



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102782153 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201080062204. 8

代理人 陈静

(22) 申请日 2010. 11. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/263, 950 2009. 11. 24 US

61/327, 369 2010. 04. 23 US

C12Q 1/68(2006. 01)

C12P 19/34(2006. 01)

C07H 21/04(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 24

(56) 对比文件

CN 1370841 A, 2002. 09. 25,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/057967 2010. 11. 24

审查员 陈云华

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/066360 EN 2011. 06. 03

(73) 专利权人 陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 S·诺瓦克 Y·C·崔

T·W·格里尼 N·周

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

权利要求书2页 说明书15页

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

AAD-12 大豆事件 416 的检测

(57) 摘要

本发明部分涉及检测 AAD-12 大豆事件的方法。本发明提供了用于检测(例如大豆)样品中的本事件的存在测定法。还提供了可用于进行测定法的试剂盒和条件。更具体地,本发明部分涉及用于 AAD-12 大豆事件的端点 TaqMan PCR 测定法。一些实施方案涉及能够高通量接合性分析的测定法。本发明进一步部分涉及用于测定接合性的优选参照基因的发现。本发明还部分涉及使用任何本方法的植物育种。在一些实施方案中,所述事件/多核苷酸序列可以与其它性状“叠加”。可以使用本规程来独特地鉴定包含本发明的事件的大豆系。

1. 一种用于确定包含 AAD-12 大豆事件 pDAB4468-0416 的大豆植物的事件接合性的方法,所述事件包含含有 AAD-12 基因的转基因构建体,所述转基因构建体侧翼有 5' 侧翼大豆基因组 DNA 和 3' 侧翼大豆基因组 DNA,其中所述 5' 侧翼 DNA 由 SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 组成,而所述 3' 侧翼 DNA 由 SEQ ID NO:1 的 9122-10,212 组成和其中所述转基因构建体由 SEQ ID NO:1 的残基 2731-9121 组成,所述方法包括:

自所述大豆植物获得基因组 DNA 的 DNA 样品;

通过使所述 DNA 样品与下列各项接触来生成接触样品

a. 第一事件引物和第二事件引物,其中所述第一事件引物由所述转基因构建体的区段组成,所述第二事件引物由所述 5' 大豆基因组侧翼 DNA 的或所述 3' 大豆基因组侧翼 DNA 的区段组成,且其中所述第一事件引物和所述第二事件引物在受到 TAQMAN PCR 条件处理时生成事件扩增子,

b. 参照正向引物和参照反向引物,其在受到 TAQMAN PCR 条件处理时自内源大豆参照基因生成参照扩增子,

c. 荧光事件探针,其与所述事件扩增子杂交,

d. 荧光参照探针,其与所述参照扩增子杂交;

将所述接触样品受到基于荧光的端点 TAQMAN PCR 条件处理;

定量与所述事件扩增子杂交的所述荧光事件探针;

定量与所述参照扩增子杂交的所述荧光参照探针;

比较杂交的荧光事件探针与杂交的荧光参照探针的量;并

通过比较杂交的荧光事件探针与杂交的荧光参照探针的荧光比率来测定 pDAB4468-0416 的接合性。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述扩增子由 50-150 个残基组成。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述参照基因是内源大豆凝集素基因。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述第二事件引物由 SEQ ID NO:1 的残基 2530-2730 的区段或其互补物组成。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述第二事件引物由 SEQ ID NO:1 的残基 9122-9322 的区段组成。

6. 权利要求 1 的方法,其中使用所述方法来对另一个大豆系进行事件的育种基因渗入。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述另一个大豆系缺乏所述事件。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述扩增子由 100-200 个碱基对组成。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述参照基因由选自下组的序列或其互补物组成:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、和 SEQ ID NO:7。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述参照引物由 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 组成,而所述参照探针由 SEQ ID NO:7 组成。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述探针用荧光染料和淬灭剂标记。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述事件探针包含在所述事件探针的 5' 端的 FAM 作为所述荧光染料和在所述事件探针的 3' 端的 MGB 淬灭剂。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述参照探针在所述参照探针的 5' 端用 HEX 标记并且在

所述参照探针的 3' 端用 Black Hole Quencher 1 (BHQ1) 标记。

14. 权利要求 1 的方法, 其中所述事件探针由 SEQ ID NO:4 组成。

15. 权利要求 1 的方法, 其中所述事件引物选自下组: SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3。

16. 权利要求 1 的方法, 其中在读板仪中直接阅读所述方法的结果。

17. 权利要求 1 的方法, 其中自田间的大豆植物获得所述 DNA 样品。

18. 一种用于实施权利要求 1 的方法的试剂盒, 所述试剂盒包含所述第一事件引物、所述第二事件引物、所述参照正向引物、所述参照反向引物、所述事件探针、和所述参照探针, 其中所述事件引物由 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 组成, 所述参照引物由 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 组成, 所述事件探针由 SEQ ID NO:4 组成, 而所述参照探针由 SEQ ID NO:7 组成。

AAD-12 大豆事件 416 的检测

[0001] 发明背景

[0002] aad-12 基因（最初来自食酸戴尔福特菌 (*Delftia acidovorans*)）编码芳氧基链烷酸酯加双氧酶 (aryloxyalkanoate dioxygenase, AAD-12) 蛋白。该性状赋予对例如 2, 4- 二氯苯氧基乙酸及对吡啶基氧基乙酸酯 (pyridyloxyacetate) 除草剂的耐受性。关于植物中的除草剂耐受性的 aad-12 基因自身在 WO 2007/053482 中第一次披露。

[0003] 异源或外来基因在植物中的表达受到外来基因在何处插入染色体中影响。例如，这可以是由于染色质结构（例如，异染色质）或转录调节元件（例如，增强子）接近整合位点的接近性 (Weising 等, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988)。相同类型的转基因植物（或其它生物体）中的相等基因可以在不同事件间展现出表达水平的广泛变化。还可能存在着空间或时间表达样式的差异。例如，转基因在多个植物组织中的相对表达差异可以不对应于自存在于导入的基因构建体中的转录调节元件预期的样式。

[0004] 如此，经常创建大量事件，并筛选以鉴定以对于给定的目的满意的水平表达导入的感兴趣基因的事件。对于商业目的，生成成百上千个不同事件，并对那些事件筛选具有期望的转基因表达水平和样式的单一事件是常见的。具有期望的转基因表达水平和 / 或样式的事件可用于使用常规的育种方法通过有性异型杂交 (outcrossing) 将转基因基因渗入 (outcross) 其它遗传背景中。此类杂交的后代维持初始转化体的转基因表达特征。使用此策略来确保充分适应于地方生长条件的许多品种 (variety) 中的可靠基因表达。

[0005] 可以使用多种现有方法来检测植物组织样品中的某个事件的存在。一个例子是焦磷酸测序 (pyrosequencing) 技术，如由 Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00:18-24, 2000) 所描述的。在此方法中，设计与相邻的基因组 DNA 和插入 DNA 连接重叠的寡核苷酸。将寡核苷酸与来自感兴趣区域的单链 PCR 产物（在插入序列中的一条引物和侧翼基因组序列中的一条）杂交，并在存在 DNA 聚合酶、ATP、硫酸化酶、萤光素酶、腺苷三磷酸双磷酸酶、腺苷 5' 磷酸硫酸酯和萤光素的情况下温育。个别添加 dNTP，并且掺入导致测量的光信号。由于成功扩增、杂交、和单或多碱基延伸，光信号指示转基因插入 / 侧翼序列的存在。（此技术通常用于初始的测序，在特定基因已知时不用于其检测）。

[0006] 荧光偏振是另一种可以用于检测扩增子的方法。遵循此方法，将寡核苷酸设计为与基因组侧翼和插入 DNA 连接重叠。将寡核苷酸与来自感兴趣区域的单链 PCR 产物（在插入 DNA 中的一条引物和侧翼基因组 DNA 序列中的一条）杂交，并在存在 DNA 聚合酶和经荧光标记的 ddNTP 的情况下温育。单碱基延伸导致 ddNTP 的掺入。可以使用荧光计以偏振变化测量掺入。由于成功扩增、杂交、和单碱基延伸，偏振变化指示转基因插入 / 侧翼序列的存在。

[0007] 已经描述了分子信标 (Molecular Beacon) 在序列检测中使用。简言之，设计与侧翼基因组和插入 DNA 连接重叠的 FRET 寡核苷酸探针。FRET 探针的独特结构导致其含有使荧光和淬灭模块保持极其接近的二级结构。在存在热稳定性聚合酶和 dNTP 的情况下循环 FRET 探针和 PCR 引物（在插入 DNA 序列中的一条引物和侧翼基因组序列中的一条）。在成功的 PCR 扩增后，FRET 探针与靶序列的杂交导致除去探针二级结构和空间分离荧光和淬

灭模块。由于成功扩增和杂交,荧光信号指示侧翼基因组 / 转基因插入序列的存在。

[0008] 水解探针测定法,又称为 TAQMAN(LifeTechnologies,Foster City,Calif.) 是一种检测并量化 DNA 序列的存在的方法。简言之,将 FRET 寡核苷酸探针设计为转基因内的一种寡聚物和侧翼基因组序列中的一种以进行事件特异性检测。在存在热稳定性聚合酶和 dNTP 的情况中循环 FRET 探针和 PCR 引物(在插入 DNA 序列中的一条引物和侧翼基因组序列中的一条)。FRET 探针的杂交导致对荧光模块的切割和释放,远离 FRET 探针上的淬灭模块。由于成功扩增和杂交,荧光信号指示侧翼 / 转基因插入序列的存在。

[0009] 许多中的另一个考验是寻找适合于给定测试的参照基因。例如,如 Czechowski 等的摘要中所述的,“来自 Affymetrix ATH1 全基因组 GeneChip 研究的格外大的数据集提供了鉴定在模式植物物种拟南芥属 (*Arabidopsis*) (拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)) 中具有非常稳定的表达水平的新一代参照基因的手段。找到贯穿发育及在一系列环境条件下就表达稳定性而言胜过传统的参照基因的数百种拟南芥基因。”(Czechowski 等 (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5-17)。

[0010] Brodmann 等 (2002) 涉及欧盟批准的 4 种不同玉米品种的食物中的转基因玉米含量的实时定量 PCR 检测。Brodmann, P. D., P. D., Ilg E. C., Berthoud H. 和 Herrmann, A. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *J. of AOAC international* 200285(3)。

[0011] Hernandez 等 (2004) 提及与实时 PCR 一起使用的 4 种可能的基因。Hernandez, M., Duplan, M.-N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M. 和 Bertheau, Y. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4632-4637。

[0012] Costa 等 (2007) 考虑这 4 种基因(也在实时 PCR 背景中),并且推断醇脱氢酶和玉米醇溶蛋白基因是用于检测转基因饲料混合组织的样品“事件”(凝集素基因)的最好的参照基因。Costa, L. D. 和 Martinelli L. Development of a Real-Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining an Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Components. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1264-1273。

[0013] Huang 等 (2004) 使用质粒 pMu1M2 作为参照分子来检测玉米中的 MON810 和 NK603 转基因。Huang 和 Pan, “Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods,” *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(11), pp 3264-3268。

[0014] Gasparic 等 (2008) 通过与循环探针技术、TaqMan、和各种实时 PCR 化学比较提示了 LNA 技术,以定量分析玉米事件(诸如 MON810)。Gašparič, Cankar, Žel and Gruden, “Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms,” *BMC Biotechnol.* 2008; 8:26。

[0015] US 20070148646 涉及一种用于量化的引物延伸方法,其需要可以通过掺入的核苷

酸量检测并量化的个别核苷酸的受控分配。这与使用内部参照基因的 TaqMan PCR 方法不同。

[0016] 为了区别 TC1507 的纯合和半合子基因型,已经为此事件成功使用 Invader 测定法。Gupta, M., Nirunsuksiri, W., Schulenberg, G., Hartl, T., Novak, S., Bryan, J., Vanopdorp, N., Bing, J. 和 Thompson, S. A non-PCR-based Invader Assay Quantitatively Detects Single-Copy Genes in Complex Plant Genomes. Mol. Breeding 2008, 21, 173-181。

[0017] Huabang (2009) 涉及转基因玉米的基于 PCR 的接合性测试。然而,似乎没有使用参照基因。Huabang, “An Accurate and Rapid PCR-Based Zygosity Testing Method for Genetically Modified Maize,” Molecular Plant Breeding, 2009, Vol. 7, No. 3, 619-623。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明部分涉及检测具有以保藏号 PTA-10442 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC) 的种子的称作 DAS-68416-4 的 AAD-12 大豆(大豆(Glycine max))事件的方法。

[0020] 更具体地,本发明部分涉及用于 AAD-12 大豆事件的端点 TaqMan PCR 测定法。一些实施方案涉及能够高通量接合性分析的测定法。本发明进一步部分涉及用于测定接合性的优选凝集素参照基因的发现。可以使用这些和其它相关规程来独特地鉴定包含本发明的事件的大豆系。

[0021] 本发明还部分涉及使用任何本方法的植物育种。在一些实施方案中,所述事件/多核苷酸序列可以与其它性状,包括例如其它除草剂耐受性基因和/或昆虫抑制性蛋白质“叠加”。然而,本发明包括具有单一事件的植物,如本文中所描述的。

[0022] 另外,本发明提供了用于检测(例如大豆)样品中的主题事件的存在性的测定法。还提供了可用于进行测定法的试剂盒和条件。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1:将大豆事件 DAS-68416-4 的基因组 DNA 用 EcoRV 或 Pvu II 消化,并用于生成相应的 GENOMEWALKER™文库,其作为模板使用以扩增靶 DNA 序列。

[0025] 图 2:示意图描绘了用于从 5' 至 3' 边界对大豆事件 DAS-68416-4 的全长测序的引物位置和克隆策略。

[0026] 图 3:示意图描绘了用于确认大豆事件 DAS-68416-4 的从 5' 至 3' 边界的全长序列的引物位置。

[0027] 图 4:示意图描绘了用于确认 AAD-12 大豆事件 DAS-68416-4 的插入位点序列的引物位置。

[0028] 序列简述

[0029] SEQ ID NO:1 提供了在 AAD-12 插入物的任一侧的 5' 和 3' 基因组侧翼序列(包括插入物)的序列。测序序列加下划线。

[0030] SEQ ID NO:2-7 提供了依照本发明使用的引物和探针的序列。

[0031] 发明详述

[0032] 通过土壤杆菌属(Agrobacterium)转化生成转基因 AAD-12(提供除草剂耐受性)大豆事件 pDAB4468-416。将此 AAD-12 转基因插入物的 5' 和 3' 端侧翼序列两者克隆、测序、并表征,如 USSN 61/263,950(2009 年 11 月 24 日提交)中详述的。

[0033] 部分依照位于转基因和宿主基因组 DNA 间的连接区中的 DNA 序列设计特异性

TAQMAN 引物和探针,如本文中详述的。在针对不同 AAD-12 大豆事件和非转基因大豆品种 Maverick 的实时 PCR 中用大豆凝集素作为参照基因以双重形式成功测试引物和探针的事件特异性。开发出 AAD-12 大豆事件的端点事件特异性 TAQMAN 测定法的规程,如本文中详述的。

[0034] 跨越此 AAD-12 大豆事件中的宿主植物 DNA 与整合基因构建体间的整合连接区的序列是独特的序列。使用它来开发事件特异性测定法(常规的 PCR 或实时 PCR)以检测供 GMO 测试用的 AAD-12 大豆事件 pDAB4468-416 的存在并测定育种群体中的植物的接合性状态。可以对这两种应用采用本文中报告的事件特异性 TAQMAN 测定法。

[0035] 本发明提供了用于检测样品中的转基因大豆事件 DAS-68416-4 的存在的测定法。本发明的方面包括设计和/或生成本文中例示或提示的任何诊断核酸分子的方法。可以使用本文中公开并提示的序列来检测包含此事件的植物系。

[0036] 如此,在一些实施方案中,本发明涉及鉴定除草剂耐受性大豆系。本发明部分涉及检测主题事件的存在以测定有性杂交的后代是否含有感兴趣的事件。另外,包括用于检测该事件的方法,并且其有助于例如遵照需要上市前批准和源自例如重组作物植物的食物的标签的规定。

[0037] 更具体地,所述事件是 AAD-12 事件,又称作 pDAB4468-0416。本发明可以用于其在世代间在全植物和分子水平在稳定性和表达方面的选择和表征。

[0038] 依照本发明使用的主题合成基因(aad-12)源自食酸戴尔福特菌,并且编码能够使具有芳氧基链烷酸酯模块的几种除草剂,包括苯氧基生长素(例如 2,4-D, MCPA)及吡啶基氧基生长素(例如氟草烟(fluroxypyr)、定草酯(triclopyr))灭活的酶。经由根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)技术来将 aad-12 基因(由 atUbi10 启动子驱动)导入大豆系 Maverick 中。

[0039] 本发明部分涉及基于荧光的端点 TaqMan PCR 测定法,其利用内源基因作为参照(拷贝数)对照以对 AAD-12 大豆事件进行高通量接合性分析。本发明进一步部分涉及优选的参照基因转化酶的发现。将几种参照基因鉴定为可能的选项。

[0040] 本发明还部分涉及用于 AAD-12 大豆事件特异性接合性分析的二重(biplex)端点 TaqMan PCR 的开发。此外,本发明部分涉及 AAD-12 育种测试试剂盒的开发。

[0041] 端点 TaqMan 测定法基于 + / - 策略,根据该策略,“+”表示样品在测定的基因方面呈阳性,而“-”表示样品在测定的基因方面呈阴性。这些测定法通常利用分别用于鉴定 AAD-12 转基因序列和野生型基因序列的两组寡核苷酸以及测量转基因和野生型序列含量的经双重标记的探针。

[0042] 虽然 Invader 测定法已经是一种用于表征事件的稳健技术,但是它对 DNA 质量非常灵敏。另外,该测定法需要较高的 DNA 数量。Invader 还需要额外的变性步骤,若不正确操作,它可使 Invader 测定法不成功。另外,Invader 测定法的较长测定时间在其有效加工商业背景中分析的大量 AAD-12 事件 416 样品的灵活性上受到限制。本发明的一个主要优点是节省时间的且消除变性步骤。

[0043] 用于检测 AAD-12416 事件的主题端点 TaqMan 分析提供与 Invader 相比的令人惊讶的优点,特别是在分析大量样品中。

[0044] 本文中提供了定义和例子以帮助描述本发明,并且指导本领域普通技术人员实施

本发明。除非另有记录,应当依照相关领域普通技术人员的常规用法理解术语。使用 DNA 碱基的命名,如于 37CFR § 1.822 列出的。

[0045] 如本文中所使用的,术语“后代”意指包含 AAD-12 大豆事件 DAS-68416-4 的亲本植物的任何世代的后代。

[0046] 转基因“事件”如下产生,即用异源 DNA,即包含感兴趣转基因的核酸构建体转化植物细胞、源自转基因插入植物基因组的植物群体的再生、并选择以插入特定的基因组位置中为特征的特定植物。术语“事件”指包含异源 DNA 的初始转化体和转化体的后代。术语“事件”也指通过转化体和包含基因组 / 转基因 DNA 的另一品种间的有性异型杂交产生的后代。即使在对回归亲本进行重复回交后,插入的转基因 DNA 和来自所转化亲本的侧翼基因组 DNA (基因组 / 转基因 DNA) 在杂交后代中也存在于相同的染色体位置。术语“事件”也指来自初始转化体及其后代的 DNA,该 DNA 包含插入的 DNA 和紧邻插入 DNA 的侧翼基因组序列,由于包含所插入 DNA 的亲本系(例如初始转化体和自交后代)和不含所插入 DNA 的亲本系间的有性杂交,可以预期该 DNA 会转移到接受包含感兴趣转基因在内的插入 DNA 的后代中。

[0047] “连接序列”跨越插入基因组中的 DNA 与在插入点侧翼的大豆天然基因组的 DNA 连接的点,在植物遗传物质中鉴定或检测出一个或另一个连接序列便足以诊断该事件。包括跨越本文中所描述的大豆事件中的插入物和类似长度的侧翼 DNA 的 DNA 序列。本文中提供了此类诊断序列的具体例子;然而,与各插入物的连接,或插入物与基因组序列的连接重叠的其它序列也是诊断性的,并且可以依照本发明使用。

[0048] 本发明涉及此类侧翼、连接、和插入序列的鉴定。本发明中包括相关的 PCR 引物和扩增子。依照本发明,可以使用 PCR 分析方法检测或鉴定源自主题专利转基因大豆系的商业化转基因大豆品种或系,所述 PCR 分析方法使用跨越整个插入 DNA 及其边界的扩增子。

[0049] 这些插入物之每种的整个序列及相应侧翼序列的部分在本文中以 SEQ ID NO:1 提供。下文指示就 SEQ ID NO:1 (总共 10,212 个碱基对)而言的此事件的插入和侧翼序列的坐标。

[0050]

	5'侧翼	插入物	3'侧翼
残基# (SEQ:1):	1-2730	2731-9121	9122-10,212
长度(bp):	2730 bp	6391 bp	1091 bp

[0051] 插入和侧翼序列的构件在图 1 到 4 中进一步例示。

[0052] 本发明的检测技术特别可用于与植物育种联合,以测定在将包含感兴趣事件的亲本植物与致力于在后代中赋予一种或多种额外的感兴趣性状的另一植物系杂交后,哪些后代植物包含给定的事件。这些分析方法使大豆育种程序及质量控制(尤其对于商业化的转基因大豆种子)受益。现在也生成并使用用于这些转基因大豆系的检测试剂盒。这也可以使产品注册和产物管理受益。这些可以用于加速的育种策略及建立连锁数据。

[0053] 可以使用本文中提供的序列来研究并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(尤其是涉及基因沉默、转基因

甲基化模式、位置效应和潜在的表达相关元件诸如 MARS[基质附着区] 等)。

[0054] 此外,本发明包括选择子代和 / 或后代植物,优选地除草剂抗性大豆植物,其中所述植物具有包括可检测 DNA 插入物的基因组,如本文中所描述的。如本文中所使用的,术语“大豆”意指大豆,并且包括可以用大豆植物育种的其所有品种。

[0055] 本发明进一步包括使用本发明的植物作为至少一个亲本进行杂交的方法。本发明包括一种用于生产 F1 杂种种子的方法,其通过将例示的植物与不同(例如,近交亲本)植物杂交,并收获所得的杂种种子来进行。可以通过仔细考虑亲本植物来改善所得植物(任一雌性)的特征。

[0056] 可以如下育种除草剂耐受性大豆植物,即首先将由自本文中提及的任一种系的种子种植的大豆植物组成的第一亲本大豆植物与第二亲本大豆植物有性杂交,由此生成多个第一后代植物,然后选出对除草剂有抗性(或拥有本发明的至少一个事件)的第一后代植物;并自交第一后代植物,由此生成多个第二后代植物;然后自第二后代植物选出对除草剂有抗性(或拥有本发明的至少一个事件)的第二后代植物。这些步骤可以进一步包括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的回交。然后,可以种植包含本发明的大豆种子的大豆作物或其后代。

[0057] 还应当理解,也可以将两种不同转基因植物杂交以生成含有两个独立分离的添加的外源基因的后代。合适后代的自交可以生成在这两种添加的外源基因方面纯合的植物。因为是无性繁殖,所以也涵盖与亲本植物回交和与非转基因植物的异型杂交。通常用于不同形状和作物的其它育种方法是本领域中已知的。已经使用回交育种来将简单遗传的、高度可遗传性状的基因转移入期望的纯合栽培种或近交系(其作为回归亲本)中。要转移的性状的来源称作供体亲本。预期所得的植物具有回归亲本(例如栽培种)的属性和自供体亲本转移的期望的性状。在初始杂交后,将拥有供体亲本表型的个体选出并与回归亲本重复杂交(回交)。预期所得的亲本具有回归亲本(例如栽培种)的属性和自供体亲本转移的期望的性状。

[0058] 本发明可以在标志物辅助育种(MAB)方法中与分子标志物一起使用。本发明的 DNA 分子可以与鉴定遗传连锁的农艺学有用的性状的其它方法(诸如 AFLP 标志物、RFLP 标志物、RAPD 标志物、SNP、和 SSR)一起使用,如本领域中已知的。可以使用 MAB 方法在与本发明大豆植物(或其后代及任何其它大豆栽培种或品种)的杂交后代中追踪除草剂抗性性状。DNA 分子是此性状的标志物,并且可以使用本领域中公知的 MAB 方法来在大豆植物中追踪除草剂抗性性状,其中本发明的至少一种大豆系或其后代是亲本或祖先。可以使用本发明的方法来鉴定具有主题事件的任何大豆品种。

[0059] 本发明的方法包括一种生成除草剂耐受性大豆植物的方法,其中所述方法包括用本发明的植物育种。更具体地,所述方法可以包括杂交本发明的两种植物,或本发明的一种植物 and 任何其它植物。优选的方法进一步包括通过分析依照本发明可检出的事件的所述后代来选择所述杂交的后代。例如,可以经由与包含其它期望的性状,诸如农艺学性状诸如那些在本文中在多个实施例中测试的性状的植物的育种循环使用本发明来追踪主题事件。例如,可以将包含主题事件和期望性状的植物检出,鉴定,选出,并在进一步的育种轮次中快速使用。也可以经由育种来组合主题事件 / 性状,并用昆虫抗性性状和 / 或用别的除草剂耐受性性状依照本发明追踪。后一种的一种优选的实施方案是包含与编码对除草剂麦草畏

的抗性的基因组合的主题事件的植物。

[0060] 主题事件可以与例如编码草甘膦抗性（例如，抗性植物或细菌 EPSPS、GOX、GAT）、草丁膦抗性（例如，Pat、bar）、乙酰乳酸合酶（ALS）抑制性除草剂抗性（例如，咪唑啉酮 [诸如咪草烟（imazethapyr）]、磺酰脲、三唑嘧啶磺酰苯胺、嘧啶基硫代苯甲酸（pyrimidinylthiobenzoate）、和其它化学品 [Csr1, SurA, 等]）、溴草腈（bromoxynil）抗性（例如 Bxn）、对 HPPD（4- 羟苯基 - 丙酮酸 - 加双氧酶）酶抑制剂的抗性、对八氢番茄红素去饱和酶（PDS）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 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（见例如 US 20030135879）的性状组合，并且其它性状可以单独或以多种组合叠加以提供有效控制或预防杂草移动和 / 或对上述种类的任何除草剂的抗性的能力。

[0061] 关于其它除草剂，一些其它优选的 ALS（又称为 AHAS）抑制剂包括三唑嘧啶磺酰苯胺（诸如氯酯磺草胺（cloransulam-methyl）、双氯磺草胺（diclosulam）、双氟磺草胺（florasulam）、唑嘧磺草胺（flumetsulam）、甲氧磺草胺（metosulam）、和五氟磺草胺（penoxsulam））、嘧啶基硫代苯甲酸（诸如双草醚（bispyribac）和嘧草硫醚（pyrithiobac））、和氟酮磺隆（flucarbazone）。一些优选的 HPPD 抑制剂包括甲基磺草酮（mesotrione）、异噁唑草酮（isoxaflutole）、和磺草酮（sulcotrione）。一些优选的 PPO 抑制剂包括氟烯草酸（flumiclorac）、丙炔氟草胺（flumioxazin）、吡嗪氟草酯（flufenpyr）、吡草醚（pyraflufen）、噻草酸（fluthiacet）、氟丙嘧草酯（butafenacil）、唑酮草酯（carfentrazone）、甲磺草胺（sulfentrazone）、和二苯醚（diphenylether）（诸如三氟羧草醚（acifluorfen）、氟磺胺草醚（fomesafen）、乳氟乐草灵（lactofen）、和乙氧氟草醚（oxyfluorfen））。

[0062] 另外，单独的或与一种或多种其它 HTC 性状叠加的 AAD-12 可以与一种或多种其它输入（例如，昆虫抗性、真菌抗性、或应激耐受性等）或输出（例如，增加的产率、改善的油概况、改善的纤维质量等）性状叠加。如此，可以使用本发明来提供具有灵活地且成本有效地控制许多农艺学害虫的能力的改善的作物质量的完整农艺学包装。

[0063] 主题 AAD-12 酶实现转基因表达，导致对会控制几乎所有阔叶和禾本科杂草的除草剂组合的耐受性。例如，AAD-12 可以充当卓越的除草剂耐受性作物（HTC）性状以与其它 HTC 性状（例如，草甘膦抗性、草丁膦抗性、咪唑啉酮抗性、溴草腈抗性等）、和昆虫抗性性状（Cry1F、Cry1Ab、Cry 34/45 等）叠加。另外，AAD-12 可以充当选择标志来帮助选择用第二基因或基因的组遗传工程化改造的植物的初级转化体。

[0064] 本发明的 HTC 性状可以与其它 HTC 性状（包括但不限于草甘膦耐受性）以新的组合使用。这些性状组合产生控制杂草（等）物种的新方法，这是由于最近需要的对除草剂（例如草甘膦）的抗性或固有耐受性。如此，在 HTC 性状外，使用除草剂（对于该除草剂，通过转基因作物中的所述酶来创建除草剂耐受性）来控制杂草的新方法在本发明的范围内。

[0065] 另外，全世界种植的草甘膦耐受性作物是普遍的。与其它草甘膦耐受性作物轮作多次，草甘膦抗性自生植物的控制在轮作作物中可能是困难的。如此，对作物个别叠加或转化的主题转基因性状的使用提供了一种用于控制其它 HTC 自生植物作物的工具。

[0066] 除非另有指示，提及侧翼序列指那些就 SEQ ID NO:1（见上文表）而言鉴定的。此

外, SEQ ID NO:1 包括初始转化体中插入的异源 DNA 和刚好与插入 DNA 相邻的例示性侧翼基因组序列。可以预期所有或部分的这些侧翼序列被转移到由于包含该事件的亲本系的有性杂交而接受插入 DNA 的后代。

[0067] 如本文中所使用的,“系”指一组在至少一种性状上个体之间展现出很少或没有遗传变异的植物。所述系可以通过几个世代的自花传粉和选择、或者使用组织或细胞培养技术自单一亲本进行营养繁殖来产生。

[0068] 如本文中所使用的,术语“栽培种”和“品种”是同义的,指用于商业生产的系。

[0069] “稳定性”或“稳定的”就给定的组分而言意指组分在世代间且优选地至少三个世代以基本上相同的水平得到维持,例如优选地 $\pm 15\%$,更优选地 $\pm 10\%$,最优选地 $\pm 5\%$ 。稳定性可以受到温度、位置、应激和种植时间影响。在田间条件下比较随后的世代应当以相似的方式生成组分。

[0070] “商业效用”定义为具有良好的植物活力和高能育性,使得农民可以使用常规的耕作设备生产作物,并且可以使用常规的破碎和提取设备自种子提取具有所描述组分的油。为了在商业上有用,产率(如通过每英亩生产的种子重量、油含量、和总油量测量的)在相同地区种植没有优质价值性状的其它方面相当的商业大豆品种的平均产率的 15% 内。

[0071] “农艺学良种”意指在由主题事件所致的昆虫抗性外,系具有期望的农艺学特征,诸如产率、成熟度、疾病抗性等。在包含本发明的事件的植物中个别或以任意组合采用的农艺学性状(如下文实施例中所列的)在本发明的范围内。可以使用任何和所有这些农艺学特征和数据点来作为用于限定此类植物的一系列特征的点或在该一系列特征的任一末端或两个末端鉴定此类植物。

[0072] 如本领域技术人员根据本公开内容会认可,检测试剂盒的优选实施方案例如可以包含探针和 / 或引物,包括多核苷酸探针和 / 或扩增子。

[0073] 在侧翼序列中“降落”的引物通常不设计为超出约 200 个碱基或超出连接杂交。如此,典型的侧翼引物会设计为包含进入侧翼序列中的距离插入物开始 200 个碱基内的任一条链的至少 15 个碱基。也就是说,包含自 SEQ ID NO:1 的残基约 2530-2730 和 / 或约 9122-9322(或与其杂交)的合适大小的序列的引物在本发明的范围内。同样地,插入引物可以在插入物上的任何地方设计,但是例如可以不仅为此类引物设计使用残基约 2731-2931 和约 8921-9121。

[0074] 本领域技术人员还会认可,引物和探针可以设计为在一系列标准的杂交和 / 或 PCR 条件下与 SEQ ID NO:1(或其互补物)的区段及其互补物杂交,其中引物或探针与例示的序列不完全互补。也就是说,可以容忍一定程度的错配。对于约 20 个核苷酸的引物,例如,若错配碱基是内部的或在扩增子相反的引物末端,则通常 1 或 2 个左右的核苷酸不需要与相反链结合。下文提供了各种合适的杂交条件。也可以在探针中使用合成的核苷酸类似物诸如肌苷。也可以使用肽核酸(PNA)探针及 DNA 和 RNA 探针。重要的是此类探针和引物诊断(能够独特地鉴定并区别)本发明事件的存在。

[0075] “插入物”的构件在图中显示。这些构件的 DNA 多核苷酸序列或其片段可以作为 DNA 引物或探针在本发明的方法中使用。

[0076] 在本发明的一些实施方案中,提供了用于在来自大豆植物的植物和种子等中检测转基因 / 基因组插入区的存在的组合物和方法。提供了 DNA 序列及其区段、和例示序列的

互补物及其任何区段。

[0077] 可以使用这些和其它相关的规程来独特地鉴定这些大豆系。

[0078] 在一些实施方案中,包含新的转基因/基因组插入区域的连续片段的 DNA 序列是本发明的一方面。包括包含足够长度的转基因插入序列多核苷酸和足够长度的来自一种或多种上述三种大豆植物的大豆基因组序列的多核苷酸的 DNA 序列,和/或用作生成对于这些大豆植物中的一种或多种诊断性的扩增子产物的引物序列的序列。

[0079] 相关实施方案属于如下的 DNA 序列,其包含本文中鉴定的 DNA 序列(诸如 SEQ ID NO:1 及其区段)或其互补物的转基因部分的至少 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 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,和来自这些序列或其互补物的侧翼大豆 DNA 序列的相似长度。此类序列可用作 DNA 扩增方法中的 DNA 引物。使用这些引物生成的扩增子诊断本文中提及的任何大豆事件。因此,本发明还包括通过此类 DNA 引物和同源引物生成的扩增子。

[0080] 本发明还包括检测样品中对应于本文中提及的大豆事件的 DNA 的存在的方法。此类方法可以包括:(a) 使包含 DNA 的样品与引物组接触,所述引物组在与来自至少一个这些大豆事件的 DNA 的核酸扩增反应中使用生成诊断所述事件的扩增子;(b) 实施核酸扩增反应,由此生成扩增子;并(c) 检测扩增子。

[0081] 本发明的其它检测方法包括一种检测样品中对应于至少一个所述事件的 DNA 的存在的方法,其中所述方法包括:(a) 使包含 DNA 的样品与探针接触,所述探针在严格杂交条件下与来自至少一个所述大豆事件的 DNA 杂交,并且其在严格杂交条件下不与对照大豆植物(非感兴趣事件 DNA)杂交;(b) 将样品和探针受到严格杂交条件处理;并(c) 检测探针与 DNA 的杂交。

[0082] 在又一些实施方案中,本发明包括生成包含本发明的 AAD-12 事件的大豆植物的方法,其中所述方法包括下列步骤:(a) 将第一亲本大豆系(包含本发明的表达盒,其对所述系的植物赋予所述除草剂抗性性状)和第二亲本大豆系(其缺乏此除草剂耐受性性状)有性杂交,由此生成多个后代植物;并(b) 通过使用分子标志物来选择后代植物。任选地,此类方法可以包括将后代植物与第二亲本大豆系回交以生成包含所述昆虫耐受性性状的真实育种大豆植物的进一步的步骤。

[0083] 依照本发明的另一方面,提供了测定与所述三种事件中的任一种(或多种)杂交的后代的接合性的方法。所述方法可以包括使样品(包含大豆 DNA)与本发明的引物组接触。所述引物在与来自至少一个所述大豆事件的基因组 DNA 的核酸扩增反应中使用生成诊断至少一个所述大豆事件的第一扩增子。此类方法进一步包括实施核酸扩增反应,由此生成第一扩增子;检测第一扩增子;并使包含大豆 DNA 的样品与所述引物组(所述引物组在与来自大豆植物的基因组 DNA 的核酸扩增反应中使用生成第二扩增子,其包含与大豆基因组区同源的天然大豆基因组 DNA)接触;并实施核酸扩增反应,由此生成第二扩增子。该方法进一步包括检测第二扩增子,并比较样品中的第一和第二扩增子,其中这两种扩增子的存在指示样品在转基因插入物方面是杂合的。

[0084] 使用本文中公开的组合物和本领域中公知的 DNA 检测方法的 DNA 检测试剂盒。试剂盒可用于鉴定样品中的主题大豆事件 DNA,并且可以应用于育种含有此 DNA 的大豆植物的方法。试剂盒含有与例如本文中公开的扩增子或与主题事件的转基因遗传元件中含有的

DNA 同源或互补的 DNA 序列同源或互补的 DNA 序列。这些 DNA 序列可以在 DNA 扩增反应中使用或者作为引物在 DNA 杂交方法中使用。试剂盒还可以含有实施检测方法必需的试剂和材料。

[0085] “探针”是一种分离的核酸分子，其附接有常规的可检测标记物或报告物分子（诸如放射性同位素、配体、化学发光剂、或酶）。此类探针与靶核酸的链，在本发明的情况中，与来自所述大豆事件之一的基因组 DNA 的链（无论来自大豆植物还是来自包含来自所述事件的 DNA 的样品）互补。依照本发明的探针不仅包含脱氧核糖核酸或核糖核酸，而且还包含聚酰胺和其它探针材料，其特异性结合靶 DNA 序列，并且可以用于检测所述靶 DNA 序列的存在。

[0086] “引物”是通过核酸杂交与互补靶 DNA 链退火以形成引物与靶 DNA 链间的杂合物，然后通过聚合酶，例如 DNA 聚合酶沿着靶 DNA 链延伸的分离的 / 合成的核酸。本发明的引物对指其用于扩增靶核酸序列的用途，例如通过聚合酶链式反应 (PCR) 或其它常规的核酸扩增方法来实现。

[0087] 一般地，探针和引物的长度为 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 或 500 个多核苷酸或更多。此类探针和引物在高严格性杂交条件下与靶序列特异性杂交。优选地，依

照本发明的探针和引物与靶序列具有完全的序列相似性,尽管可以通过常规方法设计与靶序列不同,且保留与靶序列杂交的能力的探针。

[0088] 用于制备和使用探针和引物的方法记载于例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2板, 第1-3卷, Sambrook等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989。PCR引物对可以源自已知的序列,例如,通过使用意图出于所述目的的计算程序来进行。

[0089] 可以使用基于本文中所公开的侧翼DNA和插入序列的引物和探针来确认(且若必要的话,校正)公开的序列,其通过常规的方法,例如通过对此类序列再克隆和测序来进行。

[0090] 本发明的核酸探针和引物在严格条件下与靶DNA序列杂交。可以使用任何常规的核酸杂交或扩增方法来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与其它核酸分子特异性杂交。如本文中所使用的,若两个分子能够形成反平行的、双链核酸结构,则所述两个核酸分子被说成能够彼此特异性杂交。一个核酸分子被说成是另一个核酸分子的“互补物”,若它们展现出完全的互补性。如本文中所使用的,在分子之一的每个核苷酸与另一个的核苷酸互补时,分子被说成展现出“完全的互补性”。若两个分子能以足以容许它们至少在常规的“低严格性”条件下保持彼此退火的稳定性彼此杂交,则它们被说成是“最小程度互补的”。类似地,若分子能以足以容许它们在常规的“高严格性”条件下保持彼此退火的稳定性彼此杂交,则它们被说成是“互补的”。常规的严格性条件由 Sambrook 等, 1989 描述。因此,偏离完全的互补性是可允许的,只要此类偏离不完全排除分子形成双链结构的性能。为了使核酸分子充当引物或探针,它仅需要在序列上足够互补,使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能够形成稳定的双链结构。

[0091] 如本文中所使用的,基本上同源的序列是如下的核酸序列,其会在高严格性条件下与其比较的核酸序列的互补物特异性杂交。术语“严格条件”就通过 Sambrook 等, 1989, 于 9.52-9.55 讨论的特定杂交规程实现的核酸探针与靶核酸(即,与感兴趣的特定核酸序列)杂交而言进行功能限定。还可见 Sambrook 等, 1989, 于 9.47-9.52 和 9.56-9.58。因而,可以使用本发明的核苷酸序列来实现其与DNA片段的互补区段选择性形成双链体分子的能力。

[0092] 根据想象的应用,可以使用不同杂交条件来实现探针对靶序列的不同程度的选择性。对于需要高灵敏性的应用,通常会采用相对严格的条件来形成杂合物,例如会选择相对较低的盐和/或高温的条件,诸如通过约0.02M至约0.15M NaCl于约50°C至约70°C的温度提供。例如,严格条件可以牵涉用高严格性清洗缓冲液(0.2X SSC, 0.1%SDS, 65°C)将杂交滤膜清洗至少两次。促进DNA杂交的适当严格性条件,例如,6.0X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)于约45°C,接着于50°C用2.0X SSC清洗是本领域技术人员已知的。例如,可以自约2.0XSSC于50°C的低严格性至约0.2X SSC于50°C的高严格性选择清洗步骤中的盐浓度。另外,清洗步骤中的温度可以自室温(约22°C)的低严格性条件提高至约65°C的高严格性条件。温度和盐两者可以有所变化,或者温度或盐浓度可以保持恒定,而另一个变量是变化的。此类选择性条件耐受(tolerate)很少的(若有的话)探针与模板或靶链间的错配。经由杂交检测DNA序列是本领域普通技术人员公知的,并且美国专利Nos. 4,965,188和5,176,995的教导是杂交分析方法例示性的。

[0093] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的核酸会在高严格性条件下与本文中例示或提示的一种或多种引物(或扩增子或其它序列),包括其互补物和片段特异性杂交。在本发明的一方面,本发明的标志物核酸分子在例示序列之一或其互补物和/或片段中具有如本文中所列的核酸序列。

[0094] 在本发明的另一方面,本发明的标志物核酸分子与此类核酸序列共享 80%-100% 或 90%-100% 序列同一性。在本发明的又一方面,本发明的标志物核酸分子与此类序列共享 95%-100% 序列同一性。可以在植物育种方法中使用此类序列作为标志物以鉴定遗传杂交的后代。可以通过本领域技术人员已知的许多方法来检测探针与靶 DNA 分子的杂交,这些可以包括但不限于荧光标签、放射性标签、基于抗体的标签、和化学发光标签。

[0095] 关于使用特定扩增引物对来扩增靶核酸序列(例如通过 PCR 进行),“严格条件”指容许引物对仅与如下的靶核酸序列杂交,并且优选地生成独特的扩增产物,即扩增子的条件,所述靶核酸序列会与具有相应的野生型序列(或其互补物)的引物结合。

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

[0097] 如本文中所使用的,“扩增 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。例如,为了测定源自有性杂交的大豆植物是否含有来自本发明大豆植物的转基因事件基因组 DNA,可以使用引物对将自大豆植物组织样品提取的 DNA 进行核酸扩增方法,所述引物对包括源自植物基因组中在插入异源 DNA 的插入位点附近的侧翼序列的引物,和源自插入异源 DNA 的第二引物以生成诊断事件 DNA 存在的扩增子。扩增子具有一定的长度,并且具有也是事件诊断性的序列。扩增子的长度范围可以为引物对加一个核苷酸碱基对的组合长度和/或引物对加约 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, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

5, 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, or 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 或更多个核苷酸碱基对（加或减上文所列的任何增量）的组合长度。或者，引物对可以源自插入 DNA 两侧上的侧翼序列，从而生成包括整个插入核苷酸序列的扩增子。源自植物基因组序列的引物对成员可以位于离插入 DNA 序列一段距离。此距离范围可以为一个核苷酸碱基对多至约 2 万个核苷酸碱基对。术语“扩增子”的使用明确排除可以存在于 DNA 热扩增反应中的引物二聚体。

[0098] 可以通过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）来实现核酸扩增。多种扩增方法是本领域中已知的，并且记载于美国专利 No. 4, 683, 195 和美国专利 No. 4, 683, 202 等。已经开发出 PCR 扩增方法来扩增出多至 22kb 的基因组 DNA。这些方法及 DNA 扩增领域中已知的其它方法可以在本发明的实践中使用。可以通过使用源自本文中提供的序列的引物自所述事件扩增此类序列，接着对 PCR 扩增子或克隆的 DNA 进行标准的 DNA 测序来确认（若必要的话，校正）来自主题大豆事件的异源转基因 DNA 插入物或侧翼基因组序列的序列。

[0099] 可以通过多种技术来检测通过这些方法生成的扩增子。琼脂糖凝胶电泳和用溴化乙锭染色是一种用于检测 DNA 扩增子的常见的公知方法。另一种此类方法是遗传比特分析（Genetic Bit Analysis），其中设计如下的 DNA 寡核苷酸，其与相邻的侧翼基因组 DNA 序列和插入的 DNA 序列两者重叠。将寡核苷酸在多孔板的孔中固定化。在感兴趣区域的 PCR 后（使用插入序列中的一条引物和相邻侧翼基因组序列中的一条引物），单链 PCR 产物可以与固定化的寡核苷酸杂交，并且充当使用 DNA 聚合酶和对预期的下一个碱基特异性的经标记 ddNTP 进行的单碱基延伸反应的模板。读出可以是荧光的或基于 ELISA 的。由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸，信号指示插入物 / 侧翼序列的存在。

[0100] 通过提及而将本文中提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请、和出版物以它们不与本申请的明确教导矛盾的程度完整收入。

[0101] 包括以下实施例以例示用于实施本发明的规程，并且表明本发明的某些优选的实施方案。这些实施例不应解释为限制性的。本领域技术人员应当领会，以下实施例中公开的技术代表用于例示其实施的优选模式的具体方法。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应当领会，可以在不偏离本发明精神和范围的前提下对这些具体实施方案进行多种改变，而仍获得相同或相似的结果。除非另有指示，所有百分比按重量计，并且所有溶剂混合物比例按体积计，除非另有记录。

[0102] 除非另有指示，使用下列缩写。

[0103] AAD-12 芳氧基链烷酸酯加双氧酶 -1

[0104] bp 碱基对

[0105] ° C 摄氏度

[0106] DNA 脱氧核糖核酸

[0107]	DIG	洋地黄毒苷
[0108]	EDTA	乙二胺四乙酸
[0109]	kb	千碱基
[0110]	μg	微克
[0111]	μL	微升
[0112]	mL	毫升
[0113]	M	分子量
[0114]	OLP	重叠探针
[0115]	PCR	聚合酶链式反应
[0116]	PTU	植物转录单元
[0117]	SDS	十二烷基硫酸钠
[0118]	SOP	标准的操作规程
[0119]	SSC	含有氯化钠和柠檬酸钠混合物的缓冲溶液, pH 7.0
[0120]	TBE	含有 Tris 碱、硼酸和 EDTA 混合物的缓冲溶液, pH 8.3
[0121]	V	伏特

实施例

[0122] 实施例 1 :事件特异性 Taqman 测定法

[0123] 开发出事件特异性 **TAQMAN ASSAY®** 来检测大豆事件 DAS-68416-4 的存在, 并且测定育种群体中的植物的接合性状态。为了开发事件特异性测定法, 依照位于 5' 插入物与植物连接中的 DNA 序列设计特异性 Taqman 引物和探针。为了特异性检测大豆事件 DAS-68416-4, 使用两个特异性引物来扩增跨越此 5' 整合连接的 128-bp DNA 片段。通过由 Applied Biosystems 合成的靶物特异性 MGB 探针测量此 PCR 产物的扩增, 所述探针在其 5' 端含有 FAM 报告物。针对 15 种不同 aad-12 大豆事件和非转基因大豆品种 (Maverick) 以双重形式用大豆特异性内源参照基因凝集素测试大豆事件 DAS-68416-4 的此 Taqman 检测方法的特异性。

[0124] 实施例 1.1 :gDNA 分离

[0125] 在此研究中测试 15 种不同 AAD-12 大豆事件和非转基因大豆品种的 gDNA 样品。使用 Qiagen DNeasy 96 植物试剂盒来提取基因组 DNA。使用改良的 Qiagen DNeasy 96 植物试剂盒方案, 使用新鲜的大豆叶盘 (每个样品 8 个) 来进行 gDNA 提取。依照售主的用法说明书 (Molecular Probes, Eugene, OR) 用 Pico Green 法量化 gDNA。出于本研究的目的, 用无 DNA 酶的水稀释样品, 导致 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ 的浓度。

[0126] 实施例 1.2 :Taqman 测定法和结果

[0127] 对大豆事件 DAS-68416-4 特异性 Taqman 测定法设计特异性 Taqman 引物和探针。这些试剂可以与下文所列的条件一起使用以检测大豆事件 DAS-68416-4 内的 aad-12。表 1 列出了为了检测事件 DAS-68416-4 特异性开发的引物和探针序列。

[0128] 表 1 :PCR 引物和探针

[0129]

事件靶反应		
名称	描述	5'至3'序列

[0130]

Soy416-F	正向引物	SEQ ID NO:2 GGGCCTAACTTTTGGTGTGATG
Soy416-R	反向引物	SEQ ID NO:3 TACTTGCTCTTGTCGTAAGTCAATAAATT
Soy416-探针	探针	SEQ ID NO:4 FAM- TTCAAGCACCAGTCAGCAT-MGB

[0131]

凝集素参照系统反应		
名称	描述	5'至3'序列
ZN_007	正向引物	SEQ ID NO:5 TCCCGAGTGGGTGAGGATAG
ZN_008	反向引物	SEQ ID NO:6 TCATGCGATTCCCCAGGTAT
ZN_LT_002	探针	SEQ ID NO:7 HEX-TTCTCTGCTGCCACGGGACTCGA-BHQ1

[0132] 用于扩增的多重 PCR 条件如下:25 μ l 总反应中的 1X PCR 缓冲液、.5-2.5mM $MgCl_2$ 、.2mM dNTP、0.2 μ M 引物 Soy416-F、0.2 μ M 引物 Soy416-R、0.2 μ M 引物 ZN_007、0.2 μ M 引物 ZN_008、0.08 μ M Soy416-探针、0.08 μ M ZN_LT_002、40U/mL HotStart Taq、30ng gDNA。使用下列条件扩增混合物:i)95° C 持续 15 分钟,ii)95° C 持续 20 秒,iii)60° C 持续 60 秒,iv)重复步骤 ii-iii 达 35 个循环,v)4° C 保持。在 BIO-RAD ICYCLER™和 ABI Gene Amp PCRSystem 9700 热循环仪上实施实时 PCR。数据分析基于循环阈值 (CT) 的测量,所述循环阈值 (CT) 是在荧光测量达到设定值时的 PCR 循环数目。通过 iCycler 软件自动计算 CT 值。针对 16 种不同 aad-12 大豆事件和非转基因大豆品种以双重形式用大豆特异性内源凝集素作为参照基因测试大豆事件 DAS-68416-4 的 Taqman 检测方法。此测定法特异性检测大豆事件 DAS-68416-4,并且不产生或放大来自对照 (即,15 种不同 aad-12 大豆事件和非转基因大豆品种) 的任何假阳性结果。可以使用事件特异性引物和探针来检测大豆事件 DAS-68416-4,并且这些条件和试剂可适用于接合性测定法。

[0001]

序列表

<110> 陶氏益农公司 (Dow AgroSciences, LLC)

<120> AAD-12 大豆事件 416 的检测 (DETECTION OF AAD-12 SOYBEAN EVENT 416)

<130> DAS-P0170-01

<150> 61/263,950

<151> 2009-11-24

<150> 61/327,369

<151> 2010-04-23

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10212

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对大豆事件 DAS-68416-4 的插入和侧翼序列 (Insert and Flanking sequences for Soybean Event DAS-68416-4)

<400> 1

ctgtcgttgg aticacagaa catigacgcc agtttccact tegtatctt tgaatcatt	60
aaaatcgant cctccaceta tacccccca tttttctaat ccatcataat canaatcat	120
aaaigaatca gtiaaccatta ccatatacc tttttgaaa tgagttagaa taatcagtat	180
ctttagaaaa ctatlaaga aattaaataa aaatatttta tcatgaagat gagtgaaga	240
aaaattatga aaagtataac ttatatacatt tctataaaat tttttttct tttatttct	300
taattaatat cctaagtaaa tgagttaata ttatctttc aaaaattctt atagtcgcca	360
attattttc ccatgcaatg acaacttgc cgtattctac gtgtaggtt aggcaccctg	420
cagagacaaa ttgccttgag acaaatcaa tagagaaccc tccaaggga ccatataaa	480
tagagaactt tcatlaaccg ataagccaca ccttticaat caaacacaaa cactigaagl	540
actaagttag tgggttagg caaattact atggcttcgt ttgtttctag attgacaatt	600
tgtttggctc tgtttgtcct catatggggg agtgccaatg cacaacttc tacaacttt	660
tactaccatt catgtccaaa cctttctcc totgtgaaat ccacagtcca atctgccata	720
tctaggaga cccgatggg tgcctctct cttcgttgt tcttccacga ttgccttgc	780
aatgtaattt atttgacct tctccacct acatacaaat atgctaagct tacatatagc	840
tcctctttct accacttgc tgcctcatct aattttgtt gaaacaacac ttgtctctt	900
tattatacac atcatctttg ataaaattt gtctgttgc acttttttt agtgtgttaa	960
tcagtctat gatgatacta ttagttaaga aattttaatg cacttaataa accatttta	1020
gtactttaac cgttcaatga tattatata ttaagatan taatatttc tgcctttgt	1080
tctataattg tttagttaag aaccttcta cttcttagct agctaaatat taatgagtaa	1140
acattacaa atgcaggat gtgttggtc aattctattg gatgacacat caagcttcac	1200
cggagagaag aacgcaaacc ccaacaggaa ctctgcctgt ggattcgagg ttattgacaa	1260
catlaaatca gccgtggaga aagtgtgtcc aggagttgtt tcttgcgag atatccttgc	1320
catcgttccc agagactctg ttcatattgt aagtgttcaa acaaccaaca aaacacatt	1380
aaactaaac attaaattgt acatataaa attaattacc aatttagtac cacacatgca	1440
attaaagaga acattttgtt gattttagc aatatagctt ggaggcccta catggaatgt	1500
taactttga agaagagacg ctagaactgc tagccaatct gctgctaaca atggcatccc	1560
tgcaccact tcaaacctta accaactcat ctcaagattt agcgcctttg gactttcac	1620

[0002]

caaggacttg gtcgcttigt cgggtacaaa acatataatca cataatttgc caattaattta	1680
catttcaatc atataglaaa atttctcaat taatttaggaa catgagaaac ttatagtcac	1740
acgttctttt gttgaggaaat attgcatggc ttaattttgc ttctattagg tggtcacaca	1800
attggacaag caagggtcac aaacttcaga gcccgcatct acaacgagac caacatagaa	1860
accgcatttg caaggactag gcagcaaagc tggcotagaa catcagggtc aggggacaaac	1920
aatctggcac cacttgatct tcaaaactcca accagctttg acaactacta cttaagaac	1980
ctcgttcaga agaagggtct cctccactct gatcagcaac tgttcaacgg tgggtccacc	2040
gactccattg tgcgttgcta cagcaccaac ccgggcacct tctcctciga ttccgcgcgc	2100
gccalgaica agaaggaga callagictt ctcaciggtc ccaalggaga aalcagggaag	2160
aatgttagaa ggattiaacta atttgattca gtcctgaata ttaagggtcc tacacatacg	2220
caagcaattt aattgtgttt aataagttgt taaaacatgt ttgtgttgta ttgttgattc	2280
ctaggttagt ttgggtgac accgctgtct actttaggtt gttctacttc cttttatttt	2340
tggttctttt ttactttttc ctiaactata ttgtaggaaa aaaaaaacc ttalcaagc	2400
atttatcaag aacggagtgt gctttttaat ttcccttcca taacattcca tcagaattca	2460
gttttgcctt tgccttctaa ttacgttcaa atcagggaag ataactcggtt aggtatata	2520
tacagtacc cttgcattgt cactgttgaa aaatataatc atacttaggt cggtaacant	2580
ttaaattatc attctcgtaa tcattagcta cttatgcact catafctgta tccgtacttt	2640
gctcttgtcg taagtcataa aattaatata aaaaaatcti taaaacttgt tacaactaaa	2700
ttaaaaaatt atttttaatt cattcaagca ccagtcagca tcatcacacc aaagtttagg	2760
ccgaatagt ttgaaattag aaagctcgca attgaggtct acaggccaaa ttctgtctta	2820
gccgtacaat atttaccacc ggatcctaac cgggtgtgac atgggcgcgc attaaaaatc	2880
tcaattatat ttggtctaat ttggtttgtt attagtaaa acaaaatcga accaaaccaa	2940
aatataaata tatagttttt atatatatgc cttaagacti ttttatagaa ttttctttaa	3000
aaaatatcta gaaatatatt cgaactctct ggcatgtaat atttcgttaa atatgaagtg	3060
cctcattttt attaaactta aataatttgt tgtacgata ctttcttate aagtgttact	3120
aaaaatgcgc aatctctttg ttcttccata ttcatatgic aaaacctatc aaattcttta	3180
tatatctttt tcgaatttga agtgaatttt cgataattta aaattaaata gaacatatca	3240
ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa atttggttaa ctttgaaggt	3300
giacaicac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata aatatcatgt gttattaaaga	3360
aaatctctct ataagaatat tttaalagat catagttttg taaaaaaaat taatttttac	3420
taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaaagtta attaaaaata tattcatcta	3480
acaaaaaana aaccagaaaa tgcgtaaaaa ccggcaaaa cgaaccaatc caaacggata	3540
tagttgggtt ggtttgattt tgataataac cgaaccaact cggiccatth gcaccctaa	3600
tcataalagc tttaattttt caagatatia tttaagttac gtgtgcaata tcttggaatt	3660
tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat ttaaaagcag ctctgatgtgg	3720
tggtaataig taatttactt gattctaaaa aaatalecca agtattaata atttctgcta	3780
ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac aatgaaccat aaagtatttg	3840
aagctcgaaa tatcgaagg aacaaataat ttaaaaaaaa tacgcaatga ctltggaaca	3900
aagaaagta tatatttttt gtctttaaac aagcctccce cttaaaaaat ggcagttttc	3960
cittgcatgt aactattatg ctcccttctg tacaaaaatt ttggactact attgggaact	4020

[0003]

tcttctgaaa atagtggcca ccgttaatt aaggcgccgc atgccggggc aagcgccgcg	4080
acaagtittg acaaaaaagc aggtcccgcg gtgactgact gaaaagcttg tgcacctgca	4140
ggtaacgga tcaggatatt ctgttttaag aigttagaact ctatggaggt ttgtatgaac	4200
tgaatgacta ggaccggata agttcccttc ttcatacgca acttatitaa agaattgttt	4260
gtgtatcatt ctgtttacat tgtttttaat gaaaaataat tatgtgtcat tggactgaac	4320
acgagtitta aatatggacc agggcccaaa taagatccat tgatatatga attaaataac	4380
aagaataaat cgagtcacca aaccacttgc cttttttaac gagacttgtt caccaacttg	4440
atacaaaagt cattatccta tgcataatca taatcataca aaatatccca ataacactaa	4500
aaaaataaaa gaaatggata atttcacaa atgtttatcg ataaagaagi tacttttcca	4560
agaaatitac tgattttata agcccacttg catatagata atggcaaaaa aaacaaaaaa	4620
ggaaaagaaa taaagcagca agaattctag aaataacgaa atacgcttca atgcagtggg	4680
accacagggt caattattgc caattttcag ctccaccgta tttttaaaa ataaaacgat	4740
aatgttaaaa aaataaaaa cgtaacgaic gtaaaatcic aacggcigga tcttatgacg	4800
acgttagaaa atgtgtgttg tgcacgagtc agtaataaac ggcttcaaa tggttgcagc	4860
cggcacacac gagtcgtgtt tatcaactca aagcacaaat acttttcttc aacctaaaaa	4920
taaggcaatt agccaaaaac aactttgcgt gtaaacaaag ctcaatacac gtgtcatitt	4980
attattagct attgcttcc cgccttagct ttctcgtgac ctatgcttcc tegtcttttc	5040
ttcttctctc tctataaaac aatacccaaa gcttcttctt cacaattcag atttcaattt	5100
ctcaaaaatc taaaaacttt ctctcaattc tctctaccgi gatcaangta aattctgtg	5160
ttctttattc tctcaaaatc ttctgatttg ttctgttctg atcccaattt cgtatatgtt	5220
ctttgtttta gattctgita atcttagatc gaagacgatt ttctgggttt gatcgttaga	5280
tatcatctta attctcgatt agggtttcat aaataatcgc cgaattgttc aaataatttg	5340
agttttgtcg aataattact ctctgatttg tgatttctat ctatgcttgg tgttagtttc	5400
tagttttgtc gatcgaattt gtctgattaat ctgagttttt ctgatttaca gagatctcca	5460
tggtctcagc cactctccaa atcacaccca ctgggtccac ctgggtgtcc acagtcactg	5520
gtgttcaact tgcacacatt gacgatgtg gtcttgcctg cctccatgca gcttggcttc	5580
aaatgacact ctgtatcttc cctgggcaac acctcagcaa tgaccaacag attacctttg	5640
ctaaacgctt tggagcaatt gagaggattg gggagggtga cattgttgc atatccaatg	5700
tcaaggcaga tggcacagtg cggcagcact ctcttctctga gtgggatgac atgaigaagg	5760
tcaatgtggg caacaatggc tggcacgccc acataaccia catgccagtc atggctcaag	5820
gagctgtgtt cagcgcagaa gttgtccag cagttggggg cagaacctgc ttgtctgaca	5880
tgagggcagc ctacgatgcc ctgtatgagg caacctgtgc tcttgttca caaaggcttg	5940
ctcttcaact ccttgtgtat tctcagagca agttgggaca gtctcaacag gccgggtcag	6000
cttacaatag ttatggcag gacaccactg caactctctc cagaccattg gtaagggtgc	6060
atcttgagac tggaaaggccc agctcttga tggcccgcca tgcctatgcc atccctggca	6120
tggatgcagc tgaatcagag cgttctcttg aaggactgtg tgactgggcc tgcaggcttc	6180
ccagagtcga tgctaccaa tgggtctgtg gagaatgtgt ttgttgggac aaccgtgttt	6240
tgtctcaccg tcttgagccc tgggatttca agttgccag tttgaatgtg cactcagac	6300
tgtctgagc cccagaaact gagggtgtg ccttgggttg agtagttac ttatcaacct	6360
agagctcgtt caccagcata atttttatta atgtactaaa ttactgtttt gttaaatgca	6420

[0004]

atitgtcttt ctcgggattt taatatcaaa atctaittag aaatacaca tatitgttg	6480
caggcttgct ggagaatcga tcgtctatca taaaaattac aaaaaattt tattgcctc	6540
aattatttta ggattggtat taaggacgt taaaitattt gtcgggtcac tacgcatcat	6600
tgtgattgag aagaicagcg atacgaaata ttcgiagiac tatcgataat ttatttgaaa	6660
attcataaga aaagcaaacg ttacatgaat tgatgaaaca atacaaagac agataaagcc	6720
acgcacattt aggataitgg ccgagattac tgaatattga gtaagatcac ggaattctg	6780
acaggagcat gtcttcaatt cagcccaaat ggcagtigaa atactcaaac cgccccatat	6840
gcaggagcgg atcattcatt gtitgtttgg ttgccittgc caacatggga gtccaagggt	6900
gcggccgcgc gccgaccag ctltctlgia caaaglggtt gcggccgctt aatlaaattt	6960
aaaigcccg gcgtttaanc gcggccgctt aaitaaggcc ggccigcagc aaaccagaa	7020
ggtaattatc caagatgtag catcaagaat ccaatgttta cgggaaaaac tatggaagta	7080
ttatgtlaagc tcagcaagaa gcagatcaat atgcggcaca tatgcaacct atgttcaaaa	7140
atgaagaatg tacagataca agatcciaia ctgccagaat acgaagaaga atacgiagaa	7200
attgaaaaag aagaaccagg cgaagaaaag aatctigaag acgtaagcac tgacgacaac	7260
aatgaaaaga agaagatag gtcggtgatt gtgaaagaga catagaggac acatgtaagg	7320
tggaaaatgt aagggcggaa aglaacctta tcacaaagga atcttatccc cactactta	7380
tccttttata ttttccgtg tcaittttgc ccttgagttt tccatatata ggaaccaagt	7440
tcggcatttg tgaacaacag aaaaaattg gtgtaaagcta ttttctttga agtactgagg	7500
atacaacttc agagaaattt gtaagtgtgt agatctccat gtctccggag aggagaccag	7560
ttgagattag gccagctaca gcagctgata tggccggcgt ttgtgatata gtaaccatt	7620
acattgagac gtctacagtg aacttttaga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg	7680
atgatctaga gaggttgcaa gatagatacc ctgtgtgtgt tgcgagggtt gagggtgttg	7740
tggctggtat tgcctacgtt gggccctgga aggetaggaa cgtttacgat tggacagttg	7800
agagtactgt ttactgtica cataggcatc aaaggittgg cctaggatcc acattgtaca	7860
cacatttgc ttaagtciatg gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttgc tttataggcc	7920
ttccaaacga tccaicgtt aggttgcatt aggetttgg atacacagcc cggggtacat	7980
tgcgcgcagc tggatacaag catggtgat ggcattgat ttgtttttgg caaagggtt	8040
ttgagttgcc agctctcca aggccagttt gccagttac ccagatctga ggtacctga	8100
gcttgagctt atgagctat gagcttagag ctcggatcca ctagtacgg ccgccagigt	8160
gcgtgaaltt gcccttgaat agataggcgc ccagatcgcc ggcaatagct tcttagcgcc	8220
atcccgggtt gatcttatct gtgttgaaat agttgcggtg ggcaaggctc tctttcagaa	8280
agacaggcgg ccaagggaac ccaaggtag gtgggtctat gctctcagtt ccttgtgaa	8340
gcgtttggc taagggtcag aggtgttagc gggatgaagc aaaagtgtcc gatgttaaca	8400
agataigtgt atcciacgia aggatattaa agiatgtatt caticacaa ataatcagtg	8460
tattccaata tgtactacga ttccaatgt ctttatgttc gccgtatgta atcgcgctca	8520
caaaaataac cccggtgact ttcttttaat ccaggatgaa ataatatgtt attataattt	8580
ttgcgatttg gtccgttata ggaattgaag tgtgtgtcgt gtgccacca ctccatttc	8640
ataailliac aigtattga aaaataaaaa illatgggtt tcaatllaaa cacgtatctt	8700
tgtaaagaat gatacttga aagaaatata gttttaaata ttatgtataa aataacaagt	8760
caggtattat agtccaagca aaaacataaa ttatitgatg caagtittaa ttcagaaata	8820

[0005]

```

titcaataac tgattatata agciggtaca ttgccgtaga tgaagacig agtgcgatat 8880
taaggigttaa tacatagcgg cegggtttct agtcacoggt taggatccgt ttaactega 8940
ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga tgettggtaa taattgtcat 9000
tagattgitt ttaatgcatag atgcactcga aatcagccaa ttttagacaa gtatcaaacg 9060
gatgtgactt cagiacatta aaaacgtccg caatgtgtta ttaagttgtc taagcgtaaa 9120
taitttaatt cttaacaatc aatatittaa ttcttaaaact ttattaaatc taacaataaa 9180
cigtaagaac taattcttaa acticaataa acaatactgc gttttagtaa ttaaattaat 9240
aataataga tatagatata taattgtca acatactctt acctattttt ccattgaaat 9300
atgttagcaa gtcaaaaaa aglttgaca aaaaactcta ctacttttg tticatttac 9360
ttatgtgag ggataataa gtaataaac atttagttta tttaagaaa ataaaaagt 9420
taatttctct ttctgccact gatactctat ggtagagaga tccgatgcag tggtagagcc 9480
tggcctcgac acataagigt gacgacgcag ctgtgaaga gatctgattc gacggtgggg 9540
taatgcaagg tggtagacag gttagatgggt ggagaagacg taattgttac cgccgtcaac 9600
ggaggaaagg gcaagatgt ctctatgtg aaaaattatg ggttagatg ccgtttcatt 9660
cccttaaaa aaatcccttg atggttgcaa tgcataataa aaattgaaa aataattaat 9720
tgttcaatt aaagatttag catgaaaaa aaacactta attgtgcca tgactccatg 9780
acctgcgtaa cttaggaagg aaaggaattt ttgtgcaaa ggaaggcatg ggaagatgag 9840
agaggagaga gaatcagtg aagtagaga aattaacttt tgtttttta aaactaaat 9900
attatattac taitatata atatatatat atatatataa gatttttag ctggattctt 9960
gataaaaaa atttctcacc atattatta ttatatatt ttgtggagat ctcaaaaaag 10020
gaagtggat ttcttctcaa taactctaaa aaattatcc tattcaaaa aatattttt 10080
atgtcttct cttaattgag aataatatct atttaagta attttatgt gaaatccaca 10140
aaagtgactg ataaactaa tttaggatct accttagag aaaaataaa aaattcttat 10200
attatgtg at 10212

```

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 事件引物(event primer)

<400> 2
 gggcciaact ttgggtgta tg 22

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 事件引物(event primer)

<400> 3
 tacttgcctc tgcgtaagt caataaatt 29

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列 Listing

<220>

[0006]

<223> 事件探针(event probe)

<400> 4

ttcaagcacc agtcagcat

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝集素参照引物(Lectin Reference primer)

<400> 5

tcccagatgg gtgaggatag

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝集素参照引物(Lectin Reference primer)

<400> 6

tcattgcatt cccaggtat

20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝集素参照探针(Lectin Reference probe)

<400> 7

ttctctgtg ccacgggaet cga

23

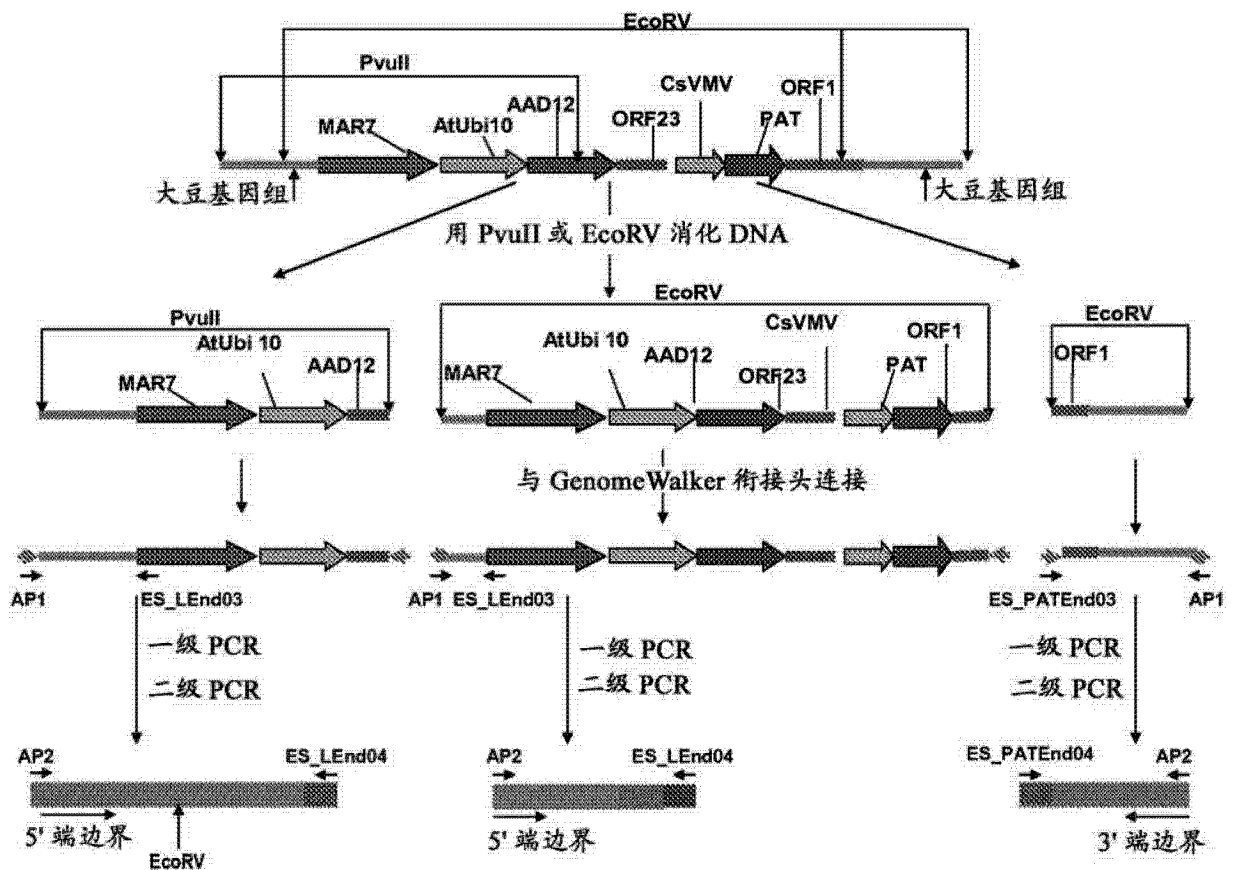


图 1

图 1 :将大豆事件 DAS-68416-4 的基因组 DNA 用 EcoRv 或 PvuII 消化,并用于生成相应的 GENOMEWALKER 文库,其作为模板使用以扩增靶 DNA 序列。

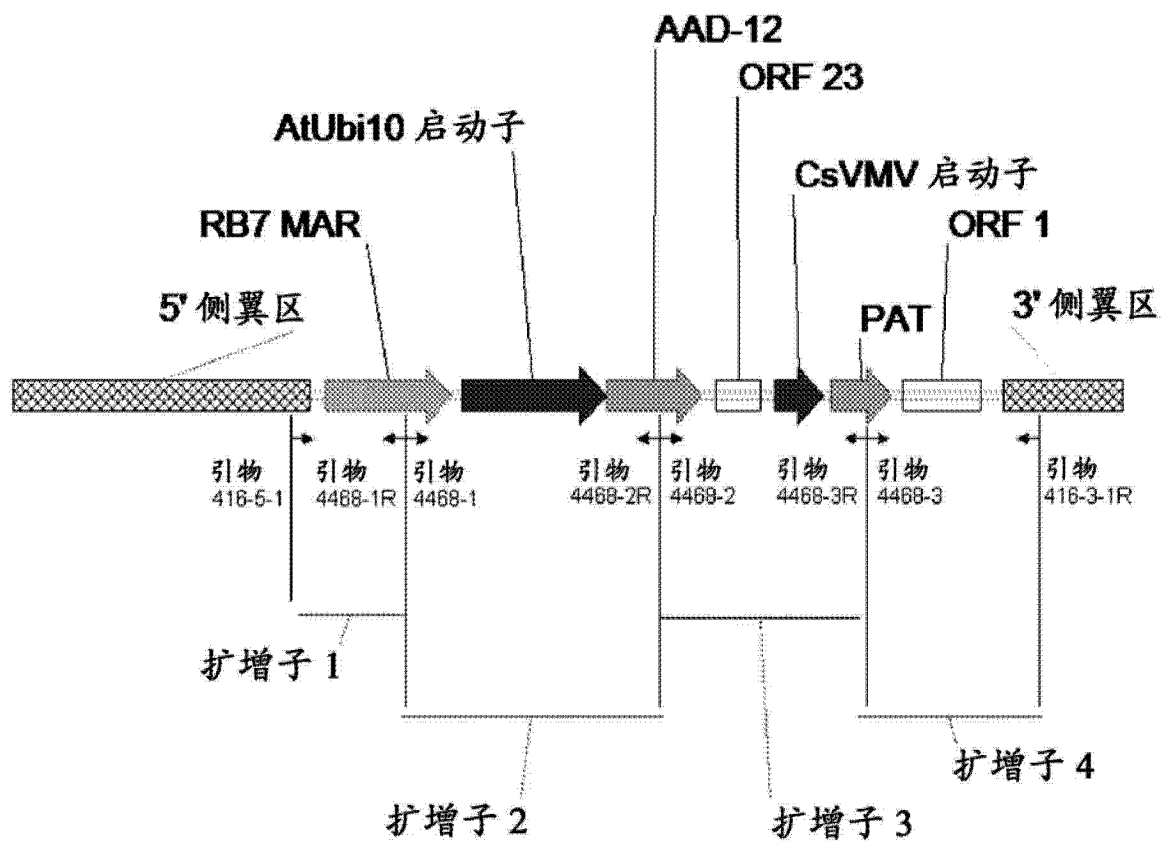


图 2

图 2:示意图描绘了用于从 5' 至 3' 边界对大豆事件 DAS-68416-4 的全长测序的引物位置和克隆策略。

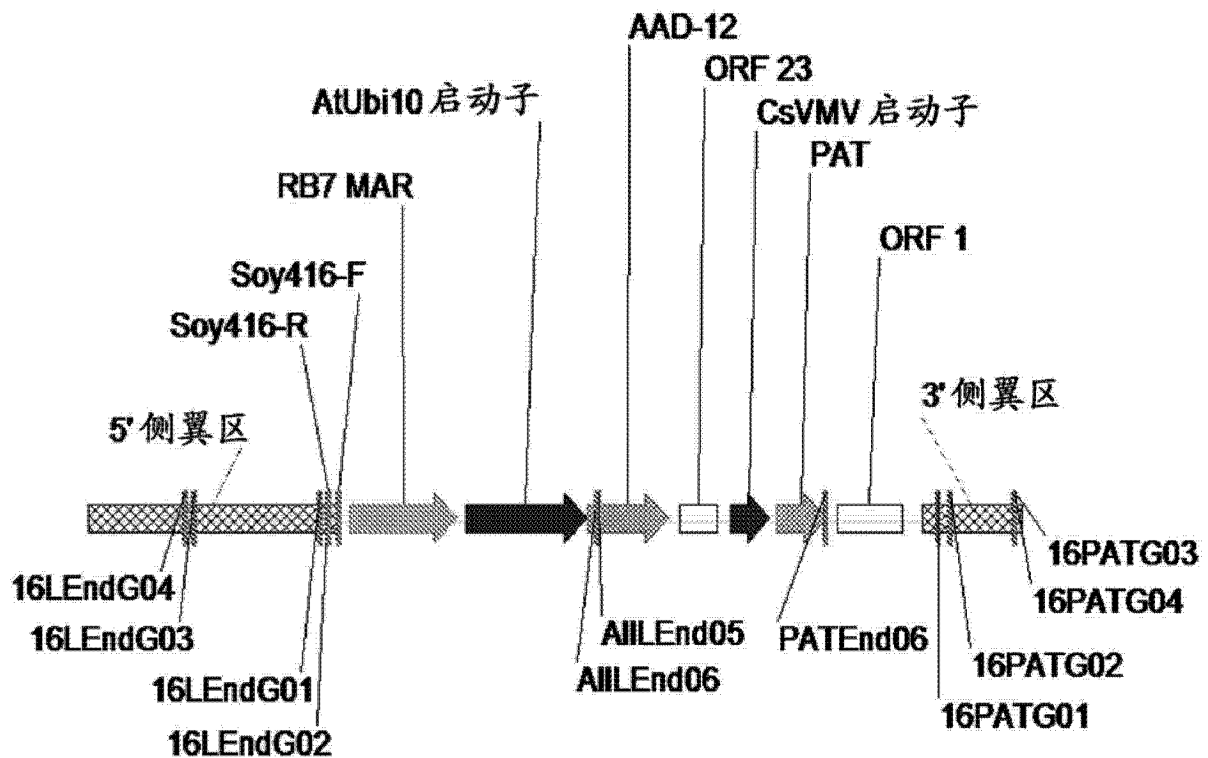


图 3

图 3 :示意图描绘了用于确认大豆事件 DAS-68416-4 的从 5' 至 3' 边界的全长序列的引物位置。

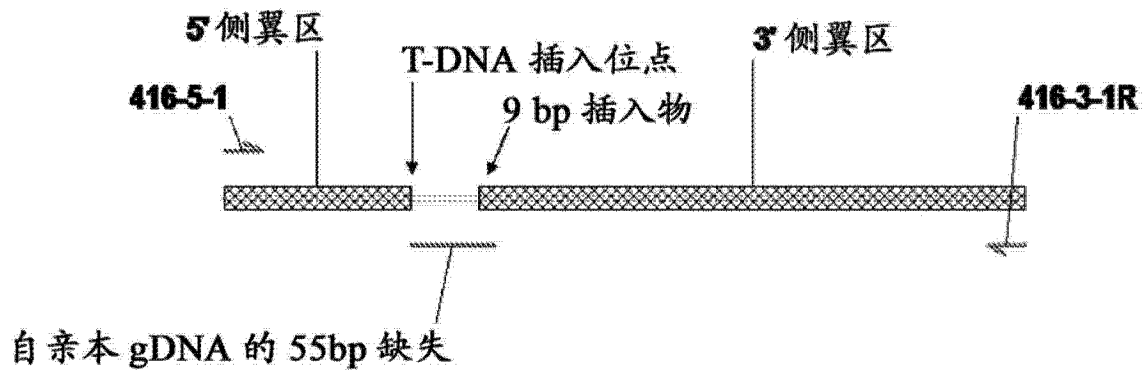


图 4

图 4 :示意图描绘了用于确认 AAD-12 大豆事件 DAS-68416-4 的插入位点序列的引物位置。