.J的转化和选择
- [0154] 经由土壤杆菌介导转化大豆子叶节外植体生成含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的转基因大豆 (*Glycine max*)。使用携带双元载体pDAB9582(图1)的卸甲的土壤杆菌菌株 EHA101 (Hood等, 1993) 来启动转化, 所述pDAB9582在T链DNA区内含有选择标志物pat v6和感兴趣的基因cry1F v3和cry1Ac synpro。pDAB9582的T链DNA序列参见SEQ ID NO:3, 其注释见下文表1。
- [0155] 表1:位于pDAB9582上的基因元件。

bp (SEQ ID NO:3)	构建体元件	参考文献
272 – 1593	AtUbi10 启动子	Callis 等, (1990) <i>J. Biol. Chem.</i> , 265: 12486-12493
1602 – 5048	Cry1F	上文提及
5151 – 5607	ORF23 3'UTR	美国专利 No. 5,428,147
5671 – 6187	CsVMV 启动子	Verdaguer 等, (1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 31: 1129-1139
6197 – 9667	Cry 1AC	上文提及
9701 – 10157	ORF23 3'UTR	美国专利 No. 5,428,147
10272 – 10788	CsVMV 启动子	Verdaguer 等, (1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 31: 1129-1139
10796 – 11347	PAT	Wohlleben 等, (1988) <i>Gene</i> 70: 25-37
11450 – 12153	ORF1 3'UTR	Huang 等, (1990) <i>J. Bacteriol.</i> 172:1814-1822

- [0156]
- [0157] 使用经修改的Zeng等 (2004) 的规程实施土壤杆菌介导的转化。简言之, 将大豆种子 (Maverick栽培种) 在基础培养基上萌发, 并且将子叶节分离, 并用土壤杆菌感染。发芽启动培养基、芽伸长培养基、和生根培养基补充有头孢噻肟 (cefotaxime), 特美汀 (timentin) 和万古霉素以除去土壤杆菌。采用草胺膦选择以抑制非转化芽的生长。将经过选择的芽转移至生根培养基以形成根, 然后转移至土壤预混物以使小植物适应环境。

- [0158] 用草胺膦对经选择的小植物的顶生小叶进行涂叶 (leaf-paint) 以筛选推定的转化体。将筛选出的小植物转移至温室, 容许其适应环境, 然后用草胺膦进行涂叶以再次确认耐受性, 并且视为推定的转化体。将筛选的植物取样, 并实施分子分析以确认选择标志物基

因和/或感兴趣的基因。容许T<sub>0</sub>植物在温室内自花传粉以产生T<sub>1</sub>种子。

[0159] 此事件,大豆事件pDAB9582.816.15.1,是从一个独立的转化分离株生成的。将T<sub>1</sub>植物回交,并经历后续的世代渐渗入良种品种中。该事件是基于其独特的特征而被选中的,这些特征诸如单一插入位点,正常的孟德尔分离,稳定的表达,和卓越的效力(包括昆虫抗性、除草剂耐受性和农艺学性能)的组合。以下实施例含有用于表征大豆事件pDAB9582.816.15.1的数据。

[0160] 实施例2:大豆事件pDAB9582.816.15.J中蛋白质表达的表征

[0161] 表征大豆事件pDAB9582.816.15.1中表达的重组Cry1F,Cry1Ac,和PAT蛋白的生物化学特性。定量酶联免疫吸附测定法(ELISA)是本领域内已知的一种生物化学测定法,可以用于表征蛋白质的生物化学特性并且确认这些蛋白质在大豆事件pDAB9582.816.15.1中的表达。

[0162] 实施例2.1: PAT,Cry1F,和Cry1Ac蛋白在植物组织中的表达

[0163] 从测试植物分离大豆组织的样品,并且准备好进行表达分析。用含有0.5%牛血清清蛋白(BSA)并含有去污剂Tween-20的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBST)从大豆植物组织提取PAT蛋白。将植物组织离心;收集水性上清液,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用PAT ELISA试剂盒以夹心模式分析。按照制造商推荐的规程(Envirologix,Portland,ME)使用试剂盒。此测定法测量表达的PAT蛋白浓度。

[0164] 用含有去污剂Tween-20的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBST)从大豆植物组织提取Cry1F蛋白。将植物组织离心;收集水性上清液,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用Cry1F ELISA试剂盒以夹心模式分析。按照制造商推荐的规程(Strategic Diagnostics Inc., Newark,DE)使用试剂盒。此测定法测量表达的Cry1F蛋白的浓度。

[0165] 用含有0.5%牛血清清蛋白(BSA)并含有去污剂Tween-20的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBST)从大豆植物组织提取Cry1Ac蛋白。将植物组织离心;收集水性上清液,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用Cry1Ac ELISA试剂盒以夹心模式分析。按照制造商推荐的规程(Strategic Diagnostics Inc., Newark,DE)使用试剂盒。此测定法测量表达的Cry1Ac蛋白的浓度。

[0166] 实施检测分析以在大豆事件pDAB9582.816.15.1中在纵向(世代间)和横向(世代内的谱系间)两个方面调查表达稳定性和可遗传性。

[0167] 实施例2.2:Cry1F,Cry1Ac和PAT蛋白在植物组织中的表达

[0168] 使用上述规程在大豆事件pDAB9582.816.15.1中测定Cry1F,Cry1Ac和PAT蛋白水平。使用定量酶联免疫吸附测定法(ELISA)方法从大豆叶组织测量可溶性、可提取性蛋白质。从T<sub>2</sub>至T<sub>6</sub>世代,大豆事件pDAB9582.816.15.1的表达在所有谱系间是稳定(不分离)且一致的。表2列出大豆事件pDAB9582.816.15.1中转基因蛋白质的均值表达水平。

[0169] 表2.大豆事件pDAB9582.816.15.1中不同转基因蛋白质的均值表达水平。

不同蛋白质的表达水平(ng/cm <sup>2</sup> )			
事件	Cry1F	Cry1 Ac	PAT
[0170]			

[0171]	大豆事件 pDAB9285.816.15.1	89	18.6	9.9
--------	---------------------------	----	------	-----

[0172] 实施例3:大豆事件pDAB9582.816.15.1的插入物和侧翼边界区中的DNA序列的克隆和表征

[0173] 为了表征并描述基因组插入位点,测定了大豆事件pDAB9582.816.15.1的侧翼基因组T-DNA边界区的序列。确认了大豆事件pDAB9582.816.15.1的基因组序列,其包含1273bp的5'侧翼边界序列(SEQ ID NO:1)和1371bp的3'侧翼边界序列(SEQ ID NO:2)。基于大豆事件pDAB9582.816.15.1边界序列的PCR扩增确认了边界区是大豆起源的,且接点区是大豆事件pDAB9582.816.15.1的独特序列。接点区可以用于大豆事件pDAB9582.816.15.1的事件特异性鉴定。另外,通过从未转化大豆的基因组扩增与鉴定的侧翼边界序列的区域对应的基因组片段表征了T链插入位点。大豆事件pDAB9582.816.15.1与未转化基因组序列的比较揭示,在T链整合过程中导致从原基因座缺失了约21bp。总体上,对大豆事件pDAB9582.816.15.1的插入物和边界序列的表征表明,来自pDAB9582的T链的完整拷贝存在于大豆基因组中。

[0174] 表3:用于确认大豆事件pDAB9582.816.15.1中的大豆基因组DNA的引物及其序列的列表

SEQ ID NO:	引物名称	大小 (bp)	序列(5' to 3')	目的
SEQ ID NO:4	81615_F W2	30	TTACACCCTTAGGATC GAGACACTTAGAGC	确认 5'边界基因组 DNA, 与 AtUbi10RV1 或 RV2 一起使用; 与 5'IREnd-01 或 5'IREnd-02 一起使用
SEQ ID NO:5	81516_R V1	27	GATTCATGTCCTTCCT AATGCGAATTG	
SEQ ID NO:6	81516_R V2	25	AATTCACATTTACCC CACTTGCAG	
SEQ ID NO:7	81516_R V3	28	GGAGGTGCAGTGAGG AAGGTAATAATGA	
SEQ ID NO:8	5'IREnd-01	29	CGAGCTTCTAATTTC AAACTATTCCGGGC	
SEQ ID NO:9	5'IREnd-02	30	TCCTAGATCATCAGTT CATACAAACCTCCA	
SEQ ID NO:10	AtUbi10 RV1	29	CGGTCTAGATCATCA GTTCATACAAACC	
SEQ ID NO:11	AtUbi10 RV2	28	CACTCGTGTTCAGTCC AATGACCAATAA	
SEQ ID NO:12	3'PATEnd05	20	GCTCCTCCAAGGCCA GTTAG	
[0176]	SEQ ID NO:13	3'PATEnd06	20	CCAGTTAGGCCAGTTA CCCA
				确认 3'边界基因组 DNA, 与 81615_RV1、RV2 或 RV3 一起使用

[0177] 表4大豆事件pDAB9582.816.15.1中的边界区和事件特异性序列的标准PCR扩增的条件。

靶序列	引物组	PCR 混合物	预变性 (°C/分钟)	变性 (°C/秒)	延伸(°C/分钟:秒)	最终延伸 (°C/分钟)
5'边界	81615_FW2/AtUbi10_RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		
5'边界	81615_FW2/ 5'IREnd-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		
5'边界	81615_FW3/ 5'IREnd-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		
[0178]	3'边界	3'PATEnd05/8 1615_RV1	D	95/3	98/10	68/4:00
					72/10 32 个循环	
3'边界	3'PATEnd05/8 1615_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 个循环		
3'边界	3'PATEnd06/8 1615_RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		
3'边界	3'PATEnd06/8 1615_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		
插入基因 组间	81615_FW2/8 1615_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 个循环		

[0179] 表5:用于大豆事件pDAB9582.816.15.1中的边界区和事件特异性序列的标准PCR扩增的PCR混合物。

PCR 混合物 A		PCR 混合物 B	
试剂	1 倍反应(μL)	试剂	1 倍反应 (μL)
H2O	0.8	H2O	14.6
AccuPrime pfx SuperMix	20	10X LA Taq 缓冲液	2
----	----	MgCl2 (25mM)	0.6

		dNTP (2.5uM)	1.6
10uM 引物	0.2	10uM 引物	0.1
gDNA 消化	1	gDNA 消化	1
		LA Taq (5U/uL)	0.1
反应体积:	22	反应体积:	20
<b>PCR 混合物 C</b>		<b>PCR 混合物 D</b>	
试剂	1 倍反应 ( $\mu$ L)	试剂	1 倍反应 ( $\mu$ L)
H2O	28	H2O	11.6
10X PCR 缓冲液 II (Mg <sup>2+</sup> s)	5	10X PCR 缓冲液 II (Mg <sup>2+</sup> )	2
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	1.5	MgCl <sub>2</sub> [25mM]	0.6
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	3.2
衔接头 PCR 引物 (10 $\mu$ M)	1	引物 1 (10 $\mu$ M)	0.4
GOI 巢式引物 (10 $\mu$ M)	1	引物 2 (10 $\mu$ M)	0.4
结合有 DNA 的珠	5	DNA 模板	0.2
LA Taq (5U/uL)	0.5	LA Taq (5U/uL)	1.6
反应体积:	50	反应体积:	20

[0181] 实施例3.1:确认大豆基因组序列

[0183] 5' 和3' 侧翼边界与来自染色体03的大豆全基因组鸟枪序列对齐,说明大豆事件pDAB9582.816.15.1的转基因插入在大豆基因组染色体03中。为了确认来自大豆基因组的大豆事件pDAB9582.816.15.1的插入位点,用不同引物对(图2,表3,表4,及表5)实施PCR。使用来自大豆事件pDAB9582.816.15.1和其它转基因或非转基因大豆品系的基因组DNA作为模板。为了确认5' 边界序列是正确的,使用设计为结合At Ubi10启动子基因元件(例如AtUbi10RV1)的引物,和设计为结合大豆基因组染色体03上的克隆5' 端边界的引物,称作81615\_FW2,来扩增跨越At Ubi10启动子基因元件至5' 端边界序列的DNA区段。类似地,为了确认克隆的3' 边界序列,使用pat特异性引物,例如3' PATEnd05,和依照克隆的3' 端边界序列设计的引物,称作81615\_RV1和81615\_RV2,来扩增跨越pat基因至3' 边界序列的DNA区段。用每种引物对仅从大豆事件pDAB9582.816.15.1的基因组DNA扩增出具有预期大小的DNA片段,而从来自其它转基因大豆品系或非转基因对照的DNA样品未扩增出具有预期大小的DNA片段。结果表明克隆的5' 和3' 边界序列是大豆事件pDAB9582.816.15.1的T链插入物的侧翼边界序列。

[0184] 为了进一步确认大豆基因组中的DNA插入,对不含大豆事件pDAB9582.816.15.1的T链插入物的基因组DNA进行了跨越所述大豆边界序列的PCR扩增。使用依照5' 端边界序列设计的引物81615\_FW2和一条设计针对3' 端边界序列的引物81615\_RV3来扩增含有pDAB9582 T链整合的基因座的DNA区段。如预期的,用引物对81615\_FW2和81615\_RV3完成的PCR反应从所有其它大豆对照品系均生成了约1.8kb DNA片段,但pDAB9582.816.15.1则不然。将大豆事件pDAB9582.816.15.1的鉴定的5' 和3' 边界序列与来自染色体03的大豆全基因组鸟枪序列比对,显示从原基因座缺失约21bp(图3)。这些结果证明了大豆事件pDAB9582.816.15.1的转基因插入大豆基因组染色体03的位点中。

[0185] 实施例4:通过Southern印迹表征大豆事件pDAB9582.816.15.1

[0186] 使用Southern印迹分析来建立大豆事件pDAB9582.816.15.1的整合样式。这些实验产生了证明大豆基因组内cry1Ac和cry1F转基因的整合和完整性的数据。大豆事件pDAB9582.816.15.1被表征为一个全长、简单整合的事件，其含有单一拷贝的来自质粒pDAB9582的cry1Ac和cry1F PTU。

[0187] Southern印迹数据提示一个T链片段插入了大豆事件pDAB9582.816.15.1基因组中。进行了详细的Southern印迹分析，其使用对pDAB9582.816.15.1的T链整合区中所含cry1Ac和cry1F基因特异性的探针，和如下所述的描述性限制酶：其切割位点位于质粒内，并且生成位于质粒内部的杂交片段、或跨越质粒与大豆基因组DNA的接点的片段（边界片段）。限制酶与探针的组合的Southern杂交所指示的分子量对于事件而言是独特的，并且建立了其鉴定样式。这些分析亦显示质粒片段插入大豆基因组DNA中时并无cry1Ac和cry1F PTU的重排。

[0188] 实施例4.1:大豆叶样品收集和基因组DNA(gDNA)分离

[0189] 从自含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的个体大豆植物收获的叶组织提取基因组DNA。另外，从常规大豆植物Maverick（其含有代表主题品系的遗传背景，缺乏cry1Ac和cry1F基因）分离gDNA。遵循标准的CTAB法从冻干的叶组织提取单独的基因组DNA。在提取后，使用PICO GREEN试剂（Invitrogen, Carlsbad, CA）用分光荧光光度法对DNA进行定量。

[0190] 实施例4.2:DNA消化和分离

[0191] 对于大豆事件pDAB9582.816.15.1的Southern印迹分子表征，将十微克（10 $\mu$ g）基因组DNA消化。来自大豆事件pDAB9582.816.15.1和非转基因大豆系Maverick的基因组DNA的消化如下所述：将每 $\mu$ g DNA约5个单位的选定的限制酶和相应的反应缓冲液添加至每个DNA样品。将每份样品于约37°C温育过夜。单一消化物使用单独的限制酶AseI, HindIII, NsiI, 和NdeI (New England Biolabs, Ipswich, MA)。双重消化一起使用限制酶NotI和ApaLI (New England Biolabs, Ipswich, MA)。另外，将质粒DNA，即pDAB9582与来自非转基因大豆品种Maverick的基因组DNA组合以制备阳性杂交对照样品。与测试样品使用相同的规程和限制酶消化质粒DNA/基因组DNA混合物。

[0192] 在将消化温育过夜后，添加25 $\mu$ L QUICK-PRECIP PLUS SOLUTION (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD)，并将消化的DNA样品用异丙醇沉淀。将沉淀的DNA团粒在15 $\mu$ L 1倍加样缓冲液（0.01%溴酚蓝, 10.0mM EDTA, 10.0%甘油, 1.0mM Tris pH 7.5）中重悬。然后，将DNA样品和分子大小标记以35伏特电泳通过含0.4倍TAE缓冲液（Fisher Scientific, Pittsburgh, PA）的0.85%琼脂糖凝胶约18-22小时以实现片段分离。将凝胶用溴化乙锭（Invitrogen, Carlsbad, CA）染色，并在紫外（UV）光下显现DNA。

[0193] 实施例4.3:Southern转移和膜处理

[0194] 基本上如由Memelink等(1994)描述的那样实施Southern印迹分析。简言之，在DNA片段的电泳分离和显影之后，用0.25M HCl对凝胶进行脱嘌呤大约20分钟，然后将其暴露于变性溶液（0.4M NaOH, 1.5M NaCl）大约30分钟，然后暴露于中和溶液（1.5M NaCl, 0.5M Tris pH 7.5）至少30分钟。借助芯吸(wicking)系统，用10X SSC过夜Southern转移至尼龙膜上。在转移之后，用2X SSC溶液洗涤膜，然后通过UV交联将DNA结合于膜。该过程产生准备好用于杂交的Southern印迹膜。

[0195] 实施例4.4:DNA探针标记和杂交

[0196] 使用标记的探针(表6)检测结合于尼龙膜的DNA片段。基于PCR,将地高辛(DIG)标记的核苷酸[DIG-11]-dUTP掺入用特异于基因元件的引物从质粒pDAB9582扩增出的DNA片段,来生成探针。使用PCR DIG探针合成试剂盒(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN),遵循生产商推荐的步骤,通过PCR合成来生成DNA探针。

[0197] 对于标记的探针,通过琼脂糖凝胶电泳分析来确定其品质和数量。然后用理想量的标记探针与尼龙膜上的靶DNA的杂交,以供检测特异性片段,使用的步骤基本上对于DIG EASY HYB SOLUTION(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)描述的一样。简言之,将含有固定DNA的尼龙膜印迹在2X SSC中短暂洗涤,并在杂交烤箱中用杂交瓶中的20-25mL的预温热的DIG EASY HYB溶液在大约45-55°C下预杂交约2小时。然后倾去预杂交溶液,并更换为约15mL预温热的DIG EASY HYB溶液,其中含有期望量的通过在热循环仪中加热约5分钟而变性的特异性探针。然后在大约45-55°C在杂交烤箱中进行杂交步骤过夜。

[0198] 在探针杂交结束时,将含有探针的DIG EASY HYB溶液倾入干净试管,并于约-20°C贮存。可根据生产商推荐的步骤将这些探针重新使用2次。将膜印迹短暂漂洗并在干净塑料容器中用低严格性洗涤缓冲液(2倍SSC, 0.1% SDS)在室温洗涤约5分钟两次,然后用高严格性洗涤缓冲液(0.1倍SSC, 0.1% SDS)在大约65°C洗涤两次,各15分钟。将膜印迹用来自DIG清洗和封闭缓冲液组(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)的1倍马来酸缓冲液短暂清洗约5分钟。然后在1倍封闭缓冲液中封闭2小时,并还与含抗DIG-AP(碱性磷酸酶)抗体(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)1倍封闭缓冲液一起温育最少30分钟。在用1倍清洗缓冲液清洗2-3次后,特异性DNA探针与膜印迹保持结合,并且使用CDP-STAR化学发光核酸检测系统(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)遵循制造商的推荐显现经DIG标记的DNA标准品。在一个或多个时间点将印迹暴露于化学发光膜以检测杂交片段并且显现分子大小标准品。膜用ALL-PRO 100PLUS膜显影剂(Konica Minolta, Osaka, Japan)显影,并扫描图像。记录每个探针的检出条带的数目和大小。使用DIG标记的DNA分子量标志物II(DIG MWM II)和DIG标记的DNA分子量标志物VII(DIG MWM VII)(DIG检测后可见,如描述的)来测定Southern印迹上的杂交片段大小。

[0199] 表6:用于Southern分析的探针的位置和长度

[0200]

探针名称	遗传元件	长度(bp)
Cry1Ac	cry1Ac	1720
Cry1F	cry1F	1746
specR	壮观霉素抗性基因	750
OriRep	Ori Rep	852
trfA	复制启动蛋白trfA	1119

[0201] 实施例4.5: Southern印迹结果

[0202] 表7中给出了使用特定的消化物和探针得到的预期的和观察到的片段大小,基于cry1Ac和cry1F PTU的已知限制酶位点。从这些消化和杂交鉴定了两种类型的片段:内部片段,其中各个已知酶位点在探针区侧翼,并完全包含于cry1Ac和cry1F PTU的插入区内;以及边界片段,其中一个已知酶位点位于探针区一端,而预期第二个位点在玉米基因组中。边界片段的大小随事件变化,因为在多数情况下,DNA片段整合位点对于每个事件是独特的。边界片段提供了确定限制性酶位点相对于整合的DNA的位置,以及评估DNA插入数的手段。

对含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆的多个世代完成的Southern印迹分析产生的数据提示,来自质粒pDAB9582的低拷贝的完整cry1Ac和cry1F PTU插入了大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆基因组中。

[0203] 表7:Southern印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。1.预期片段大小基于pDAB9582的质粒图。2.从这些分析大致地考虑观察到的片段大小,且其基于DIG标记的DNA分子量标志物II和MARK VII片段指示的大小。

DNA 探针	限制酶	样品	预期的片段大小 (bp) <sup>1</sup>	观察到的片段大 小 (bp) <sup>2</sup>
[0204]	<i>Cry1Ac</i>	<i>AseI</i>	pDAB9582	13476
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	>7286	~8500
	<i>Nsi I</i>	pDAB9582	15326	>15000
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	>9479	>10000
	<i>Not I+ApalI</i>	pDAB9582	4550	~4500
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	4550	~4500
[0205]	<i>Cry1F</i>	<i>NdeI</i>	pDAB9582	8071
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	>569	~7500
	<i>Nsi I</i>	pDAB9582	11044	11000
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	>9479	>10000
	<i>Hind III</i>	pDAB9582	7732	~7700
		Maverick	无	无
	<i>SpecR</i>	大豆事件 pDAB9582.816.15.1	7732	~7700
		pDAB9582	15320	~15000
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	无	无
[0206]	<i>trfA</i>	<i>NsiI</i>	pDAB9582	15320
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	无	无
	<i>oriREP</i>	<i>NdeI</i>	pDAB9582	5239
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB9582.816.15.1	无	无

[0206] 限制酶*AseI*和*NsiI*结合并切割质粒pDAB9582中的独特限制性位点。随后,选用这些酶来表征大豆事件pDAB9582.816.15.1中的cry1Ac基因插入物。预测在*AseI*和*NsiI*消化

后大于7286bp或大于9479bp的边界片段分别与探针杂交(表7)。使用AseI和NsiI消化时分别观察到约8500和大于10000bp的单一cry1Ac杂交条带。探针与此大小的条带的杂交提示了大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆基因组中cry1Ac基因的单一插入位点的存在。选用限制酶NotI和ApaLI实施双重消化,释放含有cry1Ac植物转录单元(PTU;启动子/基因/终止子)的片段(表7)。在NotI和ApaLI双重消化后用探针观察到预测的4550bp片段。用酶消化pDAB9582.816.15.1样品后进行探针杂交所得的结果表明,来自质粒pDAB9582的完整cry1Ac PTU插入了大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆基因组中。

[0207] 限制酶NdeI和NsiI结合并切割质粒pDAB9582中的限制性位点。随后,选用这些酶表征大豆事件pDAB9582.816.15.1中的cry1F基因插入物。预测在NdeI和NsiI消化后大于5569bp或大于9479bp的边界片段分别与探针杂交(表7)。在使用NdeI和NsiI时分别观察到约7500bp和大于10000bp的单一cry1F杂交条带。探针与此大小的条带的杂交提示了大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆基因组中cry1F基因的单一插入位点的存在。选用限制酶HindIII来释放含有cry1F植物转录单元(PTU;启动子/基因/终止子)的片段(表7)。在HindIII消化后用探针观察到预测的7732bp片段。用酶消化pDAB9582.816.15.1样品后进行探针杂交获得的结果表明,来自质粒pDAB9582的完整cry1F PTU插入了大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆基因组中。

[0208] 实施例4.6:主链序列的缺无

[0209] 还进行Southern印迹分析以确认大豆事件pDAB9582.816.15.1中壮观霉素抗性基因(specR)、Ori Rep元件和复制起始蛋白trfA(trf A元件)的存在。在Southern分析包括合适的阳性(pDAB9582加入Maverick基因组DNA中)和阴性(Maverick基因组DNA)对照时,预期没有与壮观霉素抗性、Ori Rep元件或trf A元件的特异性杂交。在NsiI消化和与specR特异性探针杂交后,在阳性对照样品(pDAB9582加入Maverick基因组DNA中)中观察到一条15320bp的预期大小条带。specR探针没有与阴性对照和大豆事件pDAB9582.816.15.1的样品杂交。类似地,在NsiI消化和与trfA探针杂交后,在阳性对照样品(加有pDAB9582的maverick)中检出一条15320bp的预期大小条带,但是阴性对照和大豆事件pDAB9582.816.15.1的样品无此条带。在NdeI消化和与OriRep特异性探针杂交后,在阳性对照样品(对Maverick基因组DNA添加pDAB9582)中检出另一条5329bp的预期大小条带,但是阴性对照和大豆事件pDAB9582.816.15.1的样品无此条带。这些数据指示了大豆事件pDAB9582.816.15.1中壮观霉素抗性基因、Ori Rep元件和复制起始蛋白trfA的缺乏。

[0210] 实施例5:农艺学和产率田间试验及除草剂耐受性

[0211] 进行重复的农艺学试验以比较大豆事件pDAB9582.816.15.1与无效等位基因系(null isolate)-Maverick的农艺学效率。田间试验的主要部分种植在遍及全美国的种植含大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆品种的地点。另外的田间试验在这些地点之外完成,选择这些地点是为了使含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆品种暴露于因在非优选的地点生长所致的潜在压力。由于一小部分田间试验中的环境变化,一些地点的研究未能继续。

[0212] 设计该实验作为每个地点具有两个重复的随机化完全区组设计。包括大豆事件pDAB9582.816.15.1在内共有8个入选者。每个地块由两行组成,行长12.5英尺,距离30英寸种植。在整个季节中,根据正常农业实践维持田间地块并且使其不受杂草影响。

[0213] 用于研究的种子在的过程中于波多黎各的冬季苗圃中生产。在大豆事件 pDAB9582.816.15.1 和 Maverick 的种子在同一苗圃中种植，并且以相似的方式处理，以最小化任何种源变异性 (seed source variability)。然后，将种子运回北美，并包装并配送至各个种植地点。在整季中，测量了多种农艺学特征。这些特征和当数据收集时的生长阶段总结在表8中。

[0214] 表8在田间试验中用于比较大豆事件pDAB9582.816.15.1与Maverick而测量的农艺学特征的列表

测量的特征	在进行测量时的生长阶段
<b>1. 萌发:</b> 成株数(Stand count)除以一米区段中播种的种子数目乘以 100。	基于早期成株数计算的
<b>2. 幼苗活力:</b> 百分比活力，其中 0% 代表地块所有植物死亡，100% 代表地块看上去非常健康。	V1 – V3
<b>3. 开花前天数:</b> 从播种起到地块中 50% 植物开始开花时的天数。	R1
<b>4. R2 时的成株数:</b> R2 生长阶段时行中的代表性一米区段中的植物数目。	R2
<b>5. 疾病发生率:</b> 地块中的疾病严重程度，按 0-100% 量级 (scale) 分级。	R6
<b>6. 昆虫损伤:</b> 地块中被昆虫损伤的植物组织的百分比。	R6
<b>7. 植物高度:</b> 每个地块中植物的以厘米计的平均高度，在落叶后从土壤表面至顶端测量。	R8
<b>8. 倒伏:</b> 在收获时的百分比倒伏，其中 0% = 无倒伏，而 100% = 地块中的所有植物平卧在地面上。	R8
<b>9. 成熟前的天数:</b> 从播种起到地块中 95% 豆荚达到其干燥(dry down)颜色时的天数。	R8
<b>10. 炸英(Shattering):</b> 每个地块炸英的豆荚百分比。	R8
<b>11. 产率:</b> 每英亩蒲式耳数，校正至 13% 含水量(moisture)。	R8
<b>12. 100 粒种子的重量:</b> 对于每个地块，数出 100 粒种子，并且以克计记录重量	R8

[0215]

[0216] 在生长季结束时，将来自全部地点的数据合并并进行跨地点分析 (across location analysis)。数据分析使用 JMP® Pro 9.0.3 (SAS, Cary, NC) 进行。分析使用混合模型，其中将入选者视为固定效应，而将地点、按入选者区分的地点，以及重复效应视为随机。该分析的最小二乘均值总结在表9中。对于测量到显著的进入效应的变量，随后使用 Student 氏 T 检验实施均值分离，在 Maverick 和 大豆事件 pDAB9582.816.15.1 间进行比较。用于测定显著性的概率水平设置为  $p=0.05$ 。

[0217] 表9. 来自比较大豆事件pDAB9582.816.15.1与Maverick的跨地点分析的最小二乘均值。连接不相同字母的水平在根据Student氏T检验的  $p=0.05$  是显著不同的。

[0218]

名称	大豆事件 pDAB9582.816.15.1	Maverick
萌发(%)	84 (A)	89 (A)
活力(V1-V3)	85 (A)	90 (A)
开花前天数(从种植起的天数)	44.9 (A)	43.0 (B)
R2 时的成株数(植物/m)	24 (A)	25 (A)
R6 时的疾病发生率 R6 (%)	2 (A)	2 (A)

[0219]

昆虫损伤 R6 (%)	6 (A)	7 (A)
高度 (cm)	110 (A)	114 (A)
成熟(种植后的天数)	123 (A)	122 (B)
倒伏(%)	24 (A)	21 (A)
炸荚(%)	0 (A)	0 (A)
产率(蒲式耳/英亩)	47.6 (A)	50.5 (A)
100 粒种子的重量(g)	12.3 (B)	13.2 (A)

[0220] 除了开花前天数、成熟和100粒种子的重量之外,测量的所有性状在大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick之间表现相当。大豆事件pDAB.816.15.1开花比Maverick晚约2天。两天的延迟对于生产者来说不是严重的延迟,也不会损害作物性能。当在地块中约50%的植物显示花朵打开时,认为地块在开花。在季末,大豆事件pDAB9582.816.15的成熟也比Maverick晚一天,但是该延迟不会导致可能会影响作物性能的显著农业学差异。类似地,大豆事件pDAB9582.816.15的100粒种子的重量与Maverick有统计学上的差异,但这不会导致在产率上有显著的降低。该结果表明大豆事件pDAB9582.816.15的发育可能与Maverick不同,但这些差异是微小的,没有处于商业生长的大豆的正常范围之外。

[0221] 为了测试大豆事件pDAB9582.816.15.1的除草剂耐受性,在波多黎各的Santa Isabel进行的一项效力试验中种植该事件。在每个苗圃中种植栽培种Maverick(其最初被转化为生成事件pDAB9582.816.15.1),并且作为对照入选实验。用于T<sub>3</sub>苗圃的种子来源于T<sub>2</sub>阶段的单植物选择,而用于T<sub>4</sub>苗圃的种子来源于T<sub>3</sub>阶段的单植物选择。每个世代测试该事件的4个谱系。将每个谱系播种在地块中,所述地块为4行宽、7.5英尺长。行间间隔是30英寸。在光照下种植地块约2.5周以补偿波多黎各的短昼长。对每个苗圃喷洒411g ae/ha比率的草胺膦。对照植物Maverick的一个地块喷洒相同比率的草胺膦,另一个地块不喷洒,用作事件的对照比较。大豆事件pDAB9582.816.15.1显示对于草胺膦除草剂施用的耐受性。与之对照的是,Maverick植物对于除草剂处理均不耐受。

#### [0222] 实施例6:大豆事件pDAB9582.816.15.1的杀虫活性的表征

[0223] 进行田间和温室评估以表征大豆事件pDAB9582.816.15.1中的Cry1Ac和Cry1F蛋白所提供的对抗大豆害虫的植物保护水平,所述大豆害虫包括下述鳞翅目昆虫,包括黎豆夜蛾(黎豆毛虫)、大豆夜蛾(大豆尺蠖)、草地夜蛾(秋粘虫)和烟芽夜蛾(烟青虫)。

[0224] 对约4周龄的植物进行温室试验。使用15株植物来评估大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick对照。对于每种测试的昆虫物种(黎豆夜蛾、大豆夜蛾和草地夜蛾),从每株植物切下3个叶盘,总共45个叶盘/植物/昆虫物种。将1.4cm直径的叶冲孔块置于2%水琼脂上的测试场中,让一只新生幼虫孳生,并用穿孔塑料盖密封。

[0225] 在孳生后对死亡率和叶消耗评级。对轻微触探无反应的幼虫认为是死亡的。放置在含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的植物材料上的昆虫的死亡率(草地夜蛾死亡率为86%、黎豆夜蛾死亡率为100%、大豆夜蛾死亡率为100%)明显高于放置在Maverick对照上的昆虫。表10通过对叶盘被昆虫所消耗的百分比的目测评分来评价叶损伤。从温室实验得到的结果显示,与Maverick对照植物相比,大豆事件pDAB9582.816.15.1对于黎豆夜蛾、大豆夜蛾和草地夜蛾孳生保持显著更低的叶损伤和更高的昆虫死亡率。

[0226] 如下所述进行田间生长的大豆事件pDAB9582.816.15.1植物的效率评估:从波多黎各Santa Isabel的增种苗圃地块收集叶样品,并将这些叶发送到印第安纳州的印第安纳

波利斯供进行生物测定。 $T_3$ 大豆事件pDAB9582.816.15.1植物的苗圃地块由排列成4行的约180个植物组成。每行长2.3m, 相隔间距76.2cm; 每行内植株个体相隔5.1cm。生物测定在一片完全展开的, 有三叶的主茎(mainstem)叶上进行, 其大致位于分生组织下4个节处。从10个独立的携带有事件pDAB9582.816.15.1的大豆植物和10个独立的“Maverick”植物切出三叶组织。将叶包装并转移至实验室。在实验室中, 从每个三出复叶冲孔出一个或两个3.33cm直径叶盘, 以提供总共16个叶盘。将每个叶盘置于2%琼脂上的测试场中, 使一只新生草地夜蛾幼虫孳生, 并用穿孔的塑料盖密封。将叶盘在受控的环境室中保持7天, 此时对死亡率和叶消耗分级。对轻微触探无反应的幼虫认为是死亡的。通过对叶冲孔块被昆虫所消耗的的百分比目测评分评估叶损伤。

[0227] 在孳生后对死亡率和叶消耗评级。对轻微触探无反应的幼虫认为是死亡的。放置在含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的植物材料上的昆虫的死亡率(草地夜蛾死亡率为68%)明显高于放置在Maverick对照上的昆虫(草地夜蛾死亡率为0%)。表10.通过对叶盘被昆虫消耗的百分比的视觉上评分来评价叶损伤。由该叶生物测定得到的结果显示, 与暴露于Maverick对照植物相比, 暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的草地夜蛾幼虫保持显著更低的叶损伤和昆虫存活率(也可以描述为更高的昆虫死亡率)。

[0228] 在第一田间试验(表10中的第一田间试验)中评估了大豆事件pDAB9582.16.15.1的效力。在2个重复的随机完全区块设计中, 播种含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的来自 $T_4$ 代的大豆种子, 以及未转化的大豆品种Maverick的种子。每个重复地块由2行构成, 行长2.3m, 分开0.76m的间隔。每行播种40粒种子, 种子行内间隔5.7cm。播种试验, 对一个重复喷洒411g ae/ha草胺膦除草剂, 而另一个重复没有喷洒, 结果仅未喷洒的Maverick植物复制存活用于生物测定。

[0229] 当大豆植物出于R2生长期时, 采集用于生物测定的叶。在采集叶用于生物测定之前的数天, 从在相同的植物上低于一个节的叶(也是更老的叶)上采取叶冲孔, 并使用与实施例2中描述的方法相似的ELISA方法分析Cry1Ac和Cry 1F蛋白的表达(表12)。切下完全展开的、显示无损伤或变色迹象、并且位于分生组织下4个节处的主茎三出复叶进行生物测定。从每个重复的15个植物的每一个上切下单片三出复叶。将叶保存在15°C并进行生物测定。切下每个三出复叶的小叶, 并从每个大豆事件pDAB9582.816.15.1小叶的中心切下单独的3.33cm直径圆盘, 从每个Maverick小叶上切下两个3.33cm直径圆盘。将这些叶盘分别单独地放置在32孔塑料生物测定托盘的标记的孔中; 每个孔含有琼脂薄层。将单独的新生大豆夜蛾幼虫、新生黎豆夜蛾幼虫或新生草地夜蛾幼虫放置在每个叶盘上。生物测定托盘用打孔以提供通气的粘性塑料片密封。对于每个物种, 使30只幼虫暴露于来自大豆事件pDAB9582.816.15.1的叶组织, 并使30只幼虫暴露于来自Maverick的叶组织。将容纳有被孳生的叶盘的塑料托盘保持在25°C以及40%相对湿度(RH)。7天之后, 评价幼虫为死亡(当利用锋利的探针刺激时没有移动), 发育障碍(与保持在Maverick叶上的幼虫相比体格更小), 或存活(体格正常并且对于刺激有响应)。

[0230] 在孳生后对死亡率进行评级。放置在含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的植物材料上的昆虫的死亡率(草地夜蛾死亡率为97%, 黎豆夜蛾死亡率为100%, 大豆夜蛾死亡率为100%)明显高于放置在Maverick对照上的昆虫的死亡率。表10.由该叶生物测定得到的结果显示, 暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的草地夜蛾、黎豆夜蛾和大豆夜蛾幼虫与暴

露于Maverick对照植物的草地夜蛾、黎豆夜蛾和大豆夜蛾幼虫相比,保持明显更低的昆虫存活率(也描述为更高的昆虫死亡率)。

[0231] 在另一个不同的田间试验中评估大豆事件pDAB9582.816.15.1的效率(表10中的第二田间试验)。在4个重复的随机完全区块设计中,播种来自T<sub>4</sub>代的含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆种子,以及未转化的大豆品种Maverick种子。每个重复地块由4行构成,行长6.1m,分开1.02m的间隔。每行播种160粒种子,行内种子间隔为3.8cm。在试验地块之间和周围播种额外的Maverick行以便吸引天然昆虫害虫种群。

[0232] 当大豆植物处于R2生长期时收集叶用于生物测定。当大豆植物处于R5生长期时从同一植物上收集叶用于另一生物测定。在为每个生物测定收集叶之前的数天,从在同一植物上低于一个节的叶上采取叶冲孔,并使用与实施例2中描述的方法相似的ELISA方法(表12)分析Cry 1Ac和Cry 1F蛋白的表达。切下完全展开的、显示无损伤或变色迹象、并且位于分生组织下4个节处的主茎三出复叶进行生物测定。从每个重复的15个植物的每一个上切下单片三出复叶;每个重复4片三出复叶用于大豆夜蛾的生物测定,每个重复4片三出复叶用于草地夜蛾的生物测定,每个重复4片三出复叶用于烟芽夜蛾的生物测定,以及每个重复3片三出复叶用于黎豆夜蛾的生物测定。切下每个片三出复叶的两片侧叶并放置在单独的、含有琼脂薄层的标记的培养皿中。在每片小叶上放置两只第二龄的大豆夜蛾、黎豆夜蛾、草地夜蛾或烟芽夜蛾幼虫。对于大豆夜蛾、黎豆夜蛾和烟芽夜蛾,将64只幼虫暴露于来自大豆事件pDAB9582.816.15.1以及Maverick植物的叶组织。对于黎豆夜蛾,将48只幼虫暴露于来自大豆事件pDAB9582.816.15.1以及Maverick植物的叶组织。将容纳有孳生小叶的培养皿加盖并保持在25°C和40% RH。4天之后,确定幼虫为死亡(当利用锋利的探针刺激时没有移动),濒死(幼虫响应刺激但是如果使其侧卧其不能恢复常态),发育障碍(与保持在Maverick叶上的幼虫相比体格更小),或存活(体格正常并且对于刺激有响应)。

[0233] 除了草地夜蛾和烟芽夜蛾之外,在R5阶段的生物测定步骤与在R2阶段使用的步骤相同,从每个三出复叶上切下所有的三个小叶,并且在每个小叶上放置单只第二龄幼虫。这导致48只草地夜蛾和烟芽夜蛾幼虫暴露于来自大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick的小叶。

[0234] 对于R2和R5叶生物测定均在孳生后评级死亡率。放置在含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的植物材料上的昆虫的死亡率(草地夜蛾R2叶生物测定死亡率为69%,R5叶生物测定为死亡率54%;黎豆夜蛾R2和R5叶生物测定死亡率均为100%,烟芽夜蛾R2叶生物测定死亡率为95%,对于R5叶生物测定死亡率为70%;大豆夜蛾R2叶生物测定死亡率为100%,R5叶生物测定死亡率为98%)明显高于放置在Maverick对照上的昆虫。表10。从该叶生物测定得到的结果显示,暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的草地夜蛾、黎豆夜蛾、大豆夜蛾和烟芽夜蛾幼虫与暴露于Maverick对照植物的草地夜蛾、黎豆夜蛾、大豆夜蛾和烟芽夜蛾幼虫相比保持明显更低的昆虫存活性(也称为更高的昆虫死亡率)。

[0235] 从在第二田间试验中生长的大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick大豆植物上收集大豆豆荚,并利用烟芽夜蛾幼虫对它们进行生物测定。从在每个重复地块中随机选择的6个植物的主茎上最高的两个豆荚切下。每组豆荚放置在塑料培养皿中,并且让单只第二龄烟芽夜蛾幼虫孳生。该试验的设计使得24个幼虫暴露于已经自大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick对照植物收获的一组豆荚。培养皿保持在与前述的对切下

的叶进行的生物测定相同的条件下。2天之后,使用前文针对叶生物测定所描述的步骤观察烟芽夜蛾幼虫的存活率。

[0236] 在孳生大豆豆荚之后评级死亡率。放置在含有大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆豆荚上的昆虫的死亡率(对于烟芽夜蛾大豆豆荚生物测定,50%的死亡率)明显高于放置在Maverick对照豆荚上的昆虫。表10。从在田间生长的大豆豆荚上的该测定得到的结果显示,暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的烟芽夜蛾幼虫与暴露于Maverick对照植物的烟芽夜蛾幼虫相比保持显著更低的昆虫存活率(也描述为更高的昆虫死亡率)。

[0237] 在田间用烟芽夜蛾卵孳生大豆事件pDAB9582.816.15.1和Maverick对照大豆植物的末端(具有两个至三个展开中的三出复叶和一束未成熟豆荚的最高部分)。将载有约20个来自烟芽夜蛾的卵的粗棉布段放置在每个重复地块内随机选择的5株植物(总共检测20株植物)的末端,并且用塑料包皮纸夹保持定位。末端套上布网袋,并且网袋的开口端用扎口带固定在主茎周围。在一组代表性网袋中每天检测卵的孵化。在所有的卵孵化后,计数附着于5株植物的每个网袋中的活烟芽夜蛾幼虫的数量。

[0238] 放置在大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆末端的活昆虫幼虫的平均数量(对于烟芽夜蛾大豆末端生物测定,0.00昆虫数量)明显低于放置在Maverick对照的末端的昆虫。表11。从该测定得到的结果显示,暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的烟芽夜蛾幼虫与暴露于Maverick对照植物的烟芽夜蛾幼虫相比保著更低的昆虫存活数量。

[0239] 在四周期间,每周一次在试验地块中计数天然大豆夜蛾幼虫。对每个地块的中间两行进行取样。在中间两行中随机选择的位置上放置一块91cm×91cm的白布。将行的挨着布的一条边的部分内的植物弯曲到布的上方,摇晃15次以让任何存在的昆虫掉落。对于在该布的相对边上的行进行同一程序。按照物种和大小区分来计数幼虫:小于6mm长的幼虫作为小幼虫计数,大于等于6mm长的幼虫作为大幼虫计数。在进行下一个测量之前从布上移走所有昆虫。将布移动至在中间两行之间的第二个随机选择的位置,并且重复取样程序,得到每个取样日期每个地块的两个子样品。

[0240] 在大豆事件pDAB9582.816.15.1的1.82m行上计数的昆虫的平均数量(对于大豆夜蛾为0.00昆虫数量)明显地低于在Maverick对照1.82m行上计数的昆虫的数量。表11。从该测定得到的结果显示,大豆事件pDAB9582.816.15.1的大豆夜蛾孳生显著低于暴露于Maverick对照植物的大豆夜蛾孳生。

[0241] 从这些重复实验得到的结果显示,对于所有测试的昆虫物种,暴露于大豆事件pDAB9582.816.15.1的鳞翅目幼虫与暴露于Maverick对照植物的幼虫相比保持显著更低的存活率。

[0242] 表10.在来自大豆事件pDAB9582.816.15.1与对照Maverick植物的大豆叶和豆荚材料上生物测定的鳞翅目昆虫死亡率计数的比较。

[0243]

试验	害虫物种和检测的阶段	检测	大豆事件 pDAB9582.816.15.1		Maverick	
			死亡幼虫数量	检测的总幼虫数	死亡幼虫数量	检测的总幼虫数
温室	黎豆夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	45	45	3	45
温室	大豆夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	45	45	3	45
温室	草地夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	39	45	0	45
Santa Isabel, PR	草地夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	11	16	0	16
第一田间试验	黎豆夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	30	30	3	30
	大豆夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	30	30	6	30

[0244]

第二田间试验	草地夜蛾 新生幼虫	叶 生物测定	29	30	2	30
	黎豆夜蛾 第二龄幼虫	R2叶 生物测定	48	48	0	48
	大豆夜蛾 第二龄幼虫	R2叶 生物测定	64	64	0	64
	草地夜蛾 第二龄幼虫	R2叶 生物测定	44	64	0	64
	烟芽夜蛾 第二龄幼虫	R2叶 生物测定	61	64	0	64
	黎豆夜蛾 第二龄幼虫	R5叶 生物测定	48	48	4	48
	大豆夜蛾 第二龄幼虫	R5叶 生物测定	63	64	0	64
	草地夜蛾 第二龄幼虫	R5叶 生物测定	26	48	1	48
	烟芽夜蛾 第二龄幼虫	R5叶 生物测定	34	48	3	48
	烟芽夜蛾 第二龄幼虫	豆荚 生物测定	12	24	4	24

[0245] 表11. 存在于大豆事件pDAB9582.816.15.1与对照Maverick植物上的活鳞翅目昆虫的平均数量的比较

地点	害虫物种和计数的阶段	检测	活幼虫的平均数量	
			大豆事件 pDAB9582.816.15.1	Maverick
[0246]	烟茅夜蛾幼虫	末端生物测定	每个末端 0.00	每个末端 3.75
	大豆夜蛾小+大幼虫	第一周田间计数	每行 1.82m 0.00	每行 1.82m 2.25
	大豆夜蛾小+大幼虫	第二周田间计数	每行 1.82m 0.50	每行 1.82m 6.25
	大豆夜蛾小+大幼虫	第三周田间计数	每行 1.82m 0.00	每行 1.82m 22.75
	大豆夜蛾小+大幼虫	第四周田间计数	每行 1.82m 0.00	每行 1.82m 4.00

[0247] 表12. 从用于昆虫生物测定的大豆事件pDAB9582.816.15.1植物材料分离的不同转基因蛋白的平均表达水平

田间试验	检测的植物阶段	检测的组织	从叶组织分离的蛋白质 ng/cm <sup>2</sup>			
			大豆事件 pDAB9582.816.15.1		Maverick	
			Cry 1Ac	Cry 1F	Cry 1Ac	Cry 1F
第一田间试验	R2	叶	6.8	52.9	0.0	0.0
第二田间试验	R2	叶	0.79	2.73	0.0	0.0
第二田间试验	R5	叶	0.39	2.28	0.0	0.0

[0249] 实施例7:大豆事件pDAB9582.816.15.1的预期序列

[0250] SEQ ID NO:14提供了大豆事件pDAB9582.816.15.1的预期序列。该序列含有5'基因组侧翼序列,pDAB9582的预期T-链插入物和3'基因组侧翼序列。就SEQ ID NO:14而言,残基1-1273是5'基因组侧翼序列,残基1274-13658是pDAB9582 T链插入物的残基,13659-13821是来自pDAB9582质粒的重排的残基,而残基13822-15170是3'侧翼序列。因此,相对于插入物5'端的接点序列或过渡存在于SEQ ID NO:14的残基1273-1274处。因此,相对于插入物3'端的接点序列或过渡存在于SEQ ID NO:14的残基13658-13659处。

[0251] 应当注意到,SEQ ID NO:14是大豆事件pDAB9582.816.15.1的预期的代表,该序列是通过SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、和pDAB9582的t-链比对组装而来的。大豆事件pDAB9582.816.15.1的t-链插入物的实际序列可能与SEQ ID NO:14略微偏离。在将T-链插入物引入植物细胞基因组中的转化过程中,插入物发生一些缺失或其它变化并不鲜见。此外,PCR扩增中可能发生误差,这可以导致微小的测序误差。例如,本文中列出的侧翼序列,是从大豆基因组DNA生成扩增子,然后对扩增子克隆并测序而确定的。鉴于从基因组DNA生成足以测序的扩增子必须进行多轮扩增,以此方式生成并测定的序列中的微小差异和次要偏差不是罕见的。本领域技术人员应当认可,并且应当注意,由于这类常见测序误差或偏差而需要的任何调整在本发明的范围内。因此,本文中提供的质粒序列的相关区段可以包含

一些次要变化。因此，包含与主题插入物序列具有一定范围的同一性的多核苷酸的植物在本公开的范围内。与SEQ ID N0:14序列的同一性可以是与本文中例示或描述的序列具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%序列同一性的多核苷酸序列。侧翼序列加插入物序列的序列可以参考保藏种子的序列来确认。因此，SEQ ID N0:14和大豆事件pDAB9582.816.15.1的实际T-链插入物之间可能发现一些差异。

[0252] 阐明并描述了本公开的原则，本领域技术人员应当显而易见的是，本公开可以在不偏离此类原则的情况下在重排和细节上修改。我们要求在所附权利要求书的精神和范围内的所有修改。

[0253] 本说明书中引用的所有出版物和公布的专利文件通过提及收入本文，其程度就像每篇单独的出版物或专利申请明确且单独指定通过提及并入一样。

[0254] 实施方案

[0255] 本申请包括如下实施方案：

[0256] 1. 一种控制昆虫的方法，其包括使昆虫暴露于抗昆虫大豆植物，所述大豆植物包含含有选自下组的序列的DNA：SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225以及SEQ ID N0:2的bp 75-275，所述序列能够诊断大豆事件9582.816.15.1的存在，从而控制昆虫。

[0257] 2. 实施方案1的方法，其中所述昆虫为大豆夜蛾(*Pseudoplusia includens*) (大豆尺蠖)。

[0258] 3. 实施方案1的方法，其中所述昆虫为黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis*) (黎豆毛虫)。

[0259] 4. 实施方案1的方法，其中所述昆虫为草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (秋粘虫)。

[0260] 5. 实施方案1的方法，其中所述昆虫为烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*) (烟青虫)。

[0261] 6. 一种控制大豆作物中杂草的方法，其包括向所述大豆作物施用草胺膦除草剂，所述大豆作物包括大豆植物，该大豆植物包含含有选自下组的序列的DNA：SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225、以及SEQ ID N0:2的bp 75-275，所述序列能够诊断大豆事件9582.816.15.1的存在。

[0262] 7. 一种分离的DNA序列，其包含选自下组的一个或多个序列：SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225以及SEQ ID N0:2的bp 75-275。

[0263] 8. 一种育种大豆植物的方法，其包括：

[0264] 使第一大豆植物与第二大豆植物杂交而产生第三大豆植物，所述第一大豆植物包含含有选自下组的一个或多个序列的DNA：SEQ ID N0:1的bp 1258-1288、SEQ ID N0:1的bp 1223-1323、SEQ ID N0:1的bp 1173-1373、SEQ ID N0:1的bp 1073-1473、SEQ ID N0:2的bp 160-190、SEQ ID N0:2的bp 125-225以及SEQ ID N0:2的bp 75-275，以及其互补序列；以及

对所述第三大豆植物测定包含选自下组的一个或多个序列的DNA的存在:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0265] 9.一种分离的DNA分子,其包括接点序列,该接点序列包含至少一个选自下组的序列:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0266] 10.一种大豆植物或其部分,其对于大豆夜蛾(*Pseudoplusia includens*) (大豆尺蠖)有抗性,并且包含具有至少一个选自下组的核苷酸序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0267] 11.实施方案10的植物的种子。

[0268] 12.一种来源于实施方案6的大豆植物或其部分的组合物,其中所述组合物是选自下组的商业产品:大豆粕、大豆粉、大豆蛋白质浓缩物和大豆油。

[0269] 13.一种控制大豆颗粒、种子、粕或粉中害虫的方法,其包括:在所述颗粒、种子、粕或粉中包含大豆事件9582.816.15.1,其表现为该颗粒、种子、粕或粉包含含有选自下组的序列的DNA:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0270] 14.一种大豆种子,该种子在其基因组中包含选自下组的DNA序列:SEQ ID NO:1的bp 1258-1288、SEQ ID NO:1的bp 1223-1323、SEQ ID NO:1的bp 1173-1373、SEQ ID NO:1的bp 1073-1473、SEQ ID NO:2的bp 160-190、SEQ ID NO:2的bp 125-225以及SEQ ID NO:2的bp 75-275,以及其互补序列。

[0271] 15.一种大豆植物,其由实施方案14的大豆种子种植而来。

[0272] 16.实施方案15的大豆植物的部分,其中所述部分选自花粉、胚珠、花、芽、根和叶,且所述部分包括所述大豆事件9582.816.15.1。

[0273] 17.一种来源于实施方案15的大豆植物或其部分的组合物,其中,所述组合物为选自下组的商业产品:大豆粕、大豆粉、和大豆油。

[0274] 18.一种转基因大豆植物,其包含与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的DNA序列。

[0275] 19.一种转基因大豆植物或其部分,其包含大豆事件9582.816.15.1,其中包括大豆事件9582.816.15.1的代表性大豆种子已经以保藏号PTA-12588保藏在美国典型培养物保藏中心。

- [0001] 序列表  
[0002] <110> 美国陶氏益农公司  
[0003] <120> 昆虫抗性和除草剂耐受性大豆事件pDAB9582.816.15.1  
[0004] <130> 70971  
[0005] <160> 14  
[0006] <170> PatentIn version 3.5  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 1577  
[0009] <212> DNA  
[0010] <213> 大豆(Glycine max)  
[0011] <400> 1  
[0012] atatcgatcc cggagggagt gagtagagag gaaatacact aacactggga tcgcacttct 60  
[0013] actccagggtt ccgataaaaca ataagtaaat aaaatactac tactttatca tagtttaatt 120  
[0014] aacaaaatta tatatactgg tataaaattt aatactttaa ataatcatgt gatTTTTat 180  
[0015] tatctaatta gtatTTTaat agttcatta tatattggtg aaaaatttaaa atatcaaata 240  
[0016] ttccatttat acgttattat aataatataa tattttaaat atacactata taaaaataaa 300  
[0017] atttatacaa ctgataattt attacattt tgtatctta taaaataat tagaaaaaga 360  
[0018] ataaatttaa attaaatattt ttaataaaat agaaagttgt gtgataactt tttttatagt 420  
[0019] gtaagaaaaa aggcaaatca aacaaagaag ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc 480  
[0020] atcagtaaca agcaagtcca acgagagacg atcaacccta gaaattatca tgccataatt 540  
[0021] tagcccaaac ttaacaagat aatttagtact cctattgcct tcttcgatg aatgcacaaa 600  
[0022] ttgaacactc aaatcttcct tcacaaagtc acgaatgctt ttcacaattt tgcataacaa 660  
[0023] tgatacactt gtggcggatg aattccagac acagaatattt aacatactcc aactcccaag 720  
[0024] caattcttaa gccatgcaac agtgtcaata actcagcctt aacaatattt gttgaaccaa 780  
[0025] tatcaccata gaaaccatattt atctaagacc cattaatgtt acgaaggcgc ccaccaaattc 840  
[0026] ttgcattcccc aagattcctt tagcaacttc catccacaaag ttatgaaaca ctgacatgtt 900  
[0027] tacggacatt ggacatgaca cggacacgta gatatctgtt atgttcaaaa tatagaacgt 960  
[0028] agtatacggtt ttgtgtcagt gtcagacact aacatggatg cgtatcagac accgaacacg 1020  
[0029] gtaagggatt ggagtatccg tgcttcatag tccacaagca aggatgattc aagaacttaa 1080  
[0030] gaaacttaaa gtaaaattat ttttgacat atatttagat taaaattttt tattgaggta 1140  
[0031] tatttagtact aattttttt tattaaattt tattttaaa cataattttt taataaaattt 1200  
[0032] tttggagat atatttagtac taaaagaaa ttagatctt ttttttggg gtttaagtc 1260  
[0033] ctgcgtcgtt ggaccagtca gcatcatcac accaaaagtt aggcccgaat agtttgaat 1320  
[0034] tagaaagctc gcaattgagg tctacaggcc aaattcgctc ttagccgtac aatattactc 1380  
[0035] accggatcct aaccgggtgt atcatggcc gcgattaaaa atctcaatta tatttggct 1440  
[0036] aatttagttt ggtattgagt aaaacaaattt cggcgccatg cccggcaag cggccgcaca 1500  
[0037] agtttgtaca aaaaagcagg ctccgcggtg actgactgaa aagttgtcg acctgcagg 1560  
[0038] caacggatca ggatatt 1577  
[0039] <210> 2  
[0040] <211> 1687  
[0041] <212> DNA

- [0042] <213> 大豆 (Glycine max)
- [0043] <400> 2
- [0044] gcacatagac acacacatca tctcatttat gcttgtaat aattgtcatt agattgtttt 60
- [0045] tatgcataca tgcactcgaa atcagccat tttagacaag tatcaaacgg atgtgacttc 120
- [0046] agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgatttgcg 180
- [0047] gtgggcagg ctctttca gaaagacagg cgccaaagg aaccaggat gaggtggct 240
- [0048] atggctctca gttccttgc gaagcgttg gtctaaggat cagaggtgtt agcggatga 300
- [0049] agcaaaaagtgc tccgattgca atctgggtgc cagtagctt aatacactag acccatgttgc 360
- [0050] gtggcttgca agtcgttata tcagtgttcc tgcttccttca aaaagtttga acgatattat 420
- [0051] tataaaagaga aagagtgttgc tggataatct aatgaggctg gaccacgttgc ttctcaagat 480
- [0052] ctaagcattc catatacccc attgaaagat atgaagaatt atgtcaccat gctccaagat 540
- [0053] ctattaaagc tactccagct aactagtatt tgaatcaggc ctcacaacat gtacttcaa 600
- [0054] ggtgtcccaa acgcgcacaa cattaccaca gtgcacaaaaa gatgtgaaag agttcctcat 660
- [0055] cgccaacccc acaacgatta caattcgcatt taggaaggac atgaatcattt ttcatgaaac 720
- [0056] tcttggtggg aagaacatttgc tgatctatct gccataagaa aaattcacgt tctcaagaag 780
- [0057] atgaataaaat atataacaaa taaaaatata ataatatcaa gttataaata aaatttctat 840
- [0058] ccctcatgtt tactcgcattt gttttttttt tttttttttt ttttacaata 900
- [0059] tttttgttt ctttttttaa tcgtcttaaa aagtcagccg gttttcctat atgtaaaaat 960
- [0060] gaactgatcc aacggcttagt ataaactctcc cacggtttgc catgtgatgg tctctcaccc 1020
- [0061] tagccaccgt cccgttacat agcccacaat agctgaagtc cgtcagaaaaa cttacaaaag 1080
- [0062] cggcgcgtttt caagggatac aagacatgca gcagccgttgc ctctaaaccc taaactaaac 1140
- [0063] taaaaccccta gccagttgtc ggtgatcacc atttgttaa aaccgtcatg gcgatgaaaaa 1200
- [0064] ctgcagaaga acacgaagtgc ggtatcttgc gtttcatcccgat ccaccccttgcg 1260
- [0065] gaattttaaa gcaaaggatctt cttcattttc tacattaaaa atcattatta ctttcctcac 1320
- [0066] tgcacccctt ttgtttatgc atgaagtgc ttattcaaca gtgtttttt agtgctgatt 1380
- [0067] caattgaata tgattcaggt attctgattt tattgttgc atgcgttgc gaaatggaca gagatggaaac 1440
- [0068] agttgttcaa ttgtcctcgat ttgtatcccccc tcaagaggatccatccgttccatccgt 1500
- [0069] gatcattgtat aaattgattt gtgtttttt tttttttttt tagttaactt tttttggct 1560
- [0070] tatttcagag ttttcaggaa aatggacca acacatccga caatgttgcgat agttatgcct 1620
- [0071] ctcagattga atcttcaag tctttgcgtt gggactcttgc tgctgttgc ttggaaagaat 1680
- [0072] ttattaa 1687
- [0073] <210> 3
- [0074] <211> 12381
- [0075] <212> DNA
- [0076] <213> 人工序列
- [0077] <220>
- [0078] <223> pDAB9582的质粒序列
- [0079] <400> 3
- [0080] agtcagcatc atcacaccaaa aagtttaggcc cgaatagttt gaaatttagaa agctcgcaat 60
- [0081] tgaggtctac aggccaaattt cgcttttagc cgtacaatatt tactcaccgg atcctaacc 120
- [0082] gtgtgatcat gggccgcgtat taaaatctc aattatattt ggtctaattt agtttggat 180
- [0083] tgagtaaaac aaattcggcgat ccattccccgg gcaagcggcc gcacaaggatttt gtacaaaaaaa 240

[0084] gcaggctccg cggtgactga ctgaaaagct tgcgacccg caggtaacg gatcaggata 300  
 [0085] ttcttggta agatgttcaa ctctatggag gtttgatga actgatgatc taggaccgga 360  
 [0086] taagttccct tcctcatagc gaacttattc aaagaatgtt ttgttatca ttcttggta 420  
 [0087] attgttatta atgaaaaaat attattggtc attggactga acacgagtgt taaatatgga 480  
 [0088] ccaggccccca aataagatcc attgatataat gaattaaata acaagaataa atcgagtcac 540  
 [0089] caaaccactt gcctttta acgagacttg ttcaccaact tgatcacaaa gtcattatcc 600  
 [0090] tatgcaaatac aataatcata caaaaatatac caataacact aaaaaattaa aagaaatgga 660  
 [0091] taatttcaca atatgttata cgataaaagaa gttactttc caagaaattc actgatttt 720  
 [0092] taagcccact tgcatttagat aaatggcaaa aaaaaacaaa aagggaaaaga aataaagcac 780  
 [0093] gaagaattct agaaaatacg aaatacgctt caatgcagt ggaccacgg ttcaattatt 840  
 [0094] gccaattttc agctccaccc tatatttaaa aaataaaaacg ataatgctaa aaaaatataa 900  
 [0095] atcgtaacga tcgttaaatac tcaacggctg gatcttatga cgaccgttag aaattgtgg 960  
 [0096] tgcgacgag tcagtaataa acggcgtcaa agtgggtgca gccggcacac acgagtcgt 1020  
 [0097] ttatcaact caaagcacaat atactttcc tcaacctaataa aataaggcaaa ttagccaaaa 1080  
 [0098] acaactttgc gtgtaaacaa cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag ctattgcttc 1140  
 [0099] accgccttag ctttctcggt acctagtcgt cctcgcttt tcttcttctt cttctataaa 1200  
 [0100] acaataccca aagcttcttc ttacacaattc agatttcaat ttctcaaaaat cttaaaaact 1260  
 [0101] ttctctcaat tctctctacc gtatcaagg taaatttctg tgcgttatc ttcttgggt tagattctgt 1320  
 [0102] tcttcgattt tggttcgtt cgatccaaat ttctatcgtt ttcttgggt tagattctgt 1380  
 [0103] taatcttgcgt tcgaagacga tttctgggt ttatcggtt gatcatct taattctcg 1440  
 [0104] ttagggtttc ataaatatca tccgattttgt tcaaataatt tgagtttgcgtt cgaataattt 1500  
 [0105] ctctcgatt tgcatttttctt atcttagatct ggtgttagtt tcttagtttgcgtt cgcgtcaat 1560  
 [0106] ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagagatctc catggagaac aatatccaga 1620  
 [0107] accagtgtgtt cccatacaat tgcctcaaca atcctgaagt tgagatcctc aacgaagaga 1680  
 [0108] ggagcactgg acgccttccc cttgacatct ccctccctt cacaagggtt ctttgcgt 1740  
 [0109] agtttggcc tgggtgggt gtggccttgc gcctcttgc cctcatctgg ggcttcatca 1800  
 [0110] ccccatctga ttggagccctc ttcttctcc agattgaaca attgatttgcgtt cagaggattt 1860  
 [0111] agacccttgcgt aaggaacaga gccatcacca cacttcgtgg ctttgcgtac agctatgaaa 1920  
 [0112] tctacattga agcactccgt gagtggaaag ccaatccaa caatgcgtaa ctccgtgaag 1980  
 [0113] atgtgaggat tcgccttgc aacacagatc acgctttgtat cacagccatc aacaatttca 2040  
 [0114] ccctcaccag ctgttgcgtt ctttgcgtt ctttgcgtt tcaagatgcgtt aacccatccact 2100  
 [0115] ttagcttgcgt tagggatgtt gtgccttgc gacaagggtt gggacttgcgtt atagccactg 2160  
 [0116] tcaacaatca ctacaacaga ctcatcaact tgattcatcg ctacacccaa cattgcgtt 2220  
 [0117] acacccatca tcaaggattt gagaacctca gaggcacca cactgccttca tggcaaggt 2280  
 [0118] tcaaccatgtt tagaaggatgtt ctcacactca ctgtgcgttgc catagttgcgtt ctcttccca 2340  
 [0119] actatgtatgt tcgcacccatccaa ccaatttgcgtt ccagctccaa acttacaagg gaaatctaca 2400  
 [0120] cccatccatgtt cattggggatc agcccttgcgtt ctgcgttgcgtt acccaatgggtt ttcaaccgtt 2460  
 [0121] ctgagtttgg tgcgttgcgtt cccatctca tggacttgcgtt gaactcccttgcgtt ttgtgcgtt 2520  
 [0122] ccgagactgtt taggtccaaactgtgtggg gaggccaccc tgcgttgcgtt cgcgttgcgtt 2580  
 [0123] ctggcaaccg catcaacttc ccatccatgtt gggtttccaa tgcgttgcgtt cgcgttgcgtt 2640  
 [0124] ttgcagatgtt ggacccaaagg ctttctaca gaacccatgttgcgtt agatccatgttgcgtt ttgtcagatgtt 2700  
 [0125] gaggcttggt caatccacac tatgttgcgtt gtttggggatc agtgcgttgcgtt cagcagactgtt 2760

[0126] gcaccaatca cacccgcaca ttcatggaaaca gcgccaccat tgacagcctt gatgagatcc 2820  
 [0127] cacctcaaga caacagcggc gcaccctgga acgactactc ccatgtgctc aatcatgtca 2880  
 [0128] cctttgtcgct ctggcctgggt gagatcagcg gttcagattc ttggagagca ccaatgttct 2940  
 [0129] catggaccac tcgcctgtcc acacccacaa acaccattga tccagagaga atcaccaggaa 3000  
 [0130] ttcccctgggt gaaggcacac acacttcagt ctggaaccac agttgtcaga gggcctgggt 3060  
 [0131] tcactgggtgg agacattctc agacgcacct ctggagggcc atttgcttac accattgtca 3120  
 [0132] acatcaatgg gcaacttccc cagcggttacc gtgccagaat ccgcgtatgct tccaccacta 3180  
 [0133] acttgagaat ctatgtcaca gttgctgggt aaaggatctt tgctggtcag ttcaacaaga 3240  
 [0134] caatggacac tggtgatcca ttgacattcc agtcattctc ctatgccacc atcaacactg 3300  
 [0135] cattcacctt tccaatgagc cagtcagact tcacagtggg tgccagatacc tttagctccg 3360  
 [0136] gcaatgaggt gtacattgtac cgctttgagt tgattccagt gactgccaca cttagggctg 3420  
 [0137] agtctgactt ggagcgtgtc cagaaggccg tgaatgctt cttcacctt tcaaattcaga 3480  
 [0138] ttgggctcaa gacagatgtg actgactacc atatagaccg tggttccat cttgttgagt 3540  
 [0139] gcctctctga tgagttctgc ttggatgaga agaaagagtt gtcagagaag gtcaaggc 3600  
 [0140] ccaagaggct ctctgatgag aggaacttgc ttcaagatcc caacttcaga gggatcaacc 3660  
 [0141] gtaatttggc tcgtggatgg agggatcaa ctgacataac cattcaagga ggtgacgatg 3720  
 [0142] tttcaaggaa gaactatgtc acactttgg ggaccttga tgagtgtac ccaacataacc 3780  
 [0143] ttaccagaa gatagacgaa agcaagctca aggccctacac aagataccag ttgagaggtt 3840  
 [0144] acattgagga ctctcaagac ctgtttttttt acctcatcag atacaacgacaaacatgaga 3900  
 [0145] cagtcaatgt gcctggact ggttcactct ggccacttgc agccccaaaccccattggca 3960  
 [0146] agtgtccccca tcactcacat cacttctcct tggacataga tggtggctgc actgacttga 4020  
 [0147] atgaggacct tgggtgttgg gtgtttca agatcaagac ccaagatggc catgcaagg 4080  
 [0148] tggcaatct tgagttttttt gaagagaaac cacttgggttgg agaagccctt gccagagtga 4140  
 [0149] agagggctga gaagaaatgg agggacaaga gagagaagtt ggagtggaa acaaacattg 4200  
 [0150] tgtacaaaga agccaaagaa tcagttgtatc ctgttttttgaactccaa tatgataggc 4260  
 [0151] tccaagctga caccaacata gcaatgattc atgctgcaga caaaagggtt cacagcattc 4320  
 [0152] gtgaaggcata cttccctgaa ctctcgtga ttccctgggtt caatgtgcataatgg 4380  
 [0153] agcttgaagg acgcatctt actgccttct cttgttatga tgcaaggaat gtcatcaaga 4440  
 [0154] atggtgactt caacaatggc ctccctgtt ggaatgttggaa agggcacgtg gatgttgaag 4500  
 [0155] agcagaacaa tcaccgcctt gtcctgttg tccctgagtg ggaagctgaa gtttcacaag 4560  
 [0156] aagttcgtgt ctggcctgggt cgtggctaca ttcttcgtgt gactgcttac aaagaaggct 4620  
 [0157] atggagaagg ttgtgtcacc atccacgaga tagagaacaa tactgttggaa ttgaagttca 4680  
 [0158] gcaactgtgt tgaggaagag gtctacccaa acaatactgt cacttgcaat gactacactg 4740  
 [0159] caactcaaga agagtatgag ggcacttaca cttctcgcaaa ccgtggctat gatggagcct 4800  
 [0160] atgagagcaa ctcatctgtc cctgttgcact atgcttcgcctt cttatgttgcata 4860  
 [0161] ctgtatggaa ggcgttgcataat cttgttggaa gcaacagagg ctatggggac tacacacccc 4920  
 [0162] tcccgctgg ctatgtgacc aaagagttgg agtactttcc tggaaactgac aagggtttgg 4980  
 [0163] ttgagatagg agaaactgaa ggcacattca tagttgactc tggatggctt ttgctcatgg 5040  
 [0164] aagagtgtgtt agtttagctta atcacctaga gctcggtcac cagcataatttttataatg 5100  
 [0165] tactaaatttta ctgtttttttttaaaatgcaattt ttgctttctc gggattttaa tatcaaataatc 5160  
 [0166] tatttagaaaa tacacaatat tttgttgcag gcttgctgga gaatgtatct gctatcataa 5220  
 [0167] aaatttacaaa aaaattttttttaat ttgcctcaat tatttttagga ttggatggatggaa ggacgcttaa 5280

[0168] attatttgtc gggtaactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata cgaaatattc 5340  
 [0169] gtagtactat cgataattt tttaaaatt cataagaaaa gcaaacgtt catgaattga 5400  
 [0170] tggaaacaata caaagacaga taaagccacg cacattdgg atattggccg agattactga 5460  
 [0171] atattgagta agatcacggg atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc 5520  
 [0172] agttgaaata ctcaaacccgc cccatatgca ggagcggatc attcattgtt tggttggtt 5580  
 [0173] ccttgccaa catggagtc caaggttgcg gccgcgcgc gaaaacaact ttgtatacaa 5640  
 [0174] aagttgccgc ggtgactgac tgaactaaac ccagaaggta attatccaag atgttagcatc 5700  
 [0175] aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg gaagtattat gtaagcttag caagaagcag 5760  
 [0176] atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt tcaaaaatga agaatgtaca gataacaagat 5820  
 [0177] cctatactgc cagaatacga agaagaatac gtagaaattt gaaaagaaga accaggcgaa 5880  
 [0178] gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac gacaacaatg aaaagaagaa gataaggtcg 5940  
 [0179] gtgattgtga aagagacata gaggacacat gtaaggtgga aaatgttaagg gcgaaagta 6000  
 [0180] accttatcac aaaggaatct tatccccac tacttattcct tttatatttt tccgtgtcat 6060  
 [0181] ttttgcctt gagtttcct atataaggaa ccaagttcg catttgtaa aacaagaaaa 6120  
 [0182] aatttgggt aagctatttt ctttgaagta ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa 6180  
 [0183] gttttagat ccaacaatgg acaacaatcc caacatcaac gagtcattc cttacaactg 6240  
 [0184] cctgagcaac cctgagggtt aggtgctggg tggagaacgg attgagactg gttacacacc 6300  
 [0185] tatcgacatc tcgttgcac ttacccaatt cctttgtca gagttcgtgc ccgggtctgg 6360  
 [0186] attcgtgctt ggacttgcg atatcattt gggaatctt ggtccctctc aatggacgc 6420  
 [0187] ctttcttgcgatc agatagagc agttaattaa ccaaagaata gaagaattcg ctaggaacca 6480  
 [0188] agccatctca aggttagaag gcctcagcaa cctttaccag attacgcag aatctttcg 6540  
 [0189] agagtggaa gcagacccga ccaatcctgc cttaaagagag gagatgcgca ttcaattcaa 6600  
 [0190] tgacatgaac agcgcgtcga cgaccgcaat tccgccttc gccgttcaga attaccaagt 6660  
 [0191] tcctcttta tccgtgtacg tgcaggctgc caacctgcac ttgtcggtgc tccgcgtatgt 6720  
 [0192] ctccgttgcgatc ggacaacggg gggcttga tgccgcaact atcaatagtc gttataatga 6780  
 [0193] tctgactagg cttattggca actataccga ttatgctgtt cgctggtaca acacgggtct 6840  
 [0194] cgaacgtgtc tggggaccgg attctagaga ttgggtcagg tacaaccagt tcaggcgaga 6900  
 [0195] gttgacacta actgtccttag acattgtcgc tctctttccc aactacgact ctaggcgcta 6960  
 [0196] cccaatccgt actgtgtcact aattgacccg gggaaatctac acaaaccagg tcctcgagaa 7020  
 [0197] ctgcgacggg agctttcgag gctcggctca gggcatagag agaagcatca ggtctccaca 7080  
 [0198] cctgatggac atattgaaca gtatcacat ctacaccat gcgcaccgcg gttattacta 7140  
 [0199] ctgggtcaggcatcagatca tggcatcacc cggtgggttc tctggaccag aattcacttt 7200  
 [0200] cccactttac gggactatgg gcaatgcagc tccacaacaa cgtattgttgc tcaactcgg 7260  
 [0201] tcagggcgttgc tatagaacct tgtccagcac tctatataagg agaccttca acatcggtcat 7320  
 [0202] caacaatcaa caattgtctg tgcttgcgg gacagaattt gcctatggaa cctcctcaaa 7380  
 [0203] tctgcccattcc gctgtctaca gaaagagcgg aacagttgtatg agctggatg agatccctcc 7440  
 [0204] acagaacaac aacgttccac ctaggcaagg gtttagccat cgccttagcc atgtgtccat 7500  
 [0205] gtccgttca ggcttagta atagcagcgt tagtacatc agagctccga tggctcttg 7560  
 [0206] gatacatcgt agtgcgtatgt ttaacaacat aattgcattc gatagcatta ctcagatccc 7620  
 [0207] agctgtcaag gggaaatttc tcttaatgg ttctgtcatt tcaggaccag gattcactgg 7680  
 [0208] aggccgacttg gttaggctga attttccgg caacaacatc cagaatagag ggtatattga 7740  
 [0209] agtgcggcatt cacttcccat cgacatctac cagatatcgt gttcgttgc ggtatgcctc 7800

[0210] tggtaaccctt attcacccca acgtcaattt gggtaattcc tccatctttt ccaatacagt 7860  
 [0211] accagcgaca gctacatcct tggataatct ccaatctagc gatttcggtt acttcgaaag 7920  
 [0212] tgccaaatgcc ttccacccctt cccttaggtaa catagtaggt gtttagaaatt tctccggaac 7980  
 [0213] cggccggagtg ataatcgacc gcttcgaatt cattcccggtt actgcaacgc tcgaggcaga 8040  
 [0214] gtctgacttg gaaagagcac agaaggcggt gaatgctctg ttcacttcgt ccaatcagat 8100  
 [0215] tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc gtttccaacc ttgttgagtg 8160  
 [0216] cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagttg tccgagaagg tcaaacatgc 8220  
 [0217] taagcgactt agtcatgtgac ggaacttgct tcaagatccc aactttcgac ggtcaacac 8280  
 [0218] gcaacttagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcacc attcaaggag gtgatgatgt 8340  
 [0219] gttcaaggag aactatgtta cgctttggg taccttgat gagtgctatc caacataacct 8400  
 [0220] gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca agataccagt tgagaggtt 8460  
 [0221] catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga tacaacgcca aacatgagac 8520  
 [0222] agtcaatgtg cctggacgg gttcactctg gccacttca gccccaagtc ccatcgccaa 8580  
 [0223] gtgtgcccat cactcacacc acttctcctt ggacatagac gttggctgta ccgacctgaa 8640  
 [0224] cgaagacctc ggtgtgtggg tggatctcaa gatcaagact caagatggcc atgccaggct 8700  
 [0225] aggcaatctg gagtttcttag aagagaaacc acttggatgga gaagccctcg ctagagtgaa 8760  
 [0226] gagggtctgag aagaagtggg gggacaagag agagaagttg gaatggaaaa caaacattgt 8820  
 [0227] gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgt aactctcagt atgataggct 8880  
 [0228] ccaagctgat accaacatag ctatgattca tgctgcagac aaacgcgttc atagcattcg 8940  
 [0229] ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtat tccgggtgtc aatgctgta tctttgaaga 9000  
 [0230] gttagaaggg cgcattttca ctgcattctc cttgttatgat gcgaggaatg tcatcaagaa 9060  
 [0231] tggtaacttc aacaatggcc tatcctgctg gaatgtgaaa gggcacgtatc atgttagaaga 9120  
 [0232] acagaacaat caccgcctg tcctgttgt tcctgagtgga gaagcagaag tttcacaaga 9180  
 [0233] agttcgtgtc tgcctggc gtggctacat tcttcgtt accgcgtaca aagaaggata 9240  
 [0234] cggagaaggt tgcgtcacca tacacgagat tgagaacaac accgcgcgac tgaagttcag 9300  
 [0235] caactgcgtc gaggaggaag tctacccaaa caacaccgtt acttgcaatg actacactgc 9360  
 [0236] gactcaagag gatgtatgagg gtacttacac ttctcgcaat cgaggatacg atggagcccta 9420  
 [0237] tgagagcaac tcttctgtac ccgcgtacta tgcatcagcc tatgaggaga aggcttacac 9480  
 [0238] cgatggacgt agggacaatc ttgcgaatc taacagaggc tatggggact acacaccgtt 9540  
 [0239] accagccggc tatgtcacca aagagttga gtactttca gaaaccgaca aggtttggat 9600  
 [0240] tgagattggg gaaacggaag gaacattcat tggatgatgc gtggagttac ttctgtatgg 9660  
 [0241] ggaatgagta gtttagctaa tcacccatgatc ctcgggttacc tatcaaaatc tatttagaaa 9720  
 [0242] tacacaatat tttgttgcag gcttgctgga gaatcgatct gctatcataa aaattacaaa 9780  
 [0243] aaaattttat ttgcctcaat tatttttagga ttggatggaa ggacgcttaa attatttgc 9840  
 [0244] gggtaactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata cggaaatattc gtagtactat 9900  
 [0245] cgataattta ttggaaaatt cataagaaaa gcaaaccgtt catgaattga tggaaacaata 9960  
 [0246] caaagacaga taaagccacg cacattnagg atattggccg agattactga atattgagta 10020  
 [0247] agatcacggc atttctgaca ggagcatgac ttcaattcag cccaaatggc agttgaaata 10080  
 [0248] ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggtt attcattgtt tggatgggtt cttttgcac 10140  
 [0249] catggagtc caaggttgcg gcccgcgc gacccaggtt tcttgatcaa agtgggttgcg 10200  
 [0250] gcccgttaat taaattttaa tgccccggcg tttaaacgcg gcccgttaat taaggccggc 10260  
 [0251] ctgcagcaaa cccagaaggt aattatccaa gatgttagcat caagaatcca atgtttacgg 10320

[0252] gaaaaactat ggaagtatta tgtaagctca gcaagaagca gatcaatatg cggcacatat 10380  
 [0253] gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agataacaaga tcctatactg ccagaatacg 10440  
 [0254] aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga agaaaaagaat cttgaagacg 10500  
 [0255] taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggc ggtgattgtg aaagagacat 10560  
 [0256] agaggacaca tgtaaggtgg aaaatgttag ggcggaaagt aaccttatca caaaggaatc 10620  
 [0257] ttatccccca ctacttattc ttttatattt ttccgtgtca ttttgccct tgagtttcc 10680  
 [0258] tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa aaatttggtg taagctattt 10740  
 [0259] tcttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgc agtttgtaga tctccatgtc 10800  
 [0260] tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggttt 10860  
 [0261] tgatatcggtt aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac ttttaggacag agccacaaac 10920  
 [0262] accacaagag tggattgtatg atctagagag gttgcaagat agataccctt gttgggttc 10980  
 [0263] tgagggtttag ggtgttgtgg ctggatttgc ttacgctggg cccttggagg ctaggaacgc 11040  
 [0264] ttacgattgg acagttgaga gtactgtta cgtgtcacat aggcatcaa gttgggcct 11100  
 [0265] aggatccaca ttgtacacac atttgctta gtctatggag ggcgaagggtt ttaagtctgt 11160  
 [0266] gtttgcgttt atagcccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttggata 11220  
 [0267] cacagcccg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgtgttgg 11280  
 [0268] ttttggcaa agggattttg agtgccagc tcctccaagg ccagtttaggc cagttaccca 11340  
 [0269] gatctgaggt accctgagct tgagcttgc agcttatgag cttagagctc ggatccacta 11400  
 [0270] gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc cttgactaga taggcgccca gatcgccgc 11460  
 [0271] aatagcttct tagcgccatc ccgggttgc cctatctgtg ttgaaatagt tgcgtggc 11520  
 [0272] aaggctctct ttcagaaaga caggcgccca aaggaaccca aggtgaggtg ggctatggct 11580  
 [0273] ctcatgttct tggaaagcg ctgggtctaa ggtgcagagg tggtagcggg atgaagcaa 11640  
 [0274] agtgtccgat tgtaacaaga tatgttgcattc ctacgttgcg atattaaagt atgtattcat 11700  
 [0275] cactaatata atcagtgtat tccaaatatgt actacgattt ccaatgtctt tattgtcgcc 11760  
 [0276] gtatgtatc ggcgtcacaa aataatcccc ggtgacttgc tttaatccca ggtgaaata 11820  
 [0277] atatgttatt ataatttttgc gatgttgc cgttatagga attgaagtgt gcttgcggc 11880  
 [0278] gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt atggatttca 11940  
 [0279] atttaaacac gtataacttgt aaagaatgtat atcttgcggaa aaatatagtt taaatattt 12000  
 [0280] ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt attgtatgca 12060  
 [0281] gtttaaattt agaaatattt caataactga ttatatcagc tggtagatgc 12120  
 [0282] aagactgagt gcgatattat ggtgtatcac atagcgccg gtttctgtt caccggtag 12180  
 [0283] gatccgttta aactcgaggc tagcgcatgc acatagacac acacatcatc tcattgtatgc 12240  
 [0284] ttggtaataa ttgtcattag attgtttta tgcataatgc cactgaaat cagccaaattt 12300  
 [0285] tagacaagta tcaaacggat gtgacttcag tacattaaaa acgtccgca 12360  
 [0286] agttgtctaa ggcgtcaattt g 12381  
 [0287] <210> 4  
 [0288] <211> 30  
 [0289] <212> DNA  
 [0290] <213> 人工序列  
 [0291] <220>  
 [0292] <223> 81615\_FW2引物  
 [0293] <400> 4

- [0294] ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc 30  
[0295] <210> 5  
[0296] <211> 27  
[0297] <212> DNA  
[0298] <213> 人工序列  
[0299] <220>  
[0300] <223> 81516\_RV1引物  
[0301] <400> 5  
[0302] gattcatgtc cttcctaattg cgaattt 27  
[0303] <210> 6  
[0304] <211> 25  
[0305] <212> DNA  
[0306] <213> 人工序列  
[0307] <220>  
[0308] <223> 81516\_RV2引物  
[0309] <400> 6  
[0310] aatttcacat ttaccccaact tgcgaa 25  
[0311] <210> 7  
[0312] <211> 28  
[0313] <212> DNA  
[0314] <213> 人工序列  
[0315] <220>  
[0316] <223> 81516\_RV3引物  
[0317] <400> 7  
[0318] ggagggtgcag tgaggaaggt aataatga 28  
[0319] <210> 8  
[0320] <211> 29  
[0321] <212> DNA  
[0322] <213> 人工序列  
[0323] <220>  
[0324] <223> 5'IREnd-01引物  
[0325] <400> 8  
[0326] cgagcttct aatttcaaac tattcgggc 29  
[0327] <210> 9  
[0328] <211> 30  
[0329] <212> DNA  
[0330] <213> 人工序列  
[0331] <220>  
[0332] <223> 5'IREnd-01引物  
[0333] <400> 9  
[0334] tccttagatca tcagttcata caaacctcca 30  
[0335] <210> 10

- [0336] <211> 29  
[0337] <212> DNA  
[0338] <213> 人工序列  
[0339] <220>  
[0340] <223> AtUbi10RV1引物  
[0341] <400> 10  
[0342] cggtcctaga tcatcagttc atacaaacc 29  
[0343] <210> 11  
[0344] <211> 28  
[0345] <212> DNA  
[0346] <213> 人工序列  
[0347] <220>  
[0348] <223> AtUbi10RV2引物  
[0349] <400> 11  
[0350] cactcggtt cagtccaatg accaataa 28  
[0351] <210> 12  
[0352] <211> 20  
[0353] <212> DNA  
[0354] <213> 人工序列  
[0355] <220>  
[0356] <223> 3'PATEnd05引物  
[0357] <400> 12  
[0358] gtcctccaa ggccagttag 20  
[0359] <210> 13  
[0360] <211> 20  
[0361] <212> DNA  
[0362] <213> 人工序列  
[0363] <220>  
[0364] <223> 3'PATEnd06引物  
[0365] <400> 13  
[0366] ccagttaggc cagttaccca 20  
[0367] <210> 14  
[0368] <211> 15170  
[0369] <212> DNA  
[0370] <213> 人工序列  
[0371] <220>  
[0372] <223> 大豆事件9582.814.19.1的预期序列  
[0373] <400> 14  
[0374] atatcgatcc cggagggagt gagtagagag gaaatacact aacactggta tcgcacttct 60  
[0375] actccaggtt ccgataaaaca ataagtaaat aaaatactac tactttatca tagtttaatt 120  
[0376] aacaaaatta tatatactgg tataaaattt aatactttaa ataatcatgt gatTTTTat 180  
[0377] tatctaatta gtatTTtaat agttcatta tatattggtg aaaaattaaaa atatcaaata 240

[0378] tttcatttat acgttattat aataatataa tattttaaat atacactata taaaaataa 300  
 [0379] atttatacaa cttgataatt attacattta tgtatctta taaaataat tagtaaaaga 360  
 [0380] ataaaatttaa attaaatatt ttaataaaat agaaagttgt gtgataactt ttttatagt 420  
 [0381] gtaagaaaaa aggcaaatca aacaaagaag ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc 480  
 [0382] atcagtaaca agcaagtcca acgagagacg atcaacccta gaaattatca tgccataatt 540  
 [0383] tagcccaaac ttaacaagat aatttagtact cctattgcct tcttcgatg aatgcacaaa 600  
 [0384] ttgaacactc aaatcttcct tcacaaagtc acgaatgcct ttcacaattt tgcatcacaa 660  
 [0385] tgatacactt gtggcggatg aattccagac acagaatatt aacatactcc aactcccaag 720  
 [0386] caattcttaa gccatgcaac agtgtcaata actcagcctt aacaatattt gttgaaccaa 780  
 [0387] tatcaccata gaaaccatat atctaagacc cattaatgtt acgaaggcgc ccaccaaattc 840  
 [0388] ttgcatgccc aagattcctt tagcaacttc catccacaag ttatgaaaca ctgacatgta 900  
 [0389] tacggacatt ggacatgaca cggacacgta gatatctgt atgtcaaaa tatagaacgt 960  
 [0390] agtataggtg ttgtgtcagt gtcagacact aacatggatg cgtatcagac accgaacacg 1020  
 [0391] gtaagggatt ggagtatccg tgcttcatalog tccacaagca aggatgattc aagaacttaa 1080  
 [0392] gaaacttaaa gtaaaattat ttttgacat atatttagtataaaattttt tattgaggta 1140  
 [0393] tatttagtact aattttttt tattaaattt tattttaaa cataattta taataaaattt 1200  
 [0394] tttggagat atatttagtac taaaagaaa ttagatctt ttttttggg gtttaaagtc 1260  
 [0395] ctgctgctt ggaccagtca gcatcatcac accaaaagtt aggcccgaat agtttgaat 1320  
 [0396] tagaaagctc gcaattgagg tctacaggcc aaattcgctc ttagccgtac aatattactc 1380  
 [0397] accggatcct aaccgggtgt atcatggcc gcgattaaaa atctcaatta tatttggct 1440  
 [0398] aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cggcgccatg cccggcaag cggccgcaca 1500  
 [0399] agtttgtaca aaaaagcagg ctcgcggtg actgactgaa aagttgtcg acctgcaggt 1560  
 [0400] caacggatca ggatattttt gtttaagatg ttgaactcta tggaggtttg tatgaactga 1620  
 [0401] tgatcttagga ccggataagt tcccttcatttcaatgcaact tattcaaaga atgtttgtg 1680  
 [0402] tattcatttctt gttacattgt tattaaatgaa aaaatattat tggtcattgg actgaacacg 1740  
 [0403] agtgttaaat atggaccagg cccaaataa gatccattga tatatgaatt aaataacaag 1800  
 [0404] aataaaatcga gtcaccaaac cacttgcctt ttttaacgag acttgttcac caacttgata 1860  
 [0405] caaaaagtcat tattcattgc aatcaataa tcatacaaaa atatccaata acactaaaaaa 1920  
 [0406] attaaaagaa atggataatt tcacaatatg ttatacgata aagaagttac tttccaaga 1980  
 [0407] aatttcactga ttttataagc ccacttgcatttgcataact tagataatg gcaaaaaaaa acaaaaaggaa 2040  
 [0408] aaagaaataa agcacgaaga attctagaaa atacgaaata cgcttcaatg cagtggacc 2100  
 [0409] cacggttcaa ttattgccaat ttttcagctc caccgtat ttaaaaaata aaacgataat 2160  
 [0410] gctaaaaaaaaa tataaatcgt aacgatcgat aatctcaac ggctggatct tatgacgacc 2220  
 [0411] gtttagaaattt gtttttttttgc acgagtcagt aataaacggc gtcaaagtgg ttgcagccgg 2280  
 [0412] cacacacgag tcgtgttttcaactcaaag cacaataact tttctcaac cttaaaaataa 2340  
 [0413] ggcaatttgc caaaaacaac tttgcgtgtaa aacaacgctc aatacacgtt tcattttatt 2400  
 [0414] attagcttatt gcttcaccgc cttagcttc tcgtgaccta gtcgtcctcg tctttcttc 2460  
 [0415] ttcttcttcttcaat acccaaagct tcttcttcac aattcagatt tcaatttctc 2520  
 [0416] aaaaatcttaa aaactttctc tcaattctctt ctaggtatc caaggtaat ttctgtgttc 2580  
 [0417] ctattctcttcaaaatcttcc gattttttgc tcgttcgatc ccaatttcgtt atatgttctt 2640  
 [0418] tggtttagat tctgttaatc ttagatcgaa gacgattttc tgggtttgat cgttagat 2700  
 [0419] catcttaattt ctcgatttgc gtttcataaa tatcatccga tttttcaaa taatttgat 2760

[0420] tttgtcgaaat aattacttctt cgattttgtga tttcttatcta gatctgggtg tagtttcttag 2820  
 [0421] ttgtgcgat cgaatttgc gattaatctg agttttctg attaacagag atctccatgg 2880  
 [0422] agaacaatat ccagaaccag tgtgtcccat acaattgcct caacaatcct gaagttgaga 2940  
 [0423] tcctcaacga agagaggagc actggacgcc ttccccttga catctccctc tccctcacaa 3000  
 [0424] gtttccttt gtctgagttt gttcctggtg tgggtgtggc ctggcctc tttgacactca 3060  
 [0425] tctggggctt catcacccca tctgattgga gccttctc tctccagatt gaacaattga 3120  
 [0426] ttgagcagag gattgagacc ctgaaagga acagagccat caccacactt cgtggccttg 3180  
 [0427] ctgacagcta tgaaatctac attgaagcac tccgtgagt ggaagccaat cccacaatg 3240  
 [0428] ctcaactccg tgaagatgtg aggattcgct ttgccaacac agatgacgct ttgatcacag 3300  
 [0429] ccatcaacaa tttcaccctc accagcttt agatccctt gctctcagtc tatgttcaag 3360  
 [0430] ctgcaaacctt ccacttgagc ttgcttaggg atgctgtgc ctggacaa gttggggac 3420  
 [0431] ttgacatagc cactgtcaac aatcactaca acagactcat caacttgatt catcgctaca 3480  
 [0432] ccaaacattt cttggacacc tacaatcaag gattggagaa cctcagaggc accaacaactc 3540  
 [0433] gccaatggc aaggttcaac cagtttagaa gggatctcac actcaactgt ttgacatag 3600  
 [0434] ttgctctttt ccccaactat gatgtcgca cctaccata tcaaaccagc tcccaactta 3660  
 [0435] caagggaaat ctacacctcc tcagtcattt aggacagccc agttctgcc aacataccca 3720  
 [0436] atggtttcaa ccgtgctgag tttgggtgtca gaccacccca tctcatggac ttcatgaact 3780  
 [0437] ctttgttgt gactgccgag actgttaggt cccaaactgt gtggggaggc cacctgttta 3840  
 [0438] gctcccgcaa caccgctggc aaccgcatca acttcccatc ctatggggtt ttcaatcctg 3900  
 [0439] gtggagccat ctggattgca gatgaggacc caaggcctt ctacagaacc ttgtcagatc 3960  
 [0440] ctgtctttgt cagaggaggc tttggcaatc cacactatgt tcttggtttt agggagttgg 4020  
 [0441] ctttcagca gactggcacc aatcacaccc gcacatttag aaacagcggc accattgaca 4080  
 [0442] gccttgatga gatcccacca caagacaaca gcggagcacc ctggAACGAC tactccatg 4140  
 [0443] tgctcaatca tgtaatccctt gtgcgctggc ctggtgagat cagcggttca gatttttgg 4200  
 [0444] gagcaccaat gttctcatgg acccatcgct ctggccacacc cacaacaccatttgc 4260  
 [0445] agagaatcac ccagattccc ttggtaagg cacacacact tcagtcgtt accacagttg 4320  
 [0446] tcagaggggcc tgggttcaact ggtggagaca ttctcagacg caccctgttta gggccatttt 4380  
 [0447] ctacaccat tgtcaacatc aatggcaac ttccccagcg ttaccgtgcc agaatccgt 4440  
 [0448] atgcttccac cactaacttg agaatctatg tcacagttgc tggtgaaagg atctttgtt 4500  
 [0449] gtcagttcaa caagacaatg gacactggtg atccatttgc attccagtca ttctcctatg 4560  
 [0450] ccaccatcaa cactgcattt acctttccaa tgagccagtc cagttcaca gtgggtgcag 4620  
 [0451] atacccatcg ctccggcaat gaggtgtaca ttgaccgtt tgagggtt ccagtgtactg 4680  
 [0452] ccacacttga ggctgagttt gacttggagc gtgctcagaa ggccgtgaat gctctttca 4740  
 [0453] cctcttcaaa tcagattggg ctcaagacag atgtgactga ctaccatata gaccgtgttt 4800  
 [0454] ccaatcttgt tgagtgcctc tctgtatgat tctgtttttga tgagaagaaa gagttgtcag 4860  
 [0455] agaaggtcaa gcacgccaag aggctcttg atgagaggaa ctgtttcaa gatcccaact 4920  
 [0456] tcagagggtt caaccgtcaa ttggatcgat gatggagggg atcaactgac ataaccattt 4980  
 [0457] aaggaggtga cgatgtttc aaggagaact atgtcacact ctggggacc ttgtatgatg 5040  
 [0458] gctacccaaac ataccttac cagaagatag acgaaagcaa gctcaaggcc tacacaagat 5100  
 [0459] accagttgag aggttacatt gaggactctc aagaccttga aatctacctc atcagatata 5160  
 [0460] acgccaaaca tgagacagtc aatgtgcctt ggactgggtt actctggcca ctggcc 5220  
 [0461] caagccccat tggcaagtgt gcccattactt cacatcaattt ctccttggac atagatgtt 5280

[0462] gctgcactga cttgaatgag gaccttgggt tgggtgtat cttcaagatc aagacccaag 5340  
 [0463] atggccatgc aagggttggc aatcttgagt ttcttgaaga gaaaccactt gttggagaag 5400  
 [0464] cccttgcagc agtgaagagg gctgagaaga aatggaggga caagagagag aagttggagt 5460  
 [0465] gggaaaacaaa cattgtgtac aaagaagcca aagaatcagt tgatctttg ttgtgaact 5520  
 [0466] cccaaatatga taggctccaa gctgacacca acatagcaat gattcatgct gcagacaaaa 5580  
 [0467] gggttcacag cattcgtgaa gcataccttc ctgaactctc agtGattcct ggggtcaatg 5640  
 [0468] ctgcaatctt tgaagagctt gaaggacgca tcttcactgc cttcccttg tatgtgcaa 5700  
 [0469] ggaatgtcat caagaatggt gacttcaaca atggccttc ctgctggaat gtgaaaggc 5760  
 [0470] acgtggatgt tgaagagcag aacaatcacc gctctgtcct tgggtccct gagtggaaag 5820  
 [0471] ctgaagtttca acaagaagtt cgtgtctgcc ctggcggtgg ctacattttt cgtgtgactg 5880  
 [0472] cttaaaaaaaga aggctatgga gaaggttgg tcaccatcca cgagatagag aacaatactg 5940  
 [0473] atgaattgaa gttcagcaac tgtgttgagg aagaggtcta cccaaacaat actgtcaatt 6000  
 [0474] gcaatgacta cactgcaact caagaagagt atgagggcac ttacacttct cgcaaccgtg 6060  
 [0475] gctatgatgg agcctatgag agcaactcat ctgtgcctgc tgactatgct tcagcctatg 6120  
 [0476] aagagaaggc atacactgat ggaaggcgtg acaatcctt tgaaagcaac agaggctatg 6180  
 [0477] gggactacac acccctccca gctggctatg tgaccaaaga gttggagtac ttccctgaaa 6240  
 [0478] ctgacaagggt ttggatttagt ataggagaaa ctgaaggcac attcatagtt gactctgtgg 6300  
 [0479] agctttgct catggaagag tgagtagtt gcttaatcac cttagagctg gtcaccagca 6360  
 [0480] taattttat taatgtacta aattactgat ttgttaaatg caatttgct ttctcggtt 6420  
 [0481] ttaatatca aaatcttattt agaaaatacac aatattttgt tgcaggctt ctggagaatc 6480  
 [0482] gatctgctat cataaaaaattt aaaaaaaaaat tttatggcc tcaatttattt taggattgg 6540  
 [0483] attaaggacg cttaaatttt ttgtcggtc actacgcac atttgattt agaagatcag 6600  
 [0484] cgatacgaaa tattcgttagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa 6660  
 [0485] cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaaag ccacgcacat ttaggatatt 6720  
 [0486] gcccggatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa 6780  
 [0487] ttccggccaa atggcagttt aaatactcaa accggccccat atgcaggagc ggatcattca 6840  
 [0488] ttgtttgtt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaaagg ttgcggccgc gcgccgaaaa 6900  
 [0489] caactttgtt tacaaaagtt gccgcggta ctgactgaac taaacccaga aggttaattat 6960  
 [0490] ccaagatgtt gcatcaagaa tccaatgttt acggggaaaaa ctatggaatg attatgttaag 7020  
 [0491] ctcagcaaga agcagatcaa tatgcggcac atatgcaccc tatgttcaaa aatgaagaat 7080  
 [0492] gtacagatac aagatcctat actgccagaa tacgaagaag aatacgtaga aattgaaaaaa 7140  
 [0493] gaagaaccag gcgaagaaaaa gaatcttggaa gacgtaagca ctgacgcacaa caatgaaaag 7200  
 [0494] aagaagataa ggtcggtgat tgtgaaagag acatagagga cacatgttaag gtggaaaatg 7260  
 [0495] taagggcgga aagtaacccat atcacaaagg aatcttatacc cccactactt atcctttat 7320  
 [0496] attttccgt gtcatttttgc cccttggat ttccctataa aggaaccaag ttccggcattt 7380  
 [0497] gtgaaaacaa gaaaaaattt ggtgtaagct attttcttggaa aagtactgag gatacaactt 7440  
 [0498] cagagaaaattt tgtaagtttgc tagatccaaac aatggacaac aatcccaaca tcaacgcgtg 7500  
 [0499] cattccttac aactgcctga gcaaccctga ggttggatgtt ctgggtggag aacggattga 7560  
 [0500] gactggttac acacccatcg acatctcgat gtcacttacc caattccctt tgcagatgtt 7620  
 [0501] cgtccccgggt gctggattcg tgcttggact tgcgatatac atttggggaa tctttggcc 7680  
 [0502] ctctcaatgg gacgccttc ttgtacagat agagcagtttta attaaccaaa gaatagaaga 7740  
 [0503] attcgcttggaa aaccaagcca tctcaaggatggaa agaaggccctc agcaaccctt accagattt 7800

[0504] cgcaaatct ttgcagagt gggaaacaga cccgaccaat cctgcctaa gagaggagat 7860  
 [0505] ggcattcaa ttcaatgaca tgaacagcgc gctgacgacc gcaattccgc tcttcggcg 7920  
 [0506] tcagaattac caagttccctc ttttatccgt gtacgtgcag gctccaaacc tgcacttgtc 7980  
 [0507] ggtgctccgc gatgtctccg tggtcgaca acgggtgggc tttgatgccg caactatcaa 8040  
 [0508] tagtcgttat aatgatctga ctaggcttat tggcaactat accgattatg ctgttcgctg 8100  
 [0509] gtacaacacg ggtctgaac gtgtctggg accggattct agagattggg tcaggtacaa 8160  
 [0510] ccagttcagg cgagagtta cactaactgt cctagacatt gtcgctctt ttcccaacta 8220  
 [0511] cgactctagg cgctacccaa tccgtactgt gtcacaattt accggggaaa tctacacaaa 8280  
 [0512] cccagtcctc gagaacttcg acggtagctt tcgaggctcg gctcaggca tagagagaag 8340  
 [0513] catcaggctt ccacacctga tggacatatt gaacagtatc acgatctaca ccgatgcgca 8400  
 [0514] ccgcggttat tactacttgtt cagggcatca gatcatggca tcaccgttg gttctctgg 8460  
 [0515] accagaattt actttccac tttacggac tatggcaat gcagctccac aacaacgtat 8520  
 [0516] tggctcaa ctgggtcagg gcgtgtatag aaccttgcctt agcactctat ataggagacc 8580  
 [0517] tttcaacatc ggcataaca atcaacaatt gtctgtgtt gacggacag aatttgccta 8640  
 [0518] tggAACCTCC tcaaattctgc catccgtgtt ctacagaaag agcggaaacag ttgatagctt 8700  
 [0519] ggatgagatc cctccacaga acaacaacgt tccacctagg caagggttta gccatgcct 8760  
 [0520] tagccatgtt tccatgttcc gttcaggctt tagtaatagc agcgttagta tcattcagagc 8820  
 [0521] tccgatgttcc tcttggatac atcgtgtgc tggtttaac aacataattt catccgtat 8880  
 [0522] cattactcag atcccagctg tcaagggaa ctttctttt aatggttctg tcatttcagg 8940  
 [0523] accaggattt actggaggcg acttgggttag gctgaattct tccggcaaca acatccagaa 9000  
 [0524] tagagggat attgaagtgc ccattcaattt cccatcgaca tctaccagat atcgtgttgc 9060  
 [0525] tggtaaggtt gcctctgttta cccctattca cctcaacgtc aattgggttta attcctccat 9120  
 [0526] cttttccaaat acagtaccag cgacagctac atccttggat aatctccaaat ctacgttgc 9180  
 [0527] cggttacttc gaaagtgcac atgccttac ctcttccttta ggtaacatag taggtgttag 9240  
 [0528] aaatttctcc ggaaccggcg gagtgataat cgaccgttc gaattcattt ccgttactgc 9300  
 [0529] aacgctcgag gcagagtctg acttggaaag agcacagaag gcggtgaatg ctctgttca 9360  
 [0530] ttctgtccaaat cagattgggc tcaagacaga tgtgactgac tatcacatcg atcgcgtttc 9420  
 [0531] caaccttgtt gagtgccctt ctgtatggat ctgtttggat gagaagaagg agttgtccga 9480  
 [0532] gaaggtcaaa catgctaaggc gacttagtga tgagcggaaat ttgcttcaag atcccaactt 9540  
 [0533] tcgcgggatc aacaggcaac tagatgtgg atggaggggaa agtacggaca tcaccattca 9600  
 [0534] aggaggtgat gatgtgttca aggagaacta tggtacgctc ttgggtacct ttgatgagtg 9660  
 [0535] ctatccaaca tacatgttacc agaagataga tgaatcgaaa ctcaaaacgc acacaagata 9720  
 [0536] ccagttgaga gtttacatcg aggacagtca agaccttggat atctacctca tcagatacaa 9780  
 [0537] cggccaaacat gagacagtca atgtgcctgg gacgggttca ctctggccac tttcagcccc 9840  
 [0538] aagtcccatc ggcaagtgtt cccatcaatc acaccacttc tcctggaca tagacgttgg 9900  
 [0539] ctgtaccgac ctgaacgaag acctcggtgt gtgggtgatc ttcaagatca agactcaaga 9960  
 [0540] tggccatgcc aggcttaggca atctggatgtt tcttagaagatg aaaccacttgc ttggagaagg 10020  
 [0541] cctcgctaga gtgaagaggg ctgagaagaa gtggaggac aagagagaga agttggaaatg 10080  
 [0542] gggaaacaaac attgtgtaca aagaagccaa agaaagcgat gacgctctgt ttgtgaactc 10140  
 [0543] tcgtatgtat aggctccaaat ctgatccaaat catagctatg attcatgctg cagacaaacg 10200  
 [0544] cgttcatagc attcgggaag cttaccttcc tgaacttagc gtgattccgg gtgtcaatgc 10260  
 [0545] tgctatctttt gaagagttttag aaggcgcat cttcaactgca ttctccttgc atgatgcgag 10320

[0546] gaatgtcatc aagaatggtg acttcaacaa tggcctatcc tgctggaatg tgaaagggca 10380  
 [0547] ctagatgtta gaagaacaga acaatcacccg ctctgtcctt gttttcctg agtgggaagc 10440  
 [0548] agaagttca caagaagttc gtgtctgtcc tggcgctggc tacattcttc gtgttaccgc 10500  
 [0549] gtacaaagaa ggatacggag aagggtgcgt caccatacac gagattgaga acaacaccga 10560  
 [0550] cgagctgaag tttagcaact gcgtcgagga ggaagtctac ccaaacaaca ccgttaacttg 10620  
 [0551] caatgactac actgcgactc aagaggagta tgagggtact tacacttctc gcaatcgagg 10680  
 [0552] atacgatgga gcctatgaga gcaactcttc tgtacccgct gactatgcatt cagcctatga 10740  
 [0553] ggagaaggct tacaccgatg gacgtaggaa caatccttgc gaatctaaca gaggctatgg 10800  
 [0554] ggactacaca ccgttaccag ccggctatgt caccaaaagag ttagagtact ttccagaaac 10860  
 [0555] cgacaagggtt tggattgaga ttggagaaac ggaaggaaca ttcatgttg atagcgtgga 10920  
 [0556] gttacttctg atggaggaat gagtagttt cttaatcacc tagagctcggtt taccttatca 10980  
 [0557] aaatctattt agaaatacac aatattttgt tgccaggctt ctggagaatc gatctgctat 11040  
 [0558] cataaaaattt acaaaaaaaaat ttatggcc tcaattattt taggattgg attaaggacg 11100  
 [0559] cttaaattat ttgtcgggtc actacgcattc attgtgattt agaagatcag cgatacgaaa 11160  
 [0560] tattcgttgtt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa cgttacatga 11220  
 [0561] attgatgaaa caatacaaag acagataaaag ccacgcacat tttagatattt ggccgagatt 11280  
 [0562] actgaatattt gagtaagatc acgaaatttgc tgacaggagc atgtttcaa ttcagccaa 11340  
 [0563] atggcagttt aaataactcaa accggcccat atgcaggagc ggatcattca ttgtttgtt 11400  
 [0564] ggttgcctt gccaacatgg gagtccaagg ttgcggccgc ggcggaccc agcttcttgc 11460  
 [0565] tacaaagtgg ttgcggccgc ttaattaaat ttaaatgccc gggcgttaa acgcggccgc 11520  
 [0566] ttaattaagg ccggcctgca gcaaaccac aaggttaattt tccaagatgtt agcatcaaga 11580  
 [0567] atccaatgtt tacggaaaaa actatggaaat tattatgtt gctcagcaag aagcagatca 11640  
 [0568] atatgcggca catatgcac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 11700  
 [0569] tactgccaga atacgaagaa gaatacgtt aaattgaaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 11760  
 [0570] agaatcttgcg acatgcgaca acaatgaaaaa gaagaagata aggtcggtga 11820  
 [0571] ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtt ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 11880  
 [0572] tatcacaagaa gaatcttatac cccactact tatcctttt tattttccg tgcattttt 11940  
 [0573] gcccttgagt ttccatat aaggaaccaa gttcggcatt tgcggaaaca agaaaaaaattt 12000  
 [0574] tgggtgttgc tattttttttaa gaagtacttgc ggatacaact tcagagaaat ttgttaagttt 12060  
 [0575] gtatgttgc atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga 12120  
 [0576] tatggccgcg gtttgtatac tcgttaacca ttacatttgcg acgtctacag tgaacttttgc 12180  
 [0577] gacagagccaa caaacaccac aagagtggat tgcgtatca gagaggttgc aagatagata 12240  
 [0578] cccttggttgc gttgttgcg tttgggtgt tgcggctgtt attgttgcg ctggccctg 12300  
 [0579] gaaggctagg aacgcttacg attggacagt tgagagtact gttacgtgt cacataggca 12360  
 [0580] tcaaagggtt ggccttaggtt ccacatttgc cacacatttgc ttttttttttgc tggaggcgc 12420  
 [0581] aggttttaag tctgtggttt ctgttatagg cttccaaac gatccatctg ttaggttgc 12480  
 [0582] tgaggcttttgc ggatcacacag cccgggttgc attgcgcgc gctggatatac agcatgggg 12540  
 [0583] atggcatgtat gttggtttttgc ggcaaaaggaa ttttggatgttgc ccagcttgc caaggccatg 12600  
 [0584] tagggcagttt acccagatctt gaggtaaccctt gagcttgcg ttttttttttgc atgagcttgc 12660  
 [0585] agctcgatc cactagtaac ggccgcctgttgc gttgttgc tgcggcccttgc ctgtgttgc 12720  
 [0586] gcccagatcg gcccggatag ctttttttttgc ccatccccggg ttgttgc ttttttttttgc 12780  
 [0587] atagttgcgg tggcaaggc tcttttttttgc aaagacaggc ggcggccatgc acccaagggttgc 12840



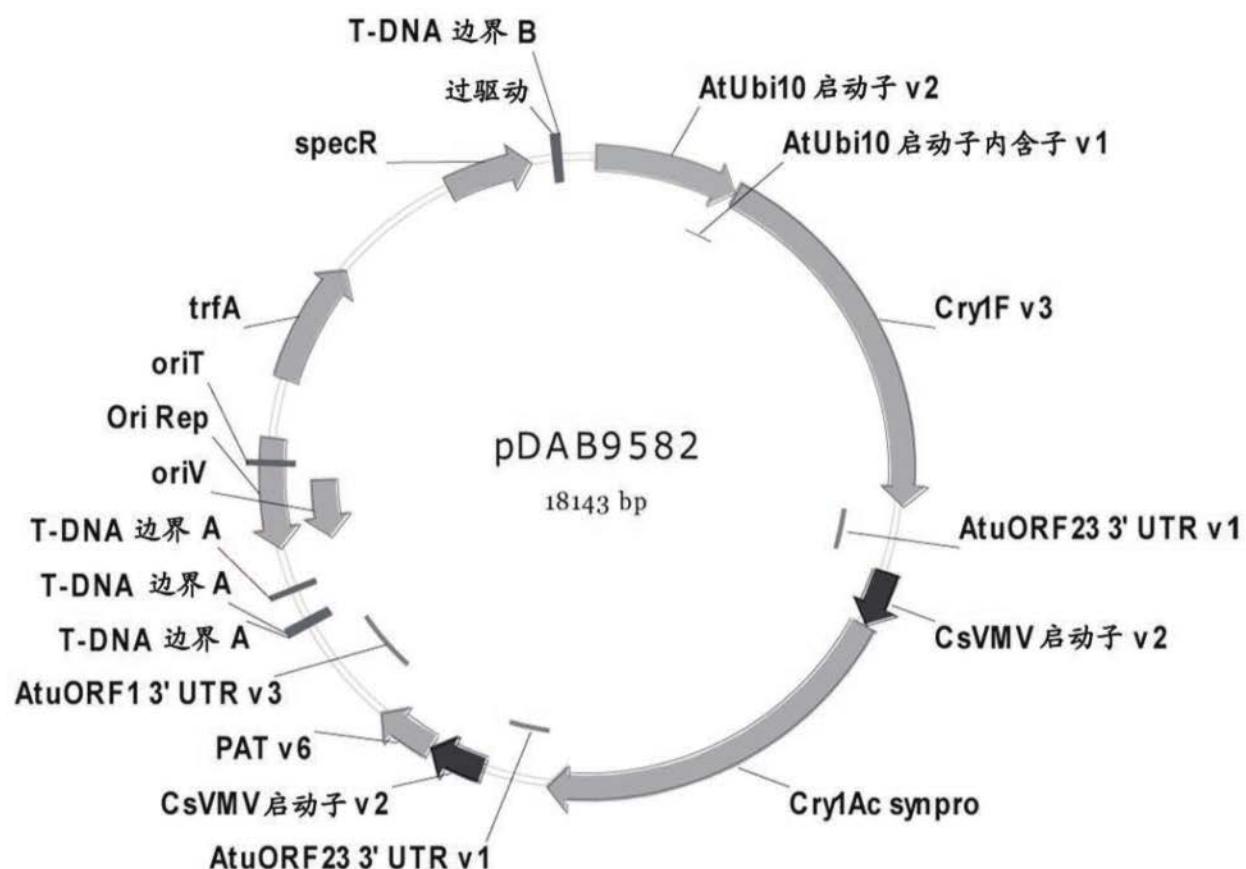


图1

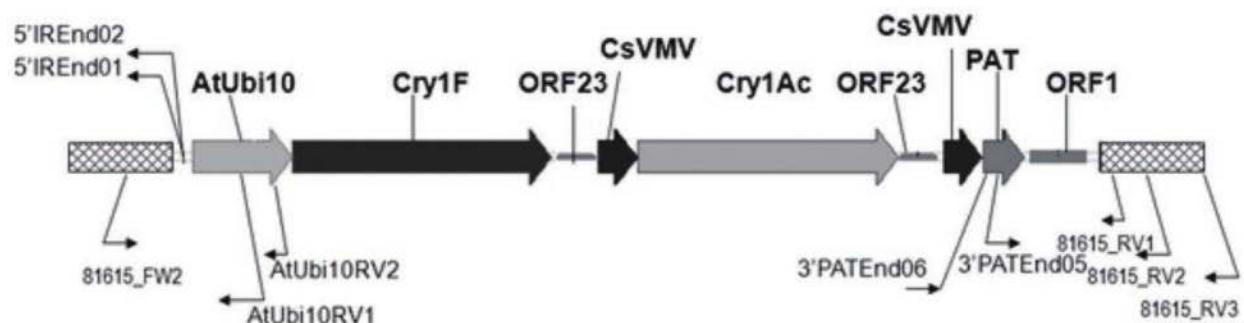


图2

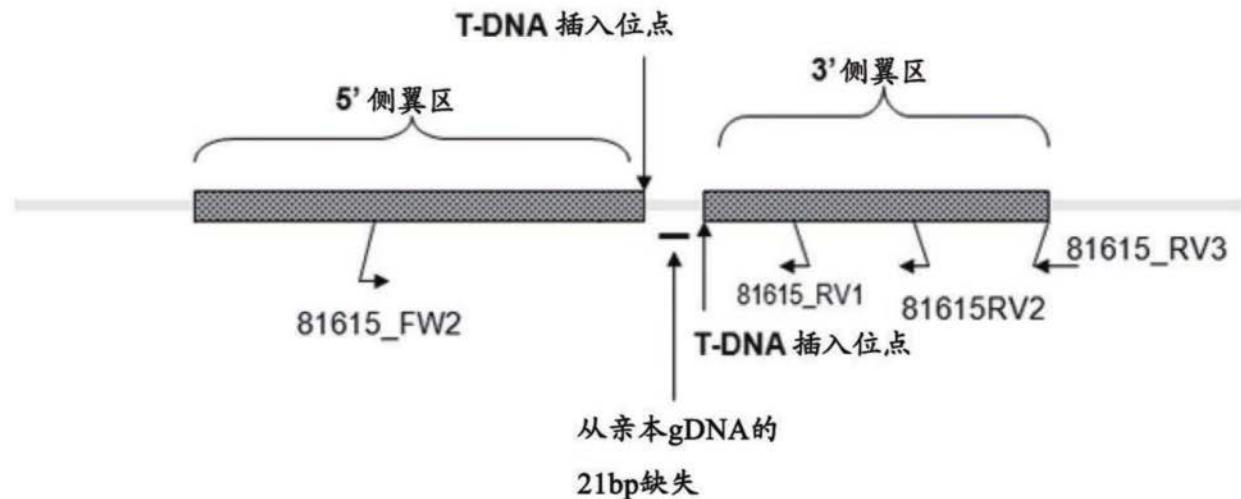


图3