



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103561564 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201180066807.X

(22)申请日 2011.12.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103561564 A

(43)申请公布日 2014.02.05

(30)优先权数据

61/419,706 2010.12.03 US

61/471,845 2011.04.05 US

61/511,664 2011.07.26 US

61/521,798 2011.08.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/063129 2011.12.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/075426 EN 2012.06.07

(83)生物保藏信息

PTA-11334 2010.09.14

PTA-11335 2010.09.14

PTA-11336 2010.09.14

PTA-11337 2010.09.14

PTA-12262 2011.11.18

PTA-11602 2011.01.21

PTA-12006 2011.07.21

(73)专利权人 陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

专利权人 MS技术有限责任公司

(72)发明人 Y.崔 T.霍夫曼 N.周

S.N.诺瓦克 J.科隆

D.帕克赫斯特 S.托勒多 T.赖特

S.拉塞尔 B.海尔德 V.塞卡

(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

代理人 张永新

(51)Int.Cl.

A01H 5/00(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 1561167 A,2005.01.05,摘要.

US 2004031072 A1,2004.02.12,全文.

CN 101861392 A,2010.10.13,全文.

US 2010251432 A1,2010.09.30,全文.(续)

审查员 王涛

权利要求书3页 说明书52页

序列表29页 附图2页

(54)发明名称

叠加的除草剂耐受性事件8264.44.06.1、相
关转基因大豆系、及其检测

(57)摘要

本发明部分涉及大豆事件pDAB8264.44.06.1,
并且包括新颖的表达盒和转基因插入物,其包含
赋予对草甘膦、芳氧基链烷酸酯、和草丁磷除草
剂的抗性的多种性状。本发明还部分涉及控制抗
性杂草的方法、植物育种和除草剂耐受性植物。
在一些实施方案中,事件序列可以与其它性状
“叠加”,所述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。本发明进一步部分

涉及用于检测大豆及相关植物材料中的事件
pDAB8264.44.06.1的端点TaqMan PCR测定法。一
些实施方案可以实施对植物材料的高通量接合
性分析,并且可以使用其它实施方案来独特地鉴
定包含本发明事件的任何育种大豆系的接合性。
还提供了可用于进行这些测定法的试剂盒和条
件。

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Umezawa, T., et al. Glycine max cDNA,
clone: GMFL01-25-J19.《GenBank:
AK286292.1》.2008,序列部分.

Zabala, G., et al..Glycine max clone
BAC 71B1..《GenBank:EU721743.1》.2008,序列
部分.

1. 产生包含多个包含基因组的转基因大豆植物细胞的植物的方法,所述基因组包含与SEQ ID NO:14具有至少95%同一性的第一多核苷酸区段和与SEQ ID NO:15具有至少95%同一性的第二多核苷酸区段,所述方法包括种植包含SEQ ID NO:27的种子,从该种子栽培植物,并对所述植物应用除草剂以选择包含所述细胞的植物,其中所述除草剂选自下组:芳基氧基链烷酸酯、草丁磷、和草甘膦。

2. 权利要求1的方法,所述细胞进一步包含昆虫抗性基因。

3. 权利要求1的方法,其中所述植物对至少一种选自下组的除草剂有抗性:苯氧基乙酸除草剂、苯氧基丁酸除草剂、吡啶基氧基链烷酸除草剂、草甘膦除草剂、和草丁磷除草剂。

4. 一种分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸为选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:3-23和27。

5. 一种对大豆植物育种的方法,所述方法包括将包含SEQ ID NO:27的第一大豆植物与第二大豆植物杂交以生成包含基因组的第三大豆植物,并对所述第三大豆植物测定所述基因组中SEQ ID NO:27的存在。

6. 权利要求5的方法,其中使用所述方法将除草剂耐受性性状基因渗入大豆植物中。

7. 一种控制杂草的方法,所述方法包括对田地应用苯氧基乙酸、苯氧基丁酸、吡啶基氧基链烷酸、草甘膦、双丙氨膦、膦丝菌素或草丁磷除草剂中的至少一种,所述田地包含大豆植物,所述大豆植物包含SEQ ID NO:27。

8. 权利要求7的方法,其中所述方法包括同时应用至少两种所述除草剂。

9. 权利要求7的方法,其中所述方法包括序贯应用至少两种所述除草剂。

10. 权利要求7的方法,其中所述苯氧基乙酸除草剂选自下组:2,4-D和MCPA;所述苯氧基丁酸除草剂选自下组:2,4-DB和MCPB;且所述吡啶基氧基链烷酸除草剂选自下组:定草酯和氟草烟。

11. 权利要求7的方法,其中所述方法包括对所述田地应用至少一种另外的除草剂。

12. 权利要求11的方法,其中所述至少一种另外的除草剂是麦草畏。

13. 一种控制田间杂草的方法,所述方法包括对田地应用苯氧基乙酸、苯氧基丁酸、吡啶基氧基链烷酸、草甘膦和/或草丁磷除草剂,并在应用所述除草剂的14天内在田间种植包含SEQ ID NO:27的种子,其中SEQ ID NO:27的编码序列包含SEQ ID NO:13的残基2026-9222。

14. 权利要求13的方法,其中在所述种植步骤前实施所述应用步骤。

15. 权利要求7的方法,其中在所述大豆植物的顶部上应用所述至少一种除草剂。

16. 一种用于鉴定样品中的事件pDAB8264.44.06.1的方法,所述方法包括用探针或至少一种引物检测如存在于在ATCC保藏号PTA-11336保藏的种子中的pDAB8264.44.06.1的交接序列,所述探针或至少一种引物特异性结合或扩增所述交接序列,所述交接序列由SEQ ID NO:14的残基570-571,或SEQ ID NO:15的残基220-221组成。

17. 权利要求16的方法,所述方法进一步包括用至少两种引物使用聚合酶链式反应从存在于所述样品中的核酸扩增DNA片段,其中第一引物特异性结合SEQ ID NO:13内的插入物序列或其互补物,而第二引物特异性结合选自下组的侧翼序列内的序列:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

18. 一种用于测定包含如存在于在ATCC保藏号PTA-11336保藏的种子中的大豆事件

pDAB-8264.44.06.1的大豆植物的事件接合性的方法,所述事件包含转基因构建体,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,所述方法包括:

从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生成接触的样品:

a. 第一事件引物和第二事件引物,其中所述第一事件引物特异性结合所述转基因构建体,所述第二事件引物特异性结合所述5'大豆基因组侧翼DNA或所述3'大豆基因组侧翼DNA,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,其中所述第一事件引物和所述第二事件引物选自下组:SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;

b. 参照正向引物和参照反向引物,其在受到TaqMan PCR条件处理时从内源大豆参照基因GMFL01-25-J19生成参照扩增子,其中所述参照引物选自下组:SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25;

c. 包含SEQ ID NO:20的荧光事件探针,其与所述事件扩增子杂交,

d. 包含SEQ ID NO:26的荧光参照探针,其与所述参照扩增子杂交;

使所述接触的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和杂交的荧光参照探针的荧光比率测定pDAB8264.44.06.1的接合性。

19. 权利要求18的方法,其中所述扩增子由50-150个残基组成。

20. 权利要求18的方法,其中所述5'侧翼大豆基因组DNA由SEQ ID NO:1组成,且所述3'侧翼大豆基因组DNA由SEQ ID NO:2组成。

21. 权利要求18的方法,其中所述第一事件引物结合SEQ ID NO:13,且第二事件引物结合SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2,或其互补物。

22. 权利要求18的方法,其中所述方法用于所述事件对另一种大豆系的育种基因渗入。

23. 权利要求22的方法,其中所述另一种大豆系缺乏所述事件。

24. 权利要求18的方法,其中所述参照基因包含选自下组的序列或在严格杂交条件下与该序列杂交:SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、和SEQ ID NO:26。

25. 权利要求18的方法,其中用荧光染料和淬灭剂标记所述探针。

26. 权利要求25的方法,其中所述事件探针包含所述事件探针5'端的FAM作为所述荧光染料和所述事件探针3'端的MGB淬灭剂。

27. 权利要求25的方法,其中在所述参照探针的5'端用HEX且在所述参照探针的3'端用Black Hole淬灭剂1(BHQ1)标记所述参照探针。

28. 权利要求18的方法,其中在读板仪中直接阅读所述方法的结果。

29. 权利要求18的方法,其中从田间的大豆植物获得所述DNA样品。

30. 一种用于实施权利要求18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。

31. 权利要求30的试剂盒,其中所述事件引物由SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19组成,所

述参照引物由SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25组成,所述事件探针由SEQ ID NO:20组成,且所述参照探针由SEQ ID NO:26组成。

32.一种用于实施权利要求16的方法的试剂盒,所述试剂盒包含所述探针或所述至少一种引物。

33.权利要求17的方法,其中所述扩增的DNA片段由7196个碱基组成。

34.一种与选自下组的序列相同的探针:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、及其互补物。

35.一种将转基因插入物插入大豆基因组的DNA区段中的方法,所述DNA区段含有包含SEQ ID NO:1的5'端和包含SEQ ID NO:2的3'端,其中所述插入物包含SEQ ID NO:13的残基2026-9222。

36.一种生成转基因大豆植物的方法,所述植物包含基因组,所述方法包括将转基因插入物插入所述基因组的DNA区段中,所述DNA区段含有包含SEQ ID NO:1的5'端和包含SEQ ID NO:2的3'端,其中所述插入物包含SEQ ID NO:13的残基2026-9222。

叠加的除草剂耐受性事件8264.44.06.1、相关转基因大豆系、 及其检测

[0001] 发明背景

[0002] 草甘膦(N-膦酰基甲基甘氨酸(phosphonomethylglycine)),即一种广谱除草剂,抑制5-烯醇丙酮酰莽草酸(enolpyruvylshikimate)-3-磷酸合酶(EPSPS),即一种在生成植物细胞中必需的芳香族氨基酸的莽草酸生物合成途径中的酶。对EPSPS的抑制有效破坏蛋白质合成,由此杀死受影响的植物细胞。由于草甘膦是非选择性的,它杀死杂草和作物植物两者。如此,当可以将作物植物修饰为对草甘膦有抗性,容许期望的植物幸免于对草甘膦的暴露时,它在作物植物的情况下是有用的。

[0003] 已经使用重组DNA技术来分离草甘膦抗性的突变体EPSP合酶。此类草甘膦抗性突变体EPSP合酶可以转化到植物中,并且对经转化的植物赋予草甘膦抗性。举例而言,自土壤杆菌(*Agrobacterium*)菌株CP4分离草甘膦耐受性基因,如美国专利No.5,633,435中所描述的。在此通过提及而并入此参考文献及本文中引用的所有参考文献。

[0004] 已经经由引入突变创建其它草甘膦耐受性基因。这些包括由Comai分离并记载于美国专利No.5,094,945,4,769,061和4,535,060的AroA基因。已经利用通过用丙氨酸残基取代氨基酸位置80和120之间的甘氨酸残基得到的单一突变体,如记载于美国专利No.5,310,667的。双重突变体已经记载于美国专利No.6,225,114和5,866,775,其中在上述突变外,将第二处突变(用苏氨酸残基取代位置170和210之间的丙氨酸残基)引入野生型EPSPS基因中。

[0005] 其它工作导致草甘膦抗性玉米的生成,其经由导入携带由GenBank登录号X63374编码的氨基酸序列的残基102(将苏氨酸改变为异亮氨酸)和残基106(将脯氨酸改变为丝氨酸)处的突变的经修饰的玉米EPSPS基因进行。参见美国专利No.6,566,587和6,040,497。

[0006] 在大豆中提供对草甘膦的抗性的事件的例子包括大豆系GTS40-3-2(Padgett等1995)、大豆事件MON89788(美国专利No.7,608,761),美国专利No.7,608,761涉及大豆事件MON89788,其中每种通过将cp4epsps基因插入大豆中生成。

[0007] 草甘膦耐受性耕种系统的普遍采用和草甘膦日益增加的使用已经促成近年来草甘膦抗性且难以控制的杂草的流行。在种植者面对草甘膦抗性杂草或向更难以控制的杂草物种的转变的地区,种植者可以通过与会控制漏过的杂草的其它除草剂罐混合或交替来补偿草甘膦的弱点。

[0008] 一种在许多情况中控制阔叶逃脱的流行的且有效的罐混合物(tankmix)配偶(partner)是2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)。2,4-D,其已经作为除草剂使用超过60年,提供对许多一年生、二年生、和多年生阔叶杂草(包括玉米、大豆和棉中的几种关键杂草)的广谱、出土后控制。中耕作物生产中受到2,4-D(560-1120g ae/ha比率)控制的关键杂草包括豚草(*Ambrosia artemisiifolia*)、三裂叶豚草(*Ambrosia trifida*)、瘤突苍耳(*Xanthium strumarium*)、藜(*Chenopodium album*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、番薯属(*Ipomoea*)物种、苘麻(*Abutilon theophrasti*)、小酒白草(*Conyza Canadensis*)、和决明子(*Senna obtusifolia*)。2,4-D提供对几种关键杂草的部分控制,所述杂草包括宾夕蓼

(*Polygonum pensylvanicum*)、春蓼(*Polygonum persicaria*)、丝路蓟(*Cirsium arvense*)、药用蒲公英(*Taraxacum officinale*)、和苋属(*Amaranthus*)物种,包括西部苋(*Amaranthus rudis*)和长芒苋(*Amaranthus palmeri*)。

[0009] 2,4-D的进一步使用的限制是其在双子叶作物如大豆或棉中的选择性是非常差的,并且因此2,4-D通常不在敏感性双子叶作物上(及一般不在其附近)使用。另外,2,4-D在禾本科作物中的使用稍受限于可以发生的作物损伤的性质。可以在种植不整地种植大豆和棉前使用与草甘膦组合的2,4-D来提供更稳健的烧毁处理;然而,由于这些双子叶物种对2,4-D的敏感性,这些烧毁处理必须在种植前至少14-30天发生(Agrilience,2005)。

[0010] 一种已经对其降解2,4-D的能力进行过广泛研究的生物体是真养产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*),其含有编码tfdA(Streber等,1987),即一种催化矿化途径中的第一步的酶的基因。(参见美国专利No.6,153,401和GENBANK登录号M16730)。已经报告了tfdA降解2,4-D(Smejkal等,2001)。与2,4-D相比,源自降解的产物具有很少至没有除草剂活性。tfdA已经在转基因植物中使用以在通常对2,4-D敏感的双子叶植物(例如棉和烟草)中赋予2,4-D抗性(Streber等(1989),Lyon等(1989),Lyon(1993),及美国专利No.5,608,147)。

[0011] 已经从环境中鉴定出许多编码能够降解2,4-D的蛋白质的tfdA型基因,并且将其存储于Genbank数据库中。许多同源物与tfdA类似(大于85%氨基酸同一性)。然而,存在许多如下的多核苷酸序列,其与tfdA具有显著较低的同源性(25-50%),但具有与 α -酮戊二酸双加氧酶Fe(II)双加氧酶有关的特征性残基。

[0012] 一个与tfdA具有低序列同一性(小于35%)的2,4-D降解基因的例子是来自食酸代尔夫特菌(*Delftia acidovorans*)的aad-12基因(美国专利申请2011/0203017)。aad-12基因编码S-对映体特异性 α -酮戊二酸依赖性加双氧酶,其已经在植物中使用以赋予对某些苯氧基生长素除草剂,包括但不限于:苯氧基乙酸除草剂诸如2,4-D和MCPA;及苯氧基丁酸除草剂,诸如2,4-DB和MCPB)和吡啶基氧基链烷酸除草剂(例如,吡啶基氧基乙酸(pyridyloxyacetic acid)除草剂,诸如定草酯(triclopyr)和氟草烟(fluroxypyr)),且包括活性成分的酸、盐、或酯形式的耐受性。(参见例如W02007/053482)。

[0013] 草丁磷(Glufosinate-ammonium)(“草丁磷(glufosinate)”)是膦丝菌素类除草剂中的一种非系统性、非选择性除草剂。主要用于一大批阔叶和多草杂草的出土后控制的L-膦丝菌素(草丁磷中的活性成分)经由对谷氨酰胺合酶(一种对于植物中的氨解毒必需的酶)的不可逆抑制来控制杂草。草丁磷除草剂是例如在商标名称Ignite®、BASTA、和Liberty®下商业出售。

[0014] 从土壤细菌绿灰链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)分离的酶膦丝菌素N-乙酰基转移酶(PAT)通过乙酰化催化L-膦丝菌素转化为其无活性形式。表达PAT的基因的植物优化形式已经在大豆中使用以赋予对草丁磷除草剂的耐受性。草丁磷抗性大豆的一个此类例子是事件(event)A5547-127。最近,已经提出与草丁磷耐受性性状组合使用草丁磷除草剂为一种有效管理ALS和草甘膦抗性杂草的非选择性手段。

[0015] 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.Genet22:421-477,1988)。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。

[0016] 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(introgress)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。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明可以部分提供用于管理杂草抗性的有效手段,其有助于保护除草剂耐受性技术的有用性。本发明还可以给种植者提供杂草控制选项上的极大灵活性和便利。

[0019] 更具体而言,本发明部分涉及具有以登录号PTA-11336保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的代表性种子的称作pDAB8264.44.06.1的大豆(*Glycine max*)事件(“事件pDAB8264.44.06.1”)及其衍生的后代。本发明包括包含事件pDAB8264.44.06.1的大豆植物(并且包括包含在基因组区段中包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的转基因插入物的大豆植物)。

[0020] 存在于主题事件和保藏种子中的转基因插入物包含三种除草剂耐受性基因:aad-12、2mepsps、和pat基因。自食酸代尔夫特菌衍生的aad-12基因编码芳氧基链烷酸酯加双氧酶(AAD-12)蛋白,其赋予对例如2,4-二氯苯氧基乙酸和吡啶基氧基乙酸除草剂的耐受性。2mepsps基因,即一种自玉米分离的经修饰的EPSPS序列生成赋予对草甘膦除草剂的耐受性的蛋白质。来自土壤细菌绿灰链霉菌的pat基因赋予对除草剂草丁磷的耐受性。

[0021] 本发明的其它方面包括包含大豆事件pDAB8264.44.06.1的后代植物、大豆、种子、和/或植物和种子及后代的可再生部分,以及自其中任一项生成的食物或饲料产品。本发明还包括事件pDAB8264.44.06.1的植物部分(其包括但不限于花粉、胚珠、花、枝条、根、叶)、包含事件pDAB8264.44.06.1的营养细胞、花粉细胞、和其它植物细胞的核。本发明进一步涉及对多种除草剂,包括苯氧基乙酸除草剂、苯氧基丁酸除草剂、吡啶基氧基链烷酸除草剂、草甘膦、和/或草丁磷具有耐受性的大豆植物。此类大豆植物也可以与赋予对多种其它非选择性和选择性除草剂,包括但不限于麦草畏(dicamba)、咪唑啉酮、和HPPD除草剂的耐受性的基因叠加。本发明进一步包括新颖的遗传组成事件pDAB8264.44.06.1和包含事件pDAB8264.44.06.1的大豆植物的农艺学性能的方面。

[0022] 本发明部分涉及植物育种和除草剂耐受性植物。本发明包括大豆植物中的新颖转化事件,其包含插入大豆细胞基因组内的特定位点中的如本文中所描述的多核苷酸。

[0023] 在一些实施方案中,所述事件/多核苷酸可以与其它性状“叠加”,所述性状包括例如农艺学性状和/或昆虫抑制性蛋白质。然而,本发明包括具有单一事件的植物,如本文中所描述的。

[0024] 在一些实施方案中,主题除草剂耐受性事件可以在与昆虫抗性事件的育种叠加中组合。在这些中的一些实施方案中,昆虫抗性事件包含cry1F基因和cry1Ac基因。一些此类事件和叠加在本文中明确例示,包括大豆事件9582.812.9.1(“812事件”)和大豆事件

9582.814.19.1(“814事件”)。本发明中包括例如包含主题事件的任何组合的植物、植物细胞、和种子。在一些实施方案中,本发明包括单独的大豆事件9582.812.9.1(“812事件”),如下文更为详细讨论的。

[0025] 可以例如经由植物育种、含有事件DAS-8264.44.06.1的转基因植物的再转化、或经由同源重组通过靶向整合添加新性状来将其它性状叠加到植物基因组中,或者叠加到与事件pDAB8264.44.06.1相同的基因座中。

[0026] 其它实施方案包括切割事件DAS-8264.44.06.1的部分或整个转基因插入物和/或侧翼序列。切割后,可以将另一和/或别的插入物靶向至事件DAS-8264.44.06.1的特定染色体位点。可以替换例示的插入物,或者可以以此方式将其它插入物与主题大豆事件的例示插入物叠加。

[0027] 在一个实施方案中,本发明涵盖位于染色体6上的大豆染色体靶位点。在一些实施方案中,靶位点包含异源核酸。在一些实施方案中,大豆染色体靶位点位于SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中列出的基因组侧翼序列之间或之内。

[0028] 在一个实施方案中,本发明涵盖一种生成转基因大豆植物的方法,包含在染色体6上的某个位置处插入异源核酸。在另一个实施方案中,在染色体6上在多个例示的多核苷酸区段附近或之间插入异源核酸,如本文中所描述的。

[0029] 另外,本发明提供了用于检测(例如大豆)样品中主题事件的存在的测定法。该测定法可以基于插入大豆基因组中及在插入位点侧翼的基因组序列上的重组构建体的DNA序列。还提供了可用于进行所述测定法的试剂盒和条件。

[0030] 如此,本发明部分涉及整个例示的插入物及其边界区(在转基因大豆系中)的DNA序列的克隆和分析。这些序列是独特的。基于这些插入物和边界(及交接(junction))序列,可以生成事件特异性引物。PCR分析表明可以通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子鉴定所述事件。如此,可以使用这些和其它相关方法来独特鉴定包含本发明事件的大豆系。

[0031] 本发明还部分涉及用于检测事件8264.44.06.1的实时或端点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GMFL01-25-J19(GenBank:AK286292.1)参照基因在测定接合性中使用的用途。可以使用这些和其它相关方法来独特鉴定事件pDAB8264.44.06.1和包含该事件的育种大豆系的接合性。

[0032] 附图简述

[0033] 图1是pDAB8264的质粒图。

[0034] 图2是描绘大豆事件pDAB8264.44.06.1的引物位置的示意图。

[0035] 图3是描绘大豆事件pDAB8264.44.06.1中引物位置和基因组DNA缺失的示意图。

[0036] 图4是描绘用于大豆事件pDAB8264.44.06.1的TaqMan测定法检测的引物位置的示意图。

[0037] 序列简述

[0038] SEQ ID NO:1提供了主题大豆事件pDAB8264.44.06.1的5'侧翼边界序列。

[0039] SEQ ID NO:2提供了主题大豆事件pDAB8264.44.06.1的3'侧翼边界序列。

[0040] SEQ ID NO:3提供了引物4406_WF1。

[0041] SEQ ID NO:4提供了引物4406_WF2。

- [0042] SEQ ID NO:5提供了引物4406_WF3。
- [0043] SEQ ID NO:6提供了引物4406_WF4。
- [0044] SEQ ID NO:7提供了引物4406_WR5。
- [0045] SEQ ID NO:8提供了引物4406_WR6。
- [0046] SEQ ID NO:9提供了引物4406_WR7。
- [0047] SEQ ID NO:10提供了引物4406_WR8。
- [0048] SEQ ID NO:11提供了引物ED_v1_C1。
- [0049] SEQ ID NO:12提供了引物PAT_12。
- [0050] SEQ ID NO:13提供了质粒pDAB8264的序列。
- [0051] SEQ ID NO:14提供了部分5'大豆基因组侧翼和部分5'插入物序列。
- [0052] SEQ ID NO:15提供了部分3'大豆基因组侧翼和部分3'插入物序列。
- [0053] SEQ ID NO:16提供了跨越5'整合交接(junction)的98个碱基对序列。
- [0054] SEQ ID NO:17提供了跨越3'整合交接的131个碱基对序列。
- [0055] SEQ ID NO:18提供了引物4406_5'F。
- [0056] SEQ ID NO:19提供了引物4406_5'R。
- [0057] SEQ ID NO:20提供了探针4406_5'P。
- [0058] SEQ ID NO:21提供了引物4406_3'F。
- [0059] SEQ ID NO:22提供了引物4406_3'R。
- [0060] SEQ ID NO:23提供了探针4406_3'P。
- [0061] SEQ ID NO:24提供了引物GMS116F。
- [0062] SEQ ID NO:25提供了引物GMS116R。
- [0063] SEQ ID NO:26提供了探针GMS116Probe。
- [0064] SEQ ID NO:27提供了大豆事件pDAB8264.44.06.1的序列,包括5'基因组侧翼序列、插入物、和3'基因组侧翼序列。
- [0065] SEQ ID NO:28提供了大豆事件9582.812.9.1的预期序列,包括5'基因组侧翼序列、pDAB9582T-链插入物、和3'基因组侧翼序列。
- [0066] SEQ ID NO:29提供了大豆事件9582.814.19.1的预期序列,包括5'基因组侧翼序列、pDAB9582T链插入物、和3'基因组侧翼序列。
- [0067] 发明详述
- [0068] 本文中所描述的发明包括大豆植物(大豆)的新颖转化事件(event),其包含表达插入大豆细胞基因组内的特定基因座中的多种除草剂耐受性基因的盒。
- [0069] 包含事件pDAB8264.44.06.1的例示转基因插入物包含表达以下三种不同除草剂耐受性基因的遗传元件:(1)合成的aad-12基因;(2)来自玉米的EPSPS序列,其编码与野生型EPSPS多肽相比含有氨基酸残基102(从苏氨酸至异亮氨酸)和106(从脯氨酸至丝氨酸)处的突变的蛋白质,并且其赋予对草甘膦除草剂的抗性或耐受性;和(3)pat基因,其赋予对草丁膦除草剂的耐受性或抗性。aad-12基因自食酸代尔夫特菌衍生,并且编码芳氧基链烷酸酯(aryloxyalkanoate)双加氧酶(AAD-12)蛋白酶,其能够使具有 α -酮戊二酸模块的除草剂,包括苯氧基链烷酸酯除草剂(例如苯氧基乙酸除草剂诸如2,4-D和MCPA;苯氧基丙酸除草剂诸如二氯丙酸(dichloroprop)、2-甲-4-氯丙酸(mecoprop)、及其对映体;和苯氧基丁酸

除草剂诸如2,4-DB和MCPB)及吡啶基氧基链烷酸除草剂(例如,吡啶基氧基乙酸除草剂诸如定草酯(triclopyr)和氟草烟(fluroxypyr)),包括活性成分的酸、盐、或酯形式失活。

[0070] 更具体而言,本发明部分涉及转基因大豆事件pDAB8264.44.06.1、包含这些事件的植物系、和此插入物和/或其边界区的DNA序列的克隆和分析。可以使用本文中公开并提示的序列检测本发明的植物系。

[0071] 本发明部分涉及植物育种和除草剂耐受性植物。在一些实施方案中,所述多核苷酸序列可以与其它性状(例如,诸如其它除草剂耐受性基因和/或编码昆虫抑制性蛋白质或抑制性RNA序列的基因)“叠加”。然而,本发明还包括具有单一事件的植物,如本文中所描述的。

[0072] 在一些实施方案中,主题除草剂耐受性事件可以在与昆虫抗性事件的育种叠加中组合。在一些实施方案中,昆虫抗性事件选自下组:812事件和814事件(如下文更为详细定义的),其中每种包含cry1F基因和cry1Ac基因。本发明中包括例如包含主题事件的任何组合的植物、植物细胞、和种子。本发明还包括单独的新颖的812事件,例如,其在某些实施方案中包括植物、植物细胞、和种子。

[0073] 2011年4月5日提交的美国临时申请流水号61/471,845部分涉及包含大豆事件9582.812.9.1(812事件)的大豆系。包含此事件的大豆保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801University Boulevard,Manassas,VA,20110,并且公众在不受限制的情况下可获得(但是服从专利权利)。称为ATCC保藏号PTA-11602的保藏物在2011年1月20日制备。为了专利手续的目的,生成此保藏物,并且会依照布达佩斯条约关于种子保藏物的条款并在该条款下维持。

[0074] 美国临时申请流水号61/511,664(2011年7月26日提交)和61/521,798(2011年8月10日提交)部分涉及包含大豆事件9582.814.19.1(814事件)的大豆系。包含此事件的种子保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801University Boulevard,Manassas,VA,20110。ATCC于2011年7月21日收到保藏物ATCC专利保藏物名称PTA-12006。为了专利手续的目的,生成此保藏物,并且会依照布达佩斯条约关于种子保藏物的条款并在该条款下维持。

[0075] 本发明还包括例如包含SEQ ID NO:27(事件pDAB8264.44.06.1;4406事件)、SEQ ID NO:28(812事件)、和/或SEQ ID NO:29(814事件),以及与此类序列具有例如至少95%,96%,97%,98%,或99%同一性的这些序列的变体的植物、种子、和植物细胞。插入物序列在植物基因组内整合后发生一些变异(诸如一些区段的缺失)不是罕见的。例如,这在实施例7中更为详细地讨论。

[0076] 本发明还提供了用于检测样品中的主题事件的存在性的测定法。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性核酸分子,特别是那些完全或部分基于主题侧翼序列的核酸分子的方法。

[0077] 在一些实施方案中,可以将本文中例示或描述的多核苷酸区段(诸如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、和/或其间的插入物,例如如图2中描绘的)切出,随后与其它多核苷酸序列一起再靶向。

[0078] 在一些实施方案中,本发明涉及除草剂耐受性大豆系及其鉴定。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,用于检测所述事件的方法包括在内,并且例如有助于遵守要求例如自重组作物植物衍生的食物的上市前

批准和标记的规则。有可能通过任何公知的核酸检测方法诸如聚合酶链式反应(PCR)或使用核酸探针的DNA杂交检测主题事件的存在。本文中讨论了事件特异性PCR测定法。(关于另一个例子,参见例如Windels等(Med.Fac.Landbouww,Univ.Gent64/5b:459462,1999))。这些中的一些例子涉及使用跨越插入物和侧翼DNA之间的交接的引物组。更具体地,一个引物包含来自插入物的序列,而第二引物包含来自侧翼DNA的序列。

[0079] 本文中例示了大豆事件pDAB8264.44.06.1,以及其在世代间在大豆植物中的稳定性和表达方面的选择和表征。事件pDAB8264.44.06.1的两个侧翼序列都进行了测序,并且在本文中以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2描述。开发事件特异性测定法。还已经将它定位到大豆基因组(大豆染色体6)上。可以将事件pDAB8264.44.06.1基因渗入良种栽培种中,其中它会在近交系和杂种大豆系中赋予对苯氧基生长素、草甘膦和草丁磷除草剂的耐受性。

[0080] 主题EPSPS基因编码突变体5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)。野生型EPSPS基因最初自玉蜀黍(*Zea mays*)分离,并且序列在GenBank登录号X63374下存储。还可见美国专利No.6,566,587(具体是其中的SEQ ID No.3)。

[0081] 为了在植物中获得异源基因的高表达,可以优选的是再工程化所述基因,使得它们在植物细胞中更有效表达。对野生型植物EPSPS核苷酸序列的修饰在植物细胞中表达时可以提供此类抗性。如‘587专利中描述的,在比较EPSPS多肽与野生型多肽时,修饰为用异亮氨酸取代残基102处的苏氨酸并用丝氨酸取代蛋白质第106位的脯氨酸,结果是主题插入物中使用的双重突变体EPSPS多肽(2mEPSPS)。在植物细胞中表达时,它提供了对草甘膦的耐受性。或者,可以优化主题EPSPS基因(又称为“2mepsps基因”或DMMG)以改善在双子叶植物及单子叶植物两者中,且特别是大豆中的表达。可以基于优选的半子叶(hemicot)密码子选择选择密码子选择,即进行再设计使得蛋白质由具有单子叶和双子叶植物选择偏爱的密码子编码。可以除去有害的序列和多余的限制性位点以提高2mepsps编码序列的转录/翻译效率以及便于DNA操作步骤。主题单子叶植物基因的半子叶优化的型式进一步详述于U.S.S.N.13/303,502(2011年11月23日提交,要求2010年12月3日的优先权),题目为“OPTIMIZED EXPRESSION OF GLYPHOSATE RESISTANCE ENCODING NUCLEIC ACID MOLECULES IN PLANT CELLS”。

[0082] 如本文中先前提及的,将转基因导入并整合入植物基因组中牵涉一些随机事件(因此,名称“事件”代表表述的给定插入)。也就是说,凭借许多转化技术诸如土壤杆菌属(*Agrobacterium*)转化、“基因枪”和WHISKERS,无法预测转基因会在基因组中在何处被插入。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以是重要的。例如,可以设计如下的PCR引物,其生成在遍及插入物与宿主基因组的交接区的PCR扩增子。可以使用此PCR扩增子来鉴定独特或不同类型的插入事件。

[0083] 在将插入物导入植物细胞的基因组中的方法期间,发生对插入物和/或基因组侧翼序列的一些删除或其它改变不是罕见的。如此,本文中提供的质粒序列的相关区段可以包含一些微小的变异。这会适用于本文中提供的侧翼序列。如此,包含与主题侧翼和/或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发明的范围内。本发明序列的身份可以是与本文中例示或描述的序列具有至少65%序列同一性,更优选地至少70%序列同一性,更优选地至少75%序列同一性,更优选地至少80%同一性,且更优选地至少85%86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%序列同一性的多核苷酸序列。也可

以使用如本文中提供的杂交和杂交条件来限定本发明的此类植物和多核苷酸序列。可以就保藏种子而言确认包含侧翼序列加完整插入物序列的序列。

[0084] 因为“事件”最初是随机事件，所以作为本公开内容的一部分，包含事件pDAB8264.44.06.1的大豆系的至少2500个种子已经保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801University Boulevard,Manassas,VA,20110,并且公众在没有限制的情况下(但是服从专利权)可获得。保藏物已经称为ATCC保藏号PTA-11336.100袋(每袋25个种子)大豆种子(“大豆种子大豆:pDAB8264.44.06.1”)以Dow AgroSciences LLC和M.S.Technologies,Inc.的名义于2010年9月14日保藏。保藏物在2010年10月04日进行测试,并且在该日期,种子是能活的。为了专利手续的目的,生成此保藏物,并且会依照布达佩斯条约关于种子保藏物的条款并在该条款下维持。保藏物会在不受限制的情况中在ATCC保藏中心(其是一所公共保藏中心)维持一段30年的时间或者最近一次请求后维持五年或持续本专利的有效使用期(取较长者),并且如果保藏物在该期间变成无存活力,则会替换。

[0085] 作为本公开内容的一部分,包含事件pDAB9582.812.9.1和事件pDAB8264.44.06.1(主题除草剂耐受性事件和812昆虫抗性事件)的大豆系的至少2500个种子已经保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801University Boulevard,Manassas,VA,20110,并且公众在没有限制的情况下(但是服从专利权)可获得。保藏物已经由ATCC标示为“名称:pDAB9582.812.9.1::事件pDAB8264.44.06.1”。100袋(每袋25个种子)大豆种子(“大豆种子大豆:pDAB8264.44.06.1”)于2011年11月18日保藏。保藏物在2010年10月04日进行测试,并且在该日期,种子是能活的。为了专利手续的目的,生成此保藏物,并且会依照布达佩斯条约关于种子保藏物的条款并在该条款下维持。保藏物会在不受限制的情况下在ATCC保藏中心(其是一所公共保藏中心)维持一段30年的时间或者最近一次请求后维持五年或持续本专利的有效使用期(取较长者),并且如果保藏物在该期间变成无存活力,则会替换。

[0086] 保藏的种子是本发明的一部分。明显地,可以自这些种子种植大豆植物,并且此类植物是本发明的一部分。本发明还涉及这些大豆植物中含有的DNA序列,其可用于检测这些植物及其后代。本发明的检测方法和试剂盒可以涉及根据测试的最终目的,鉴定这些中的任一种、两种、或甚至所有三种事件。

[0087] 在本文中提供了定义和例子来帮助描述本发明,并且指导本领域普通技术人员实施本发明。除非另有记录,术语应当依照相关领域普通技术人员的常规用法理解。使用DNA碱基的命名,如于37CFR§1.822列出的。

[0088] 如本文中所使用的,术语“后代”意指包含大豆事件pDAB8264.44.06.1的亲本植物的任何世代的后代。

[0089] 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,来自所转化亲本的插入的转基因DNA和侧翼基因组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的一个亲本系(例如初始转化体和源自自交的后代)和不含所插入DNA的亲本系

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。

[0090] “交接序列”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交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,与各插入物的交接,或插入物与基因组序列的交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。

[0091] 本发明部分涉及使用此类侧翼、交接、和插入物序列的事件鉴定。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分析方法来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及其边界的扩增子进行。

[0092] 二元质粒pDAB8264(SEQ ID NO:13)包含图1中描绘的遗传元件。下列遗传元件(不包括T-链边界序列)包含在pDAB8264的T链区内。在表1中,就本文中公开的SEQ ID NO:13而言提供遗传元件的残基编号方式。

[0093] 表1:构成二元质粒pDAB8264(SEQ ID NO:13)的遗传元件的残基编号方式。

[0094]

遗传元件	位置	参考文献
RB7 MARv3 (基质附着区)	137 bp – 1302 bp	Thompson and Myatt, (1997) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 34: 687-692. ; WO9727207
居间序列	1303 bp – 1341 bp	不适用
组蛋白 H4A7 48 3'UTR (非翻译区)	1342 bp – 2002 bp	Chabouté 等, (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8: 179-191
居间序列	2003 bp – 2025 bp	不适用
<i>2mepsps v1</i>	2026 bp – 3363 bp	美国专利No. 6,566,587
<i>OTPc</i> (经优化的转运肽)	3364 bp – 3735 bp	美国专利No. 5,510,471
居间序列	3736 bp – 3748 bp	不适用
内含子2	3749 bp – 4214 bp	Chaubet等, (1992) <i>J. Mol. Biol.</i> , 225: 569-574
组蛋白 H4A7 48 启动子	4215 bp – 5169 bp	Chabouté 等, (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8:179-191
居间序列	5170 bp – 5261 bp	不适用
AtUbi 10 启动子(拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 泛素 10 启动子)	5262 bp – 6583 bp	Callis等, (1990) <i>J. Biol. Chem.</i> , 265: 12486-12493
居间序列	6584 bp – 6591 bp	不适用
<i>aad-12 v1</i>	6592 bp – 7473 bp	WO 2007/053482
在所有6框中含有终止密码子的居间序列	7474 bp – 7575 bp	不适用
AtuORF23 3' UTR (根癌土壤杆菌)	7576 bp – 8032 bp	美国专利No. 5,428,147

[0095]

(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 可读框 23 UTR)		
居间序列	8033 bp – 8146 bp	不适用
CsVMV 启动子(木薯叶脉花叶病毒启动子)	8147 bp – 8663 bp	Verdaguer 等, (1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 31: 1129-1139
居间序列	8664 bp – 8670 bp	不适用
<i>pat v6</i>	8671 bp – 9222 bp	Wohlleben 等, (1988) <i>Gene</i> 70: 25-37
在所有6框中含有终止密码子的居间序列	9223 bp – 9324 bp	不适用
AtuORF1 3'UTR (根癌土壤杆菌可读框1 UTR)	9325 bp – 10028 bp	Huang 等, (1990) <i>J. Bacteriol.</i> 172:1814-1822

[0096] SEQ ID NO:14和15分别是与插入物序列的5'和3'部分一起的5'和3'侧翼序列,如下文更为详细描述,并且如此包含插入物与基因组DNA的5'和3'“交接”或“过渡”序列。就SEQ ID NO:14而言,残基1-570是5'基因组侧翼序列,而残基571-859是插入物5'端的残基。就SEQ ID NO:15而言,残基1-220是插入物3'端的残基,而残基221-1719是3'基因组侧翼序列。如此,就插入物5'端而言的交接序列或过渡存在于SEQ ID NO:14的残基570-571。如此,就插入物3'端而言的交接序列或过渡存在于SEQ ID NO:15的残基220-221。本发明的多核苷酸包括那些包含例如交接序列任一侧的5,10,20,50,100,150,或200个碱基,或者可能更多个,以及其间的任何增量的多核苷酸。如此,跨越交接序列的引物可以包含例如会与侧翼序列杂交的5-10个碱基和会与插入物序列杂交的5-10个碱基。探针和扩增子可以类似地进行设计,尽管它们经常会比引物长。

[0097] 主题序列(包括侧翼序列)是独特的。基于这些插入物和边界序列,产生事件特异性引物。PCR分析表明可以通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子在不同大豆基因型中鉴定这些大豆系。如此,可以使用这些和其它相关规程来独特地鉴定这些大豆系。本文中所鉴定的序列是独特的。

[0098] 本发明的检测技术特别可用于与植物育种联合,从而在为了在后代中赋予一种或多种额外的感兴趣性状将包含感兴趣事件的亲本植物与另一植物系杂交后,测定哪些后代植物包含给定的事件。这些PCR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PCR检测试剂盒。这也可

以使产品注册和产物管理受益。

[0099] 此外,可以使用侧翼大豆/基因组序列来特异性鉴定每个插入物的基因组位置。可以使用此信息来生成每个事件特异性的分子标志物系统。这些可以用于加速的育种策略及建立连锁数据。

[0100] 此外,可以使用侧翼序列信息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)。

[0101] 根据本公开内容,应当清楚的是,本发明包括以ATCC保藏号PTA-11336可获得的种子。本发明还包括自以登录号PTA-11336保藏于ATCC的种子种植的除草剂耐受性大豆植物。本发明进一步包括所述植物的一部分,诸如叶、组织样品、由所述植物生成的种子、花粉等(其中它们包含侧翼有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的转基因插入物)。

[0102] 此外,本发明包括自保藏的种子种植的植物,优选地除草剂抗性大豆植物的子代和/或后代植物,其中所述植物具有包括可检测野生型基因组DNA/插入物DNA交接序列的基因组,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。

[0103] 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。例如,本发明包括具有本文中例示的任何植物作为一个或两个亲本的F₁杂种植物。通过本发明的此类F₁杂种生成的种子也在本发明内。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。本发明包括作为母本或父本的例示性植物。可以通过仔细考虑亲本植物来改善所得植物的特征。

[0104] 可以如下育种本发明的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;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。

[0105] 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。也涵盖与亲本植物回交和与非转基因植物的异型杂交,无性繁殖亦然。通常用于不同性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。

[0106] 本发明的DNA分子可以在标志物辅助育种(MAB)方法中作为分子标志物使用。本发明的DNA分子可以在鉴定遗传连锁的农艺学有用的性状的方法(诸如AFLP标志物、RFLP标志物、RAPD标志物、SNP、和SSR)中使用,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。

[0107] 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,其中所述方法包括将事件pDAB8264.44.06.1基因渗入大豆栽培种中。更具体地,本发明的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和其它植物。优选的方法进一步包括通过对所述后代分析依照本发明可检出的事件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/或用另外的除草剂耐受性性状依照本发明追踪。后一种的一个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。

[0108] 如此,本发明可以与例如编码草甘膦抗性(例如抗性植物或细菌草甘膦氧化酶(GOX))、草甘膦乙酰基转移酶(GAT)、其它草丁膦抗性(例如双丙氨膦抗性(bar))的其它性状、赋予乙酰乳酸合酶(ALS)抑制除草剂抗性(例如咪唑啉酮[诸如咪草烟(imazethapyr)]、磺酰脲、三唑嘧啶磺酰苯胺(triazolopyrimidine sulfonamide)、嘧啶基硫代苯甲酸(pyrimidinylthiobenzoate)、和其它化学品[Csr1, SurA等])的性状、溴草腈(bromoxynil)抗性性状(例如Bxn)、对麦草畏除草剂的抗性的性状(参见例如U.S. 2003/0135879)、对HPPD(4-羟苯基-丙酮酸-加双氧酶)酶抑制剂的抗性的性状、对八氢番茄红素去饱和酶(PDS)抑制剂的抗性的性状、对光系统II抑制性除草剂的抗性的性状(例如psbA)、对光系统I抑制性除草剂的抗性的性状、对原卟啉原氧化酶IX(PPO)抑制性除草剂的抗性的性状(例如PPO-1)和对苯基脲除草剂的抗性的性状(例如, CYP76B1)组合。一种或多种此类性状可以与本发明组合以提供有效控制、延迟和/或防止杂草转移和/或对多类除草剂的抗性的能力。

[0109] 本领域技术人员应当领会,本发明中使用的aad-12基因还提供对转化为苯氧基乙酸酯生长素除草剂(例如2,4-DB、MCPB等)的化合物的抗性。经由 β -氧化将存在于2,4-DB除草剂中的丁酸模块转化为植物毒性2,4-二氯苯氧基乙酸。同样地,经由 β -氧化将MCPB转化为植物毒性MCPA。丁酸除草剂自身是非除草性的,但是在易感性植物内通过 β -氧化被转化成其相应的酸形式,从而生成植物毒性的除草剂的乙酸形式。不能快速 β -氧化的植物不受丁酸除草剂伤害。然而,能够快速 β -氧化并且可以将丁酸除草剂转化成乙酸形式的植物随后通过AAD-12得到保护。

[0110] 应用除草剂的方法是本领域中公知的。此类应用可以包括超过一种除草剂的罐混合物。依照本发明使用的优选的除草剂是草甘膦、草丁膦、和苯氧基生长素除草剂(诸如2,4-D; 2,4-DB; MCPA; MCPB)的组合。其它优选的组合包括草甘膦及2,4-D或草丁膦及2,4-D混合物。可以以有利的组合使用这三种类型的除草剂,这鉴于本公开内容的益处对于本领域技术人员会是显而易见的。可以将一种或多种主题除草剂应用于田间/区域,之后将其以本发明的种子种植。例如,此类应用可以在种植本发明的种子的14天内。也可以在种植后但出土前应用一种或多种主题除草剂。也可以将一种或多种主题除草剂应用至地面(以控制杂草)或在杂草顶部上方和/或本发明的转基因植物顶部上方应用。可以将三种主题除草剂轮换或组合使用以例如,控制或防止可能耐受一种除草剂而不是另一种的杂草。可以以多种

方式使用三类主题除草剂的各种应用时间,如本领域中会知道的。

[0111] 另外,主题事件可以与一种或多种其它除草剂耐受性性状、一种或多种其它输入(例如,昆虫抗性(例如812事件或814事件)、真菌抗性、或应激耐受性等)或输出(例如,增加的产量、改善的油概况、改善的纤维质量等)性状(转基因的和非转基因的)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有害生物的能力的改善的作物质量的完整农艺学包装。

[0112] 经由同源重组在植物细胞的特定染色体位点内整合多核苷酸序列的方法在本领域内已经进行过描述。例如,如记载于美国专利申请公开文本No.2009/0111188A1的位点特异性整合描述了使用重组酶或整合酶来介导供体多核苷酸序列对染色体靶物的导入。另外,国际专利申请No.WO 2008/021207描述了锌指介导的同源重组以在基因组的特定位置内整合一个或多个供体多核苷酸序列。可以利用重组酶诸如如记载于美国专利No.6,720,475的FLP/FRT或如记载于美国专利No.5,658,772的CRE/LOX的用途来将多核苷酸序列整合入特定的染色体位点中。最后,大范围核酸酶用于将供体多核苷酸靶向入特定染色体位置中的用途记载于Puchta等,PNAS USA93(1996)第5055页-第5060页)。

[0113] 用于在植物细胞内的位点特异性整合的其它各种方法一般是已知的且可适用的(Kumar等,Trends in Plant Sci.6(4)(2001)第155页-第159页)。此外,已经在几种原核和低等真核生物体中鉴定的位点特异性重组系统可以适用于在植物中使用。此类系统的例子包括但不限于:来自酵母鲁氏接合酵母(*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)。

[0114] 在本发明的一些实施方案中,可以期望在现有的转基因事件附近整合或叠加新的转基因。可以认为转基因事件是优选的基因组基因座,其基于独特的特征诸如单一插入位点、正常的孟德尔分离和稳定的表达、及卓越的功效组合,包括在多个环境位置中及在多个环境位置间的除草剂耐受性和农艺学性能来选择。新整合的转基因应当维持现有转化体的转基因表达特征。此外,会克服用于检测并确认新整合事件的测定法的开发,因为已经鉴定出新整合事件的基因组侧翼序列和染色体位置。最后,新转基因对与现有转基因连锁的特定染色体位置的整合会通过使用常规育种方法的有性异性杂交来加速转基因对其它遗传背景的基因渗入。

[0115] 在本发明的一些实施方案中,可以期望自转基因事件切除多核苷酸序列。例如,如记载于美国专利申请No.13/011,666的转基因切除描述了使用锌指核酸酶自染色体整合的转基因事件除去由基因表达盒组成的多核苷酸序列。除去的多核苷酸序列可以是选择标志物。在切除并除去多核苷酸序列后,可以通过插入多核苷酸序列来再靶向经修饰的转基因事件。切除多核苷酸序列,随后再靶向经修饰的转基因事件,这提供了如下的优点,诸如选择标志物的再使用或克服对源自特定基因表达的植物转录物组(transcriptome)的非故意改变的能力。

[0116] 本发明在本文中公开了大豆基因组中的染色体6上对于插入异源核酸卓越的特定位点。还公开了5'侧翼序列和3'侧翼序列,其也可用于鉴定和/或靶向染色体6上的插入/靶定位点的位置。如此,本发明提供了将感兴趣的异源核酸导入此预先建立的靶位点中或在此靶位点附近导入的方法。本发明还涵盖包含在公开的靶位点处或大体在此类位点附近插

入的任何异源核苷酸序列的大豆种子和/或大豆植物。一个实现此类靶向性整合的选项是替换本文中例示的pat表达盒切除和/或替代不同插入物。在此一般方面,可以依照本发明使用(例如但不限于)靶向性同源重组。

[0117] 如本文中所使用的,基因、事件或性状“叠加”指将期望的性状组入一个转基因系中。植物育种人员通过在各自具有期望的性状的亲本间进行杂交,然后鉴定具有这两个期望性状的后代来叠加转基因性状。另一种叠加基因的方式是通过在转化期间同时将两个或更多个基因转移入植物的细胞核中。另一种叠加基因的方式是通过用另一种感兴趣基因再转化转基因植物。例如,可以使用基因叠加来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。在感兴趣的基因外使用选择标志物也可以认为是基因叠加。

[0118] “同源重组”指在具有含有相似核苷酸序列的相应位点的任何核苷酸序列对间进行且两个核苷酸序列可以相互作用(重组)以形成新的重组DNA序列的反应。相似核苷酸序列的位点在本文中各自称为“同源性序列”。一般地,同源重组的频率随同源性序列长度增加而升高。如此,虽然可以在不相同的两个核苷酸序列间发生同源重组,重组频率(或效率)随两个序列间的趋异升高而下降。可以使用各在供体和靶分子上的一个同源性序列来实现重组,由此生成“单交换”重组产物。或者,可以各在靶物和供体核苷酸序列上放置两个同源性序列。供体上的两个同源性序列与靶物上的两个同源性序列间的重组生成“双交换”重组产物。若供体分子上的同源性序列在要操作的序列(例如,感兴趣的序列)侧翼,则与靶分子的双交换重组会生成如下的重组产物,其中感兴趣的序列替换最初在靶分子上的同源性序列间的DNA序列。经由双交换重组事件在靶物和供体间的DNA序列的交换称作“序列置换”。

[0119] 主题事件实现三种不同除草剂耐受性蛋白质的转基因表达,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,此多除草剂耐受性性状表达盒/转基因插入物可以与其它除草剂耐受性性状(例如草甘膦抗性、草丁膦抗性、咪唑啉酮抗性、麦草畏抗性、HPPD抗性、溴草腈抗性等)、和昆虫抗性性状(诸如Cry1F,Cry1Ab,Cry1Ac,Cry34/45,Cry1Be,Cry1Ca,Cry1Da,Cry1Ea,Cry1Fa,营养期杀昆虫蛋白(vegetative insecticidal protein)(“VIPS”),包括VIP3A,等等))叠加。另外,本发明的表达盒/转基因插入物中的除草剂耐受性蛋白质可以充当一种或多种选择标志物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。

[0120] 这些性状组合产生控制杂草(等)物种的新方法,这是由于新需要的对除草剂(例如草甘膦)的抗性或固有耐受性。如此,使用事件pDAB8264.44.06.1来控制杂草的新方法在本发明的范围内。

[0121] 个别叠加或转化入作物中的主题转基因性状的使用提供一种用于控制不含赋予对苯氧基、吡啶基氧基、草甘膦和/或草丁膦除草剂的耐受性的基因的其它除草剂耐受性自生植物作物的工具。

[0122] 本发明的优选的植物或种子包含在其基因组中的插入序列(如本文中鉴定的)以及在插入物两侧的至少20-500或更多个连续侧翼核苷酸(如本文中鉴定的)。除非另有指示,提及侧翼序列指那些就SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2而言鉴定的。此外,主题事件包括刚好与插入DNA相邻的主题侧翼基因组序列间插入的异源DNA。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。

[0123] 本发明包括本发明植物的可再生细胞的组织培养物。也包括从该组织培养物再生的植物,特别是在所述植物能够表达所例示的品种的所有形态学和生理学特征的情况中。本发明的优选植物具有自保藏种子种植的植物的所有生理学 and 形态学特征。本发明进一步包含此类种子的后代和拥有感兴趣的质量性状的种子。

[0124] 对植物或种子或其部分的操作(诸如突变、进一步转染、和进一步育种)可以导致可称作“基本上衍生的”品种的事物的创建。植物新品种保护国际联盟(The International Union for the Protection of New Varieties of Plants(UPOV))已经提供了下列用于测定某个品种是否基本上源自受保护品种的准则:

[0125] [A]在如下情况时,应当认为品系基本上源自另一品种(“初始品种”):

[0126] (i)它主要源自初始品种,或者源自自身主要源自初始品种,同时保留源自初始品种的基因型或基因型组合的必要特征的表达的品种;

[0127] (ii)它与初始品种明显可区别;并且

[0128] (iii)除了源自衍生行为的差异外,它在源自初始品种的基因型或基因型组合的必要特征表达上与初始品种一致。

[0129] UPOV国际组织第六次会议(Sixth Meeting with International Organizations),1992年10月30日;文件由联盟办公室准备。

[0130] 如本文中所使用的,“系”指一组在至少一种性状上在个体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。

[0131] 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。

[0132] “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(例如优选地 $\pm 15\%$,更优选地 $\pm 10\%$,最优选地 $\pm 5\%$)得到维持。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。

[0133] “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、和总油测量的)在相同地区种植的没有优质价值性状的其它方面相当的商业芸苔(canola)品种的平均产率的15%内。

[0134] “农艺学良种”意指在由主题事件所致的除草剂耐受性外,品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。

[0135] 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涉及和/或包含“交接序列”或“过渡序列”(在那里,大豆基因组侧翼序列与插入序列相遇)的探针和/或引物。例如,这包括为了鉴定一个或两个交接序列(在那里,插入物与侧翼序列相遇)而设计的多核苷酸探针、引物和/或扩增子,如上文表1中所指示的。一种常见的

设计是具有在侧翼区中杂交的一种引物,和在插入物中杂交的一种引物。此类引物的长度经常各为约至少约15个残基。凭借此类排列,可以使用引物来生成/扩增可检出的扩增子,其指示本发明的事件的存在。可以使用这些引物来生成跨越(并包含)交接序列的扩增子,如上文所指示的。

[0136] 在侧翼序列中“降落”(touching down)的引物通常不设计为超出交接超出约200个碱基左右杂交。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,包含来自距上文鉴定的任一或两种交接序列为100至200-500左右个碱基内的合适大小的序列(或与其杂交)的引物在本发明的范围内。同样地,插入物引物可以在插入物上的任何地方设计,但是例如可以不专门为此类引物设计使用距上文鉴定的交接序列为100至200-500左右个碱基内的插入物(包括互补物)上的残基。

[0137] 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条件下与本文中例示的序列(或其互补物)的区段杂交,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昔。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。

[0138] 应当注意到,可以发生PCR扩增的错误,这例如可以导致微小的测序错误。也就是说,除非另有指示,如下测定本文中所列的序列,即自大豆基因组DNA生成扩增子,然后克隆并测序扩增子。鉴于对于自基因组DNA生成对于测序足够的扩增子必要的多个轮次的扩增,寻找以此方式生成并测定的序列上的略微差异和次要差别不是罕见的。本领域技术人员应当认可并且注意到由于这些类型的常见测序错误或差别而需要的任何调节在本发明的范围内。

[0139] 还应当注意,例如,在事件的创建期间插入序列时要删除一些基因组序列不是罕见的。如此,例如一些差异也可以出现在主题侧翼序列与GENBANK中所列的基因组序列间。

[0140] “插入物”的构件在图中显示,并且在下文在实施例中更为详细地讨论。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。

[0141] 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。提供了如下的DNA序列,其包含本文中提供的主题转基因/基因组插入区交接序列、包含本文中鉴定的交接序列的区段、和任何此类例示序列的互补物及其任何区段。插入区交接序列跨越插入基因组中的异源DNA与在插入位点侧翼的来自大豆细胞的DNA之间的交接。此类序列可以诊断给定的事件。

[0142] 基于这些插入物和边界序列,可以生成事件特异性引物。PCR分析表明,可以通过分析用这些事件特异性引物组生成的PCR扩增子来在不同大豆基因型中鉴定本发明的大豆系。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。如此,源自此类引物组的PCR扩增子是独特的,并且可以用于鉴定这些大豆系。

[0143] 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/或用作生成对于一种或多种这些大豆植物诊断性的扩增子产物的引物序列的序列。

[0144] 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或其互补物,和相似长度的来自这些序列的侧翼大豆DNA序列(诸如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2及其区段)或其互补物。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。

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 在又一些实施方案中,本发明包括生成包含事件pDAB8264.44.06.1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除草剂耐受性性状的真实育种大豆植物的进一步的步骤。

[0148] 依照本发明的另一方面,提供了测定与所述事件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。

[0149] 可以使用本文中公开的组合物和本领域中公知的DNA检测方法来开发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探针在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。

[0150] “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。“分离的”多核苷酸意味着多核苷酸为非天然状态,即例如与异源启动子可操作连接。同样地,“纯化的”蛋白质意味着蛋白质为非天然状态。

[0151] “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。

[0152] 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。

[0153] 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版, 第1卷-第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机程序来进行。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 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同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。

[0157] 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, 例如就端点TaqMan和实时PCR应用而言, 会选择1.5mM至约4.0mM $MgCl_2$ 于约60℃至约75℃的温度, 并且为了提高严格性可以改变保持时间, 如本文中所描述的。对于其它杂交技术, 通常会采用相对较低的盐和/或高温的条件, 诸如通过约0.02M至约0.15M NaCl于约50℃至约70℃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℃)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, 6.0倍氯化钠/柠檬酸钠(SSC)于约45℃, 接着于50℃用2.0倍SSC清洗是本领域技术人员已知的。例如, 可以自约2.0倍SSC于50℃的低严格性至约0.2倍SSC于50℃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℃)的低严格性条件提高至约65℃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。此类选择性条件容许(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。

[0158] 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。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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进行核酸扩增方法以生成诊断事件DNA存在的扩增子,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。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,或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物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。

[0163] 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。

[0164] 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。

[0165] 另一种方法是焦磷酸测序(pyrosequencing)技术,如由Winge(Innov.Pharma.Tech.00:18-24,2000)所描述的。在此方法中,设计如下的寡核苷酸,其与相邻的基因组DNA和插入物DNA交接重叠。将寡核苷酸与来自感兴趣区域的单链PCR产物(插入序列中的一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'磷硫酸(phosphosulfate)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。由于成功的扩增、杂交和单或多碱基延伸,光信号指示转基因插入物/侧翼序列的存在。

[0166] 荧光极化是另一种可以用于检测本发明的扩增子的方法。遵循此方法,设计如下的寡核苷酸,其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(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。可以使用荧光计来以极化变化测量掺入。由于成功的扩增、杂交和单碱基延伸,极化变化指示转基因插入物/侧翼序列的存在。

[0167] TAQMAN(PE Applied Biosystems,Foster City,Calif.)是一种检测并量化DNA序列的存在的方法。简言之,设计如下的FRET寡核苷酸探针,其与基因组侧翼和插入物DNA交

接重叠。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(插入DNA序列中的一条引物和侧翼基因组序列中的一条)。在特异性扩增期间,Taq DNA聚合酶清洁并释放荧光模块,使其离开FRET探针上的淬灭模块。由于成功的扩增和杂交,荧光信号指示侧翼/转基因插入物序列的存在。

[0168] 已经描述了用于序列检测的分子信标(Molecular Beacons)。简言之,设计如下的FRET寡核苷酸探针,其与侧翼基因组和插入物DNA交接重叠。FRET探针的独特结构导致其含有将荧光和淬灭模块保持紧密接近的二级结构。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(插入物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探针二级结构的除去和荧光和淬灭模块的空间分离。荧光信号得到结果。由于成功的扩增和杂交,荧光信号指示侧翼基因组/转基因插入物序列的存在。

[0169] 已经公开了大豆基因组中对于插入卓越的位置,本发明还包括大体在此基因组位置附近包含至少一个非aad12/pat/2mepsps编码序列的大豆种子和/或大豆植物。一个选项是用不同插入物替换本文中例示的插入物。在这些一般方面,例如可以依照本发明使用靶向性同源重组。此类技术是例如,W003/080809A2及相应的公布的美国专利(U.S. 2003/0232410)的主题。如此,本发明包括如下的植物和植物细胞,其包含侧翼有整个或可识别部分的本文中以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2鉴定的侧翼序列的异源插入物(替换或具有多个拷贝的例示的插入物)。也可以以此/这些方式靶向额外一个拷贝(或额外多个拷贝)的例示的插入物以实现插入。

[0170] 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说明书的明确教导矛盾的程度完整收入。

[0171] 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。

[0172] 除非另有指示,使用下列缩写。

[0173]	bp	碱基对
[0174]	°C	摄氏度
[0175]	DNA	脱氧核糖核酸
[0176]	DIG	洋地黄毒苷/地高辛(digoxigenin)
[0177]	EDTA	乙二胺四乙酸
[0178]	kb	千碱基
[0179]	μg	微克
[0180]	μL	微升
[0181]	mL	毫升
[0182]	M	分子量
[0183]	OLP	重叠探针

[0184]	PCR	聚合酶链式反应
[0185]	PTU	植物转录单元
[0186]	SDS	十二烷基硫酸钠
[0187]	SOP	标准的操作规程
[0188]	SSC	含有氯化钠和柠檬酸钠混合物的缓冲溶液, pH7.0
[0189]	TBE	含有Tris碱、硼酸和EDTA混合物的缓冲溶液, pH8.3
[0190]	V	伏特

实施例

[0191] 实施例1: 2mEPSPS和AAD-12大豆事件8264.44.06.1的转化和选择

[0192] 经由土壤杆菌介导的大豆子叶节外植体转化生成含有大豆事件8264.44.06.1的转基因大豆(大豆)。使用解除武装的(disarmed)土壤杆菌菌株EHA101(Hood等, 2006)来启动转化, 该菌株携带在T链DNA区内含有选择标志物pat及感兴趣基因aad-12和2mepsps v1的二元载体pDAB8264(图1)。

[0193] 使用Zeng等(2004)的改良规程来实施土壤杆菌介导的转化。简言之, 在基础培养基上萌发大豆种子(栽培种Maverick), 并将子叶节分离, 并用土壤杆菌感染。给枝条起始、枝条延长、和生根培养基补充头孢噻肟(cefotaxime)、特美汀(timentin)和万古霉素以除去土壤杆菌。采用草丁磷选择来抑制非转化枝条的生长。将选定的枝条转移至生根培养基以进行根发育, 然后转移至土壤混合物以驯化小植物。

[0194] 用草丁磷对选定小植物的顶生小叶进行涂叶(leaf paint)以筛选推定的转化体。将筛选的小植物转移至温室, 容许驯化, 然后用草丁磷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, 用于确认选择标志物基因和/或感兴趣的基因。容许T₀植物在温室中自体受精以生成T₁种子。

[0195] 从独立的经转化的隔离群生成此事件大豆事件8264.44.06.1。将T₁植物回交, 并在随后的世代里基因渗入良种品种中。该事件基于其独特的特征诸如单一插入位点、正常的孟德尔分离和稳定的表达、及卓越的功效组合, 包括除草剂耐受性和农艺学性能来选择。以下实施例含有用于表征大豆事件8264.44.06.1的数据。

[0196] 实施例2: 大豆事件8264.44.06.1中AAD-12、2mEPSPS和PAT蛋白的表征

[0197] 表征源自转基因大豆事件pDAB8264.44.06.1的重组AAD-12、2mEPSPS和PAT蛋白的生物化学特性。使用定量酶联免疫吸附测定法(ELISA)来表征蛋白质的生物化学特性, 并确认AAD-12, PAT和2mEPSPS蛋白的表达。

[0198] 实施例2.1: 植物组织中AAD-12蛋白的表达

[0199] 在大豆事件8264.44.06.1中测定AAD-12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、可提取的AAD-12蛋白。

[0200] 从测试植物分离大豆组织的样品, 并准备用于表达分析。用含有0.5%牛血清清蛋白(BSA)的含去污剂Tween-20的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBST)从大豆植物组织提取AAD-12蛋白。将植物组织离心; 将水性上清液收集, 在必要时用适当的缓冲液稀释, 并以三明治式形式使用AAD-12ELISA试剂盒分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0201] 实施检测分析以在大豆事件8264.44.06.1中在纵向(世代间)和横向(相同世代的

谱系间)两者调查表达稳定性和遗传力。在T4世代,大豆事件8264.44.06.1表达在所有谱系间是稳定的(不分离)且一致的。对大豆事件实施田间表达水平研究;所有谱系间的平均表达是约200–400ng/cm²。

[0202] 实施例2.2:植物组织中2mEPSPS蛋白的表达

[0203] 在大豆事件8264.44.06.1中测定2mEPSPS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、可提取的2mEPSPS蛋白。

[0204] 从测试植物分离大豆组织的样品,并准备用于表达分析。用含有0.5%牛血清清蛋白(BSA)的含去污剂Tween-20的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBST)从大豆植物组织提取2mEPSPS蛋白。将植物组织离心;将水性上清液收集,在必要时用适当的缓冲液稀释,并以三明治式形式使用2mEPSPS ELISA试剂盒分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0205] 实施检测分析以在大豆事件8264.44.06.1中在纵向(世代间)和横向(相同世代的谱系间)两者调查表达稳定性和遗传力。在T4世代,大豆事件8264.44.06.1表达在所有谱系间是稳定的(不分离)且一致的。对大豆事件8264.44.06.1实施田间表达水平研究。所有谱系间的平均表达是约5,000–17,500ng/cm²。这些表达水平高于表达2mEPSPS蛋白的阳性对照。

[0206] 实施例2.3:植物组织中PAT蛋白的表达

[0207] 在大豆事件8264.44.06.1中测定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、可提取的PAT蛋白。

[0208] 从测试植物分离大豆组织的样品,并准备用于表达分析。用含有0.5%牛血清清蛋白(BSA)的含去污剂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;将水性上清液收集,在必要时用适当的缓冲液稀释,并以三明治式形式使用PAT ELISA试剂盒分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0209] 实施检测分析以在大豆事件8264.44.06.1中在纵向(世代间)和横向(相同世代的谱系间)两者调查表达稳定性和遗传力。在T4世代,大豆事件8264.44.06.1表达在所有谱系间是稳定的(不分离)且一致的。对大豆事件8264.44.06.1实施田间表达水平研究。所有谱系间的平均表达是约15–25ng/cm²。

[0210] 实施例3:大豆事件pDAB8264.44.06.1的插入物和侧翼边界区中DNA序列的克隆和表征

[0211] 为了表征及描述基因组插入位点,测定大豆事件pDAB8264.44.06.1的侧翼基因组T-DNA边界区的序列。总共确认2,578bp大豆事件pDAB8264.44.06.1基因组序列,其包含570bp5'侧翼边界序列(SEQ ID NO:1)、1,499bp3'侧翼边界序列(SEQ ID NO:2)。基于大豆事件pDAB8264.44.06.1边界序列的PCR扩增确认边界区是大豆起源的,并且交接区对于事件pDAB8264.44.06.1是独特的序列。交接区可以用于大豆事件pDAB8264.44.06.1的事件特异性鉴定。另外,通过扩增与来自野生型大豆基因组的鉴定的侧翼边界序列的区域对应的基因组片段表征T链插入位点。大豆事件pDAB8264.44.06.1与野生型基因组序列的比较揭示了自初始基因座的约4,357bp缺失。总体上,大豆事件pDAB8264.44.06.1的插入物和边界序列的表征指示T链的完整拷贝存在于大豆基因组中。

[0212] 表2:用于分析大豆事件pDAB8264.44.06.1的引物和序列

[0213]

SEQ ID NO:	引物 名称	大小 (bp)	序列(5'至3')	目的
SEQ ID NO:3	4406_ WF1	25	AGGTTGTCATTCCGCTGAA GAAGAT	确认5'边界基因组 DNA, 与ED_v1_C1 一起使用
SEQ ID NO:4	4406_ WF2	25	CACAGTGGACAATTCTGATT TCTGG	确认5'边界基因组 DNA, 与ED_v1_C 一起使用
SEQ ID NO:5	4406_ WF3	25	GGATTGCATCTGAAACGGA TCATAT	确认5'边界基因组 DNA, 与ED_v1_C1 一起使用
SEQ ID NO:6	4406_ WF4	25	GGAATGTTGAACCACCCAT GATTAA	确认5'边界基因组 DNA, 与ED_v1_C 一起使用
SEQ ID	4406-	25	CATGTATGTTGTTGTCGTTG	确认3'边界基因组

[0214]

NO:7	WR5		CCTTG	DNA, 与 PAT_12 一起使用
SEQ ID NO:8	4406-WR6	25	AACATTTTGAAATCGGTTCC AAGGA	确认 3' 边界基因组 DNA, 与 PAT_12 一起使用
SEQ ID NO:9	4406-WR7	25	AGGCTCAGGCCAACAACAT TAATTT	确认 3' 边界基因组 DNA, 与 PAT_12 一起使用
SEQ ID NO:10	4406-WR8	27	GGAGAGAAGTCGCAACAGT GATTACAT	确认 3' 边界基因组 DNA, 与 PAT_12 一起使用
SEQ ID NO:11	ED_v1_C1	26	GAGTAAAGGAGACCGAGA GGATGGTT	确认 5' 边界基因组 DNA, 与 4406_WF1、4406_WF2、4406_WF3、或 4406_WF4 一起使用
SEQ ID NO:12	PAT_12	24	GAACGCTTACGATTGGACA GTTGA	确认 3' 边界基因组 DNA, 与 4406_WR5、4406_WR62、4406_WR7、或 4406_W R8 一起使用

[0215] 表3:用于扩增大豆事件pDAB8264.44.06.1中的边界区和事件特异性序列的PCR条件

[0216]

靶序列	引物组	PCR 混 合 物	预 变 性 (°C/ 分钟)	变 性 (°C/ 秒)	退 火 (°C/ 秒)	延 伸 (°C/ 分钟:秒)	最终延 伸 (°C/ 分钟)
5'边界	4406-WF1/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	66/30	68/4:00	72/10
				32个循环			
5'边界	4406-WF3/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	66/30	68/4:00	72/10
				32个循环			
3'边界	4406-WR5/PAT_12	D	95/3	98/10	66/30	68/4:00	72/10
				35个循环			
3'边界	4406-WR7/PAT_12	D	95/3	98/10	66/30	68/4:00	72/10
				32个循环			
3'边界	4406-WR8/PAT_12	D	95/3	98/10	66/30	68/4:00	72/10
				35个循环			
插入物 基因座 间	4406-WF1/4406-WR5	D	95/3	98/10	66/30	68/10:00	72/10
				32个循环			
插入物 基因座 间	4406-WF3/4406-WR7	D	95/3	98/10	66/30	68/10:00	72/10
				32个循环			

[0217] 表4:用于扩增大豆事件pDAB8264.44.06.1中的边界区和事件特异性序列的PCR混合物。

[0218]

PCR混合物A		PCR混合物B	
试剂	1倍反应(μL)	试剂	1倍反应(μL)

[0219]

H2O	0.8	H2O	14.6
AccPrime pfx SuperMix	20	10 倍 LA Taq 缓冲液	2
---	---	MgCl ₂ (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
PCR混合物C		PCR混合物D	
试剂	1倍反应(μ L)	试剂	1倍反应(μ L)
H2O	28	H2O	11.6
10 倍 PCR 缓冲 液II (加Mg)	5	10倍PCR缓冲 液 II (加Mg)	2
MgCl ₂ [25mM]	1.5	MgCl ₂ [25mM]	0.6
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	3.2
衔接头 PCR 引 物(10 μ M)	1	引物1 (10 μ M)	0.4
GOI 巢式引物 (10 μ M)	1	引物2 (10μM)	0.4
DNA结合株	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

[0220] 实施例3.1:大豆基因组序列的确认

[0221] 将5'和3'侧翼边界与来自染色体6的大豆全基因组鸟枪序列比对,指示大豆事件 pDAB8264.44.06.1的转基因在大豆基因组染色体6中插入。为了确认来自大豆基因组的大

豆事件pDAB8264.44.06.1转基因的插入位点,用不同引物对实施PCR(图2和表3)。使用来自大豆事件pDAB8264.44.06.1和其它转基因或非转基因大豆系的基因组DNA作为模板。如此,为了确认5'边界序列是否是正确的,2mepsps特异性引物,例如ED_v1_C1(SEQ ID NO:11),和两种依照克隆的5'端边界序列和/或其在大豆基因组染色体6上的比对序列设计的引物(称作4406-WF1(SEQ ID NO:3)和4406-WF3(SEQ ID NO:5))来扩增跨越2mepsps基因至5'端边界序列的DNA区段。类似地,为了确认克隆的3'端边界序列,使用pat特异性引物,例如PAT-12(SEQ ID NO:12),和依照克隆的3'端边界序列设计的三种引物,称作4406-WR5(SEQ ID NO:7),4406-WR7(SEQ ID NO:9)和4406-WR8(SEQ ID NO:10)来扩增跨越pat基因至3'端边界序列的DNA区段。每种引物对(一条位于大豆事件pDAB8264.44.06.1的侧翼边界上的引物和一条转基因特异性引物)仅从大豆事件pDAB8264.44.06.1的基因组DNA,而不是从来自其它转基因大豆系或非转基因对照的DNA样品扩增具有预测大小的DNA片段。结果指示克隆的5'和3'边界序列是大豆事件pDAB8264.44.06.1的T链插入物的侧翼边界序列。

[0222] 为了进一步确认大豆基因组中的DNA插入,完整跨越两种大豆序列的PCR扩增。使用两种依照5'端边界序列设计的引物4406-WF1(SEQ ID NO:3)和4406-WF3(SEQ ID NO:5)和两种针对3'端边界序列的引物4406-WR5(SEQ ID NO:7)和4406-WR7(SEQ ID NO:9)来扩增含有整个转基因、5'端边界序列、和3'端边界序列的DNA区段。如预期的,用4406-WF1(SEQ ID NO:3)和4406-WR5(SEQ ID NO:7)的引物对的PCR扩增扩增出来自大豆事件pDAB8264.44.06.1的基因组DNA的约12kb DNA片段和来自非转基因大豆对照和其它大豆转基因系的6kb DNA片段。类似地,用4406-WF3(SEQ ID NO:5)和4406-WR7(SEQ ID NO:9)的引物对完成的PCR反应相应生成来自大豆事件pDAB8264.44.06.1样品的约12kb DNA片段和来自所有其它大豆对照系的6kb DNA片段。这些结果表明大豆事件pDAB8264.44.06.1的转基因插入大豆基因组染色体6的位点中。比对大豆事件pDAB8264.44.06.1的鉴定的5'和3'边界序列与来自染色体6的大豆全基因组鸟枪序列揭示自初始基因座的约4.4kb删除。(图3)。

[0223] 实施例4:经由Southern印迹进行的大豆事件pDAB8264.44.06.1表征

[0224] 使用Southern印迹分析来建立大豆事件pDAB8264.44.06.1的整合样式。这些实验产生如下的数据,其证明在大豆基因组内的aad-12、pat和2mepsps v1转基因的整合和完整性。将大豆事件pDAB8264.44.06.1表征为全长的、简单的整合事件,其含有来自质粒pDAB8264的aad-12、pat和2mepsps v1PTU的单一拷贝。

[0225] Southern印迹数据提示了插入大豆事件pDAB8264.44.06.1的基因组中的T链片段。使用对aad-12、pat和2mepsps v1插入物(其包含在pDAB8264的T链整合区中)特异性的探针和描述性的限制性酶来进行详细的Southern印迹分析,所述限制性酶具有位于质粒内的切割位点,并且生成在质粒内部的杂交片段或跨越质粒与大豆基因组DNA的交接的片段(边界片段)。对于限制性酶和探针的组合自Southern杂交指示的分子量对于事件而言是独特的,并且建立其鉴定样式。这些分析还显示了已经将质粒片段插入大豆基因组DNA中,而没有aad-12、pat和2mepsps v1PTU的重排。

[0226] 实施例4.1:大豆叶样品收集和基因组DNA(gDNA)分离

[0227] 从自含有大豆事件pDAB8264.44.06.1的个别大豆植物收获的叶组织提取基因组DNA。另外,自常规的大豆植物Maverick(其含有代表主旨(substance)系的遗传背景,缺乏aad-12和2mepsps v1基因)分离gDNA。遵循标准的溴化十六烷基三甲铵CTAB方法,自冻干的

叶组织提取个别基因组DNA。在提取后,使用Pico Green试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)用荧光分光光度法量化DNA。然后,在琼脂糖凝胶上显现DNA以确认来自Pico Green分析的数值并测定DNA质量。

[0228] 实施例4.2:DNA消化和分离

[0229] 对于大豆事件pDAB8264.44.06.1的Southern印迹分子表征,将十微克(10 μ g)基因组DNA消化。通过对每份DNA样品添加每 μ g DNA约5个单位的选定限制性酶和相应的反应缓冲液来消化来自大豆pDAB8264.44.06.1和非转基因大豆系Maverick的基因组DNA。将每份样品于约37 $^{\circ}$ C温育过夜。个别使用限制性酶BstZ17I、HindIII、NcoI、NsiI、和PacI以进行消化(New England Biolabs,Ipswich,MA)。另外,通过组合质粒DNA,即pDAB8264与来自非转基因大豆品种Maverick的基因组DNA来制备阳性杂交对照样品。使用与测试样品相同的规程和限制性酶来消化质粒DNA/基因组DNA混合物(cocktail)。在将消化物温育过夜后,将NaCl添加至终浓度0.1M,并用异丙醇将经消化的DNA样品沉淀。将沉淀的DNA团粒在20 μ l 1倍上样缓冲液(0.1%溴酚蓝、100mM EDTA、50%甘油、10mM Tris,pH7.5)中重悬。然后,以35瓦特将DNA样品和分子大小标志物电泳通过具有0.4X TAE缓冲液(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)的0.85%琼脂糖凝胶达约18-22小时以实现片段分离。用溴化乙啶(Invitrogen,Carlsbad,CA)对凝胶染色,并在紫外(UV)光下显现DNA。

[0230] 实施例4.3:Southern转移和膜处理

[0231] 实施Southern印迹分析,基本上如由Memelink,J.;Swords,K.;Harry J.;Hoge,C.;(1994)Southern,Northern,and Western Blot Analysis.Plant Mol.Biol.Manual F1:1-23所描述的。简言之,在DNA片段电泳分离及显现后,将凝胶用0.25M HCl进行脱嘌呤作用约20分钟,然后暴露于变性溶液(0.4M NaOH,1.5M NaCl)约30分钟,接着是中和溶液(1.5M NaCl,0.5M Tris pH7.5)至少30分钟。使用具有10倍SSC的芯吸(wicking)系统来将对尼龙膜上的Southern转移实施过夜。在转移后,通过UV交联将DNA结合至膜,接着用2倍SSC溶液短暂清洗膜。此过程产生准备好杂交的Southern印迹膜。

[0232] 实施例4.4:DNA探针标记和杂交

[0233] 使用经标记的探针来检测与尼龙膜结合的DNA片段。通过经洋地黄毒苷(DIG)标记的核苷酸[DIG-11]-dUTP对使用对基因元件特异性的引物从质粒pDAB8264扩增的DNA片段的基于PCR的掺入生成探针。使用PCR DIG探针合成试剂盒(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)遵循制造商推荐的规范实施通过PCR合成生成DNA探针。

[0234] 通过琼脂糖凝胶电泳分析经标记的探针以测定其质量和数量。然后,使用期望量的经标记的探针来与尼龙膜上的靶DNA杂交,从而检测特异性片段,其使用基本上对DIG Easy Hyb溶液(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)描述的规程进行。简言之,将含有固定的DNA的尼龙膜印迹用2倍SSC短暂清洗,并在杂交炉中于约45-55 $^{\circ}$ C与杂交瓶中20-25mL预热的DIG Easy Hyb溶液预杂交约2小时。然后,倒掉预杂交溶液,并用约15mL预热的DIG EasyHyb溶液更换,所述DIG Easy Hyb溶液含有期望量的通过在水浴中煮沸约5分钟变性的特异性探针。然后,在杂交炉中于约45-55 $^{\circ}$ C进行杂交步骤过夜。

[0235] 在探针杂交结束时,将含有探针的DIG Easy Hyb溶液倒入干净的管中,并于约-20 $^{\circ}$ C贮存。可以依照制造商推荐的规程将这些探针再使用两次。将膜印迹在干净的塑料容器中用低严格性清洗缓冲液(2倍SSC,0.1%SDS)于室温短暂漂洗并清洗两次,持续约5分钟,接

着用高严格性清洗缓冲液(0.1倍SSC,0.1%SDS)于约65℃清洗两次,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。这继之以在1倍封闭缓冲液中封闭2小时以及还与1倍封闭缓冲液中的抗DIG-AP(碱性磷酸酶)抗体(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)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探针仍然与膜印迹结合,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。将印迹暴露于化学发光胶片一个或多个时间点以检测杂交片段,并且显现分子大小标准品。用All-Pro100Plus胶片显影剂(Konica Minolta,Osaka,Japan)显现胶片,并扫描图像。对每种探针记录检出条带的数目和大小(表5)。使用经DIG标记的DNA分子量标志物II(DIG MWM II)和经DIG标记的DNA分子量标志物VII(DIG MWM VII)(在DIG检测后可见,如描述的)来测定Southern印迹上的杂交片段大小。

[0236] 表5:对大豆事件pDAB8264.44.06.1的Southern分析中使用的探针长度。

[0237]

探针名称	遗传元件	长度(bp)
2mEPSPS	2mEPSPS	1238
aad-12	aad-12	671
specR	大观霉素抗性基因	750
OriRep	Ori Rep	852
trfA	复制起始蛋白trfA	1119

[0238] 实施例4.5:Southern印迹结果

[0239] 表6中给出了基于aad-12和2mepsps PTU的已知限制性酶位点的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。预期的片段大小基于pDAB8264的质粒图,而观察到的片段大小是来自这些分析的近似结果,并且基于经DIG标记的DNA分子量标志物II和标志物VII片段的指示大小。

[0240] 自这些消化物和杂交鉴定两类片段:内部片段(其中已知的酶位点在探针区侧翼,并且完全包含在aad-12和2mepsps PTU PTU的插入区内),和边界片段,其中已知的酶位点位于探针区的一端,并且预期第二个位点在大豆基因组中。边界片段大小随事件而变化,因为在大多数情况中,DNA片段整合位点对于每个事件而言是独特的。边界片段提供了一种相对于整合DNA定位限制性酶位点并评估DNA插入物的数目的手段。对含有事件pDAB8264.44.06.1的多个大豆世代完成的Southern印迹分析产生如下的数据,其提示了来自质粒pDAB8264的低拷贝、完整的aad-12和2mepsps PTU被插入大豆事件pDAB8264.44.06.1的大豆基因组中。

[0241] 表6:Southern印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。

[0242]

DNA探针	限制酶	样品	预期的片段大小 (bp) ¹	观察到的片段大小(bp) ²
aad-12	<i>Bst</i> Z17I	pDAB8264	4994	约5000
		Maverick	无	无
		大豆事件 DAB8264.44.06.1	4994	约5000
	<i>Hind</i> III	pDAB8264	4731	约4700
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	>4078	约7400
	<i>Nco</i> I	pDAB8264	7429	约7400
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	>3690	约3800
	<i>Nsi</i> I	pDAB8264	4974	约5000
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	4974	约5000
	<i>Pac</i> I	pDAB8264	6768	约6800
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	6768	约6800
2mEPSPS	<i>Bst</i> Z17I	pDAB8264	11024	约11000
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	>4858	约16000
	<i>Nco</i> I	pDAB8264	5203	约5200
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	>3756	约6100
	<i>Nsi</i> I	pDAB8264	11044	11000
		Maverick	无	
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	>5199	约5300
	<i>Pac</i> I	pDAB8264	6768	约6800
		Maverick	无	无
		大豆事件 pDAB8264.44.06.1	6768	约6800
<i>Spec</i> R	<i>Hind</i> III	pDAB8264	9322	约9300

[0243]	<i>OriRep+trfA</i>	<i>Pac I</i>	Maverick	无	无
			大豆事件 pDAB8264.44.06.1	无	无
			pDAB8264	9210	约9200
			Maverick	无	无
			大豆事件 pDAB8264.44.06.1	无	无

[0244] 限制酶NcoI和Hind III结合质粒pDAB8264中的独特的限制性位点,并将其切割。随后,选择这些酶来表征大豆事件pDAB8264.44.06.1中的aad-12基因插入物。预测大于4,078bp或大于3,690bp的边界片段分别在Hind III和NcoI消化后与探针杂交(表6)。在使用HindIII和NcoI时分别观察到约7,400bp和约3,800bp的单一aad-12杂交条带。探针与此大小的条带的杂交提示了aad-12基因在大豆事件pDAB8264.44.06.1的大豆基因组中的单一插入位点的存在。选择限制性酶BstZ17I、NsiI和PacI以释放含有aad-12植物转录单位(PTU,启动子/基因/终止子)的片段(表6)。在BstZ17I,NsiI和PacI消化后用探针分别观察到预测的约5,000、约5,000、和约6,800bp片段。用对pDAB8264.44.06.1样品的酶消化,接着进行探针杂交获得的结果指示来自质粒pDAB8264的完整aad-12PTU被插入大豆事件pDAB8264.44.06.1的大豆基因组中。另外,对HindIII、NcoI、NsiI、和BstZ17I限制性片段产生的杂交条带的分子量大小指示aad-12PTU也含有连接的pat PTU。

[0245] 限制酶BstZ17I、NcoI和NsiI结合质粒pDAB8264中的限制性位点,并将其切割。随后,选择这些酶以表征大豆事件pDAB8264.44.06.1中的2mepsps基因插入物。预测大于4,858bp、大于3,756、或大于5,199bp的边界片段在BstZ17I、NcoI和NsiI消化后分别与探针杂交(表6)。在使用BstZ17I、NcoI和NsiI时分别观察到约16,000bp、约6,100bp和约5,300bp的单一2mepsps杂交条带。探针与此大小的条带的杂交提示了大豆事件pDAB8264.44.06.1的大豆基因组中2mepsps基因的单一插入位点的存在。选择限制酶PacI以释放含有2mepsps植物转录单元(PTU;启动子/基因/终止子)的片段(表6)。在PacI消化后用探针观察到预测的约6,800bp片段。用对pDAB8264.44.06.1样品的酶消化,接着进行探针杂交获得的结果指示来自质粒pDAB8264的完整2mepspsPTU被插入大豆事件pDAB8264.44.06.1的大豆基因组中。

[0246] 实施例4.6:主链序列的缺乏

[0247] 还进行Southern印迹分析以证实pDAB8264.44.06.1中大观霉素抗性基因(specR)、Ori复制元件和复制起始蛋白trfA(trf A元件)的缺乏。在Southern分析包括合适的阳性(pDAB8264plus Maverick)和阴性(Maverick)对照时预期没有与大观霉素抗性、Ori复制元件或trf A元件的特异性杂交。在Hind III消化和与specR特异性探针杂交后,一个约9,300bp的预期大小条带在阳性对照样品(pDAB8264加maverick)中观察到,但是阴性对照和大豆事件pDAB8264.44.06.1样品缺乏。类似地,在Pac I消化和与OriRep特异性探针和trfA特异性探针的混合物杂交后,一个约9,200bp的预期大小条带在阳性对照样品(pDAB8264加maverick)中检出,但是阴性对照和大豆事件pDAB8264.44.06.1的样品缺乏。这些数据指示大豆事件pDAB8264.44.06.1中大观霉素抗性、Ori复制元件和复制启动蛋白trfA的缺乏。

[0248] 实施例5:农艺学、产量和除草剂耐受性评估

[0249] 在单一生长期期间在多个地理学地点在田间试验中研究大豆事件 pDAB8264.44.06.1 的农艺学特征和除草剂耐受性。在大豆事件 pDAB8264.44.06.1 和 Maverick 对照植物之间没有观察到农艺学上有意义的非有意差异。研究的结果表明大豆事件 pDAB8264.44.06.1 与 Maverick 对照植物在农艺学上等同。另外,大豆事件 pDAB8264.44.06.1 在用草甘膦和 2,4-D 的罐混合物喷雾时提供强力的除草剂耐受性。

[0250] 在每个地方对所有测试输入测量并记录下列农艺学特征。

[0251] 1.) 出土(emergence):通过用站立计数(Stand count)除以1米部分中种植的种子数目,并乘以100计算。

[0252] 2.) V1 时的幼苗活力:活力是样地健康的总体估计。结果按 0-100% 的量表评定,其中 0% 代表具有所有死亡植物的样地,而 100% 代表看上去非常健康的样地。

[0253] 3.) V3 化学应用后 1 天、7 天、和 14 天评定的总体视觉作物损伤、缺绿症和坏死。对 2,4-D 损伤典型的偏上性的任何迹象进行观察。偏上性展现为叶和茎的扭曲或下垂。所有作物损伤使用 0 至 100% 量表,其中 0% 指示没有损伤,而 100% 指示完全的植物死亡。

[0254] 4.) 开花日期:此测量记录样地中 50% 的植物开始开花的日期。记录从种植到每个样地中 50% 的植物开花时的天数。

[0255] 5.) R2 或 R1 时的站立计数:是每个样地中植物的平均活力的视觉评估,其通过计算每个样地一行的代表性一米部分中的植物数目,并在 R2 或 R1 生长阶段时做记录测定。

[0256] 6.) R2 化学应用后 1 天、7 天、和 14 天评定的总体视觉作物损伤、缺绿症和坏死。对 2,4-D 损伤典型的偏上性的任何迹象进行观察。偏上性展现为叶和茎的扭曲或下垂。所有作物损伤使用 0 至 100% 量表,其中 0% 指示没有损伤,而 100% 指示完全的植物死亡。

[0257] 7.) R6 生长阶段时的疾病发生率:是用于记录样地中疾病严重性的疾病发生率的视觉评估。按 0-100% 量表评定。其中 0% 指示不存在疾病,而 100% 指示样地中的所有植物具有疾病。

[0258] 8.) R6 生长阶段时的昆虫损害:是用于记录样地中昆虫损害严重性的昆虫损害的视觉评估。使用 0-100% 量表记录样地中由昆虫损害的植物组织的百分比。其中 0% 指示不存在昆虫损害,而 100% 指示样地中的所有植物具有昆虫损害。

[0259] 9.) 衰老时的植物高度:记录每个样地中植物的平均高度。在叶掉落后从土壤表面至尖端测量植物。以厘米记录测量。若样地是倒伏的,则竖立代表性一组植物以获得测量。

[0260] 10.) 成熟前的天数。记录样地中 95% 的豆荚达到生理学成熟的日期,并且植物是弄干的(dry down)颜色。计算从种植起经过的天数。

[0261] 11.) 倒伏:记录收获时间时倒伏严重性的视觉评估。按 0 至 100% 量表记录,其中 0% 指示没有倒伏,而 100% 指示样地中的所有植物在地面上变平。

[0262] 12.) 脱粒:在收获时间时记录豆荚脱粒的视觉评估。以每个样地脱粒的豆荚百分比估值记录。0-100% 量表,其中 0% 指示没有脱粒,而 100% 指示脱粒的所有豆荚。

[0263] 13.) 产率:记录从每个样地收获的谷物重量。收获整个 2 行样地,并记录种子重量和湿度。通过调节至 13% 湿度进行 bu/ 英亩的计算。

[0264] 14.) 100 个种子的重量:对于每个样地,数出 100 个种子,并以克记录重量。

[0265] 应用与 2% (重量比重量) 硫酸铵(AMS)混合的 2,185g ae/ha 的 2,4-D 和草甘膦罐混合物后评估大豆事件 pDAB8264.44.06.1 的除草剂耐受性。将除草剂以 V3/R2 序贯除草剂处

理喷雾。通过在V3生长发育阶段时喷雾大豆植物,接着是在R2生长发育阶段时的第二次序贯应用完成此除草剂处理。在完全形成具一小叶的和前三个有三小叶的叶时表征V3生长阶段。R2生长阶段的特征在于在具有完全形成的叶的主茎上的两个最高的节之一上的单一开放的花。

[0266] 使用随机化完全区组设计设立这些试验,每个处理具有四个重复。每个样地宽2行,并且各行相隔30英寸隔开。将样地种植到总长度12.5ft,其中样地间具有2.5至3.0ft小径。预期Maverick对照植物死于除草剂应用,因此它们在分开的样地中种植;远离转基因大豆植物行。

[0267] 汇总了与未喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1相比用2,4-D和草甘膦除草剂罐混合物喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1的结果。表7呈现来自比较用2,4-D和草甘膦罐混合物喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1与未喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1的分析的均值。除草剂应用没有损伤大豆事件pDAB8264.44.06.1,与未喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1植物相比,这些植物在表7中所列的报告农艺学特征方面等同表现。除了V3发育阶段的1和7daa(应用后天数)和R2发育阶段的1、7和14daa时的某种早期瞬时损伤外,大豆事件pDAB8264.44.06.1显示对2,4-D和草甘膦罐混合物的强力耐受性。相比之下,Maverick植物在用除草剂处理喷雾后无一存活。

[0268] 表7:用2,4-D草甘膦的罐混合物喷雾的和未喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1的比较。

大豆事件pDAB8264.44.06.1		
性状: 农艺学特征	喷雾的	未喷雾的
出土(%)	90.2	84.0
活力V1-V3 (%)	93.4	88.4
V3除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤1 daa (%)	1.3	0.0
V3除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤7 daa (%)	1.1	0.0
V3除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤14 daa (%)	0.0	0.0
开花前天数(从种植期的天数)	38.6	38.5
站立计数R2	26.1	22.5

[0270]	R2除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤1 daa (%)	2.8	0.4
	R2除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤7 daa (%)	2.8	0.0
	R2除草剂应用后评定的总体视觉作物损伤; 损伤14 daa (%)	1.7	0.1
	疾病发生率(%)	1.5	1.2
	昆虫损伤(%)	6.9	7.6
	高度(cm)	112.3	110.3
	成熟(从种植起的天数)	114.0	113.7
	倒伏(%)	16.4	18.1
	脱粒(%)	0.1	0.1
	产率(bu/英亩)	44.8	43.9
	100个种子的重量(g)	12.3	12.1

[0271] 评估与对照系Maverick相比大豆事件pDAB8264.44.06.1的农艺学等同性。使用具有两个重复的区段设计设立这些试验。每个样地宽2行,并且各行相隔30英寸隔开。将样地种植到总长度12.5ft,其中样地间具有2.5至3.0英尺小径。

[0272] 表8呈现来自比较大豆事件pDAB8264.44.06.1与对照系Maverick的农艺学等同性的分析的均值。农艺学数据指示大豆事件pDAB8264.44.06.1与Maverick植物等同表现,并且不导致农艺学有意义的非有意差异。

[0273] 表8:田间试验中大豆事件pDAB8264.44.06.1与Maverick对照系的比较。

[0274]

	Maverick		pDAB8264.44.06.1	
出土(%)	86.2	A	83.2	A
活力V1 (1较差 - 9良好)	91.0	A	89.7	A
开花前的天数(从种植起的天数)	41.2	A	40.7	A
站立计数R1	22.7	A	22.2	A

[0275]

疾病发生率(%)	1.8	A	2.1	A
昆虫损害(%)	7.8	A	8.0	A
高度(cm)	110.3	A	112.3	A
成熟(从种植前的天数)	119.7	A	119.1	A
倒伏(%)	16.1	B	20.6	A
脱粒	0.2	A	0.4	A
产率(bu/英亩)	45.7	A	43.7	A
100个种子的重量	13.2	A	12.6	B
对于每个试验,依照Student氏T分布统计学分析,后面没有相同字母的数值是不同的。				

[0276] 实施例6:事件特异性TaqMan测定法

[0277] 开发两种事件特异性Taqman测定法以检测大豆事件pDAB8264.44.06.1的存在,并且测定育种群体中植物的接合性状态。大豆事件pDAB8264.44.06.1含有二元载体pDAB8264的T链(图1)。对于大豆事件pDAB8264.44.06.1的特异性检测,依照位于5'(SEQ ID NO:14)或3'(SEQ ID NO:15)插入物与植物交接的DNA序列设计特异性Taqman引物和探针(图4)。设计一种针对大豆事件pDAB8264.44.06.1的事件特异性测定法以特异性检测跨越5'整合交接的98bp DNA片段(SEQ ID NO:16),其使用两种引物和在其5'端含有FAM报告物的由Applied Biosystems(ABI)合成的靶物特异性MGB探针进行。设计另一种针对大豆事件pDAB8264.44.06.1的事件特异性测定法以特异性检测跨越3'整合交接的131bp DNA片段(SEQ ID NO:17),其使用两种特异性引物和在其5'端含有FAM报告物的由ABI合成的靶物特异性MGB探针进行。针对11种含有2mEPSPS和aad-12PTU的不同事件和对照非转基因大豆品种(Maverick)以双重形式用大豆特异性内源参照基因GMFL01-25-J19(大豆cDNA,GenBank:AK286292.1)测试针对大豆事件pDAB8264.44.06.1的此Taqman检测方法的特异性。

[0278] 实施例6.1:gDNA分离

[0279] 在此研究中测试11种不同大豆事件和非转基因大豆品种的gDNA样品。使用改良的Qiagen MagAttract植物DNA试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)提取基因组DNA。使用新鲜的大豆叶盘(每份样品8个)进行gDNA提取。用Pico Green方法依照卖主的用法说明书(Molecular Probes,Eugene,OR)量化gDNA。出于本研究的目的,将样品用无DNA酶的水稀释,产生10ng/μL的浓度。

[0280] 实施例6.2:Taqman测定法和结果

[0281] 为大豆事件pDAB8264.44.06.1特异性Taqman测定法设计特异性Taqman引物和探针。可以与下文所列的条件一起使用这些试剂以检测大豆事件pDAB8264.44.06.1内的转基因。表9列出了为检测大豆事件pDAB8264.44.06.1特异性开发的引物和探针序列。

[0282] 表9:Taqman PCR引物和探针

[0283]

事件靶物反应			
SEQ ID NO:	名称	描述	序列
SEQ ID NO:18	4406 5'F	事件特异性正向引物	TTGTTCTTGTTGTTT CCTCTTTAGGA
SEQ ID NO:19	4406 5'R	事件特异性反向引物	GACCTCAATTGCGA GCTTTCTAAT
SEQ ID NO:20	4406 5'P	与 4406_5'F 和 4406_5'R 一起 使用的事件特异性探针	5'FAM/CATGGAGGT CCGAATAG-MGB
SEQ ID NO:21	4406 3'F	事件特异性正向引物	AAACGTCCGCAATG TGTTATTAAG
SEQ ID NO:22	4406 3'R	事件特异性反向引物	CGTTGCCTTGTTCCA CATATCA
SEQ ID NO:23	4406 3'P	与 4406_3'F 和 4406_3'R 一起 使用的事件特异性探针	5'FAM/ACAGAGAACG AATGTC-MGB

[0284]

参照系统反应			
SEQ ID NO:	名称	描述	5'至3'序列
SEQ ID NO:24	GMS116 F	正向引物	GTAATATGGGCTCAG AGGAATGGT
SEQ ID	GMS116 R	反向引物	ATGGAGAAGAACATT

[0285]

NO:25			GGAATTGC
SEQ ID NO:26	GMS116探针	探针	5'HEX/CCATGGCCCGGT ACCATCTGGTC/3BHQ 1/3'

[0286] 多重PCR扩增条件如下:10μl总反应中1倍Roche PCR缓冲液、0.4μM事件特异性正向引物、0.4μM事件特异性反向引物、0.4μM引物GMS116F、0.4μM引物GMS116R、0.2μM事件特异性探针、0.2μM GMS116探针、0.1%PVP、20ng gDNA。使用以下条件扩增混合物:i)95℃持续10分钟,ii)95℃持续10秒,iii)60℃持续30秒,iv)72℃持续1秒,v)将步骤ii-iv重复35个

循环,v)40℃保持。在Roche LightCycler480上实施实时PCR。数据分析基于通过LightCycler480软件测定的交叉点(Cp值)的测量,其是荧光变化率达到其最大值时的PCR循环数。

[0287] 针对11种含有2mEPSPS和aad-12PTU的不同事件和非转基因大豆品种以双重形式用大豆特异性内源参照基因GMFL01-25-J19(GenBank:AK286292.1)测试针对大豆事件pDAB8264.44.06.1的Taqman检测方法。该测定法特异性检测大豆事件pDAB8264.44.06.1,并且没有从对照(即11种含有2mEPSPS和aad-12PTU的不同事件和非转基因大豆品种)生成或扩增任何假阳性结果。可以使用事件特异性引物和探针来检测大豆事件pDAB8264.44.06.1,并且这些条件和试剂对于接合性测定法是适用的。

[0288] 实施例7:大豆事件pDAB8264.44.06.1的全长序列

[0289] SEQ ID NO:27提供了大豆事件pDAB8264.44.06.1的全长序列。此序列含有5'基因组侧翼序列、来自pDAB8264的整合T链插入物和3'基因组侧翼序列。就SEQ ID NO:27而言,残基1-1494是5'基因组侧翼序列,残基1495-1497是三个碱基对的插入,残基1498-11,774是pDAB8264T链插入物,并且残基11,775-13,659是3'侧翼序列。如此,就插入物5'端而言的交接序列或过渡存在于SEQ ID NO:27的残基1494-1495。如此,就插入物3'端而言的交接序列或过渡存在于SEQ ID NO:27的残基11,774-11,775。SEQ ID NO:27是大豆事件pDAB8264.44.06.1的多核苷酸序列,并且通过多个PCR重叠群的比对装配,所述PCR重叠群经由PCR扩增反应生成,并使用ABI Big Dye®终止剂测序反应试剂盒(Applied Biosystems,Foster City,CA)测序。

[0290] 实施例8:大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆昆虫耐受性事件pDAB9582.812.9.1的育种叠加

[0291] 实施例8.1:大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆昆虫耐受性事件pDAB9582.812.9.1的有性杂交

[0292] 将大豆事件pDAB8264.44.06.1与大豆事件pDAB9582.812.9.1有性杂交。将大豆事件pDAB8264.44.06.1的花药遍及大豆事件pDAB9582.812.9.1的柱头手动摩擦,由此使大豆事件pDAB9582.812.9.1受精。对含有来自大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者的整合事件的所得F1后代筛选对2,4-D和草甘膦除草剂的耐受性以鉴定含有这两种整合事件的后代植物。接着,将F1后代植物自花传粉以生成F2后代,其确认为在这两种事件方面独立分离。用含有2,4-D(1120g ae/ha)和草甘膦(1120g ae/ha)两者的单一除草剂应用喷雾F2植物。使用基于接合性的Taqman测定法筛选所得的F2植物以鉴定在这两种事件方面纯合的植物。这些F2纯合植物的自交生成大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者方面纯合的F3后代。所得的事件标记为大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1。

[0293] 实施例8.2:测定大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的接合性状态

[0294] 为了测定从大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆事件pDAB9582.812.9.1的育种杂交生成的植物的接合性状态,开发分开的事件特异性TAQMAN®测定法以检测pDAB9582.812.9.1或pDAB8264.44.06.1整合事件的存在。用这些事件特异性TAQMAN®测定法测试分离的F2植物(其从大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1

的育种杂交的自花传粉生成)以鉴定含有大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者,并且在这两种事件方面纯合的个体植物。

[0295] gDNA分离

[0296] 在本研究中测试来自大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的分离F2植物的gDNA样品。自大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的3,187个分离F2植物收集新鲜的大豆叶盘,每个植物4个。使用改良的Qiagen MagAttract植物DNA试剂盒®(Qiagen,Valencia,CA)从这些样品提取基因组DNA。

[0297] **TAQMAN®**测定法和结果

[0298] 针对大豆事件pDAB9582.812.9.1(美国临时申请No.61/471845)和pDAB8264.44.06.1(上文所描述)的个别事件特异性测定法的使用设计设计如先前所描述的**TAQMAN®**引物和探针。与下文所列的条件一起使用这些试剂以测定大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1内含有的每个整合事件的接合性。

[0299] 多重PCR扩增条件如下:总反应10μl中1倍Roche PCR缓冲液、0.4μM事件pDAB8264.44.06.1特异性正向引物、0.4μM事件pDAB8264.44.06.1特异性反向引物、0.4μM事件pDAB9582.812.9.1特异性正向引物、0.4μM事件pDAB9582.812.9.1特异性反向引物、0.4μM引物GMS116F、0.4μM引物GMS116R、0.2μM事件pDAB9582.812.9.1特异性探针、0.2μM事件pDAB8264.44.06.1特异性探针、0.2μM GMS116探针、0.1%PVP、20nggDNA。使用以下条件扩增混合物:i)95℃持续10分钟,ii)95℃持续10秒,iii)60℃持续30秒,iv)72℃持续1秒,v)将步骤ii-iv重复35个循环,v)40℃保持。在Roche **LightCycler®** 480上实施实时PCR。数据分析基于通过LightCycler480软件测定的交叉点(Cp值)的测量,其是荧光变化率达到其最大值时的PCR循环数。

[0300] 用事件特异性**TAQMAN®**测定法测试从大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1的育种杂交生成的总共3,187个分离的F2植物以测定个体植物在大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者方面的接合性。来自这些测定法的结果指示大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1在2,360个植物中都是存在的且检出的。表9b中指示每种整合事件的接合性状态(又称为倍数性水平)。在2,360个鉴定的植物中,237个测定为含有两个拷贝的大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1。

[0301] 表9b:对大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的事件特异性**TAQMAN®**接合性分析

[0302]

pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的接合性状态	植物数目
纯合的::纯合的	237
纯合的:: 半合子的	506
纯合的:: 空的	287
半合子的:: 纯合的	542
半合子的:: 半合子的	1075

[0303]

半合子的:: 空的	540
-----------	-----

[0304] 实施例8.3:大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中蛋白质表达的表征

[0305] 表征大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中表达的重组Cry1F, Cry1Ac, AAD12, 2mEPSPS, 和PAT蛋白的生物化学特性。使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)来量化PAT的表达。比较地, 利用来自Meso-ScaleDiscovery(MSD, Gaithersburg, Maryland)的电化学发光技术通过多路(multiplexed)免疫测定法量化Cry1Ac/Cry1F和AAD12/2mEPSPS蛋白。这些测定法共同用于表征生物化学特性, 并且确认大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中这些蛋白质的强力表达。

[0306] 植物组织中PAT蛋白的表达

[0307] 在F3大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加中测定PAT蛋白的水平, 所述F3大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1鉴定为在事件pDAB9582.812.9.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面是纯合的。与亲本事件大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1比较从大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1表达的PAT蛋白水平。

[0308] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的PAT蛋白, 并使用定量ELISA方法(APS014, Envirologix, Portland, ME)测量。从单叶至V1阶段的温室种植测试植物分离大豆叶组织的样品, 并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取PAT蛋白。然后, 以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心; 将水性上清液收集, 在必要时用合适的缓冲液稀释, 并以三明治式形式使用PAT ELISA试剂盒分析。遵循制造商提示的方案(Envirologix, Portland, ME)使用试剂盒。

[0309] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。育种叠加大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比任一亲本事件pDAB9582.812.9.1和pDAB8264.44.06.1表达更高浓度的PAT。预期大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加中PAT的浓度升高。较高的PAT浓度是与任

一亲本事件相比含有两倍的pat编码序列拷贝的大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的结果(表10)。

[0310] 表10:来自大豆事件的pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1,和亲本事件(大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1)的平均PAT蛋白表达。

[0311]

大豆事件	平均PAT表达(ng/cm ²)
pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1	38.0
pDAB9582.812.9.1	11.0
pDAB8264.44.06.1	13.3

[0312] 植物组织中Cry1F和Cry1Ac蛋白的表达

[0313] 在鉴定为在事件pDAB9582.812.9.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面纯合的F3大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中测定Cry1F和Cry1Ac蛋白的水平。与亲本事件大豆事件pDAB9582.812.9.1比较从大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1表达的Cry1F和Cry1Ac蛋白水平。

[0314] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的Cry1F和Cry1Ac蛋白,并使用多路电化学发光MSD测定法测量。从单叶至V1阶段的温室种植的测试植物分离大豆叶组织的样品,并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取Cry1F和Cry1Ac蛋白。然后,以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心;将水性上清液收集,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用来自Meso-Scale Discovery的Cry1F/Cry1Ac多重MSD测定法分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0315] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比亲本大豆事件pDAB9582.812.9.1表达更高浓度的Cry1F和Cry1Ac蛋白。(表11)。这些结果指示大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1植物含有从亲本系大豆事件pDAB9582.812.9.1遗传的cry1F和cry1Ac编码序列的功能性表达拷贝。

[0316] 表11:与亲本事件pDAB9582.812.9.1相比来自大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的平均Cry1Ac和Cry1F蛋白表达

[0317]

大豆事件	平均Cry1Ac表达 (ng/cm ²)	平均Cry1F表达 (ng/cm ²)
pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1	27.1	140.5

[0318]

pDAB9582.812.9.1	20.8	112.9
------------------	------	-------

[0319] 植物组织中AAD12和2mEPSPS蛋白的表达

[0320] 在鉴定为在事件pDAB9582.812.9.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面纯合的F3大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中测定AAD12和2mEPSPS蛋

白的水平。与亲本事件大豆事件pDAB8264.44.06.1比较从大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1表达的AAD12和2mEPSPS蛋白水平。

[0321] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的AAD12和2mEPSPS蛋白,并使用多路电化学发光MSD测定法测量。从单叶至V1阶段的温室种植测试植物分离大豆叶组织的样品,并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取AAD12和2mEPSPS蛋白。然后,以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心;将水性上清液收集,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用来自Meso-Scale Discovery的AAD12和2mEPSPS多重MSD测定法分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0322] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比亲本大豆事件pDAB8264.44.06.1表达更高浓度的AAD12和2mEPSPS蛋白。(表12)。这些结果指示大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1植物含有从亲本系大豆事件pDAB8264.44.06.1遗传的aad-12和2mEPSPS编码序列的功能性表达拷贝。

[0323] 表12:与亲本大豆事件pDAB8264.44.06.1相比来自大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的平均AAD12和2mEPSPS蛋白表达

[0324]

大豆事件	平均AAD12表达 (ng/cm ²)	平均2mEPSPS表达 (ng/cm ²)
pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1	479.7	410.3
pDAB8264.44.06.1	320.4	328.9

[0325] 实施例8.4:大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的除草剂耐受性

[0326] 在两个生长期期间测定育种叠加(大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1)的除草剂耐受性。将大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1种子种植,并培养至成熟。用单一除草剂应用喷雾成熟的植物,所述单一除草剂应用由2,4-D和草甘膦的组合组成。通过计算存活植物的数目测量对这些除草剂的所得耐受性。比较地,本研究中包括对照植物,其不含aad-12和2mEPSPS基因,并且预期对2,4-D和草甘膦除草剂的应用易感。

[0327] 在第一季期间,对大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的F2分离谱系在120个田间种植样地中评估除草剂耐受性。每个样地宽1行,并且各行相隔30英寸隔开。将样品在12英尺中心上(总共种植长度7.5英尺),各个样地之间具有4.5英尺小径。用2,4-D和草甘膦的混合物(1120g ae/ha)喷雾来自大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的F2分离谱系的总共4,364个植物。在V3和V4生长阶段之间进行草甘膦/2,4-D除草剂的单一喷雾应用。V3生长阶段的特征在于完全形成的单叶的和前三个三叶的叶,而V4生长阶段的特征在于完全形成的单叶的和前四个三叶的叶。在完成除草剂处理后,观察样地,并将3,234个植物鉴定为对除草剂应用有耐受性。对除草剂应用易感的大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1植物由于

pDAB8264.44.06.1整合事件的孟德尔分离而不含aad-12和2mEPSPS的拷贝。

[0328] 在第二季期间,在大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的温室种植的F3纯合植物中评估除草剂耐受性。将大豆植物在每个样地含有一个植物的4英寸样品中种植。用2,4-D和草甘膦的单一应用(840ae/ha)喷雾总共15个F3纯合植物。所有15个植物在用除草剂喷雾后存活,指示大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1植物对除草剂草甘膦和2,4-D的应用有耐受性。

[0329] 总之,大豆事件pDAB8264.44.06.1亲本系中存在的aad-12和2mEPSPS基因赋予对2,4-D和草甘膦除草剂的耐受性。这些性状在大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1中传递并遗传,由此对大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1提供除草剂耐受性。比较地,不含aad-12和2mEPSPS基因的对照植物对2,4-D和草甘膦除草剂的应用易感。

[0330] 实施例8.5:大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的杀昆虫活性的表征

[0331] 进行温室评估以表征大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的杀昆虫耐受性,其源自cry1Ac和cry1F转基因表达。针对实验室饲养的大豆有害物,包括黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmatalis*)(黎豆毛虫(*velvetbean caterpillar*))和*Pseudoplusia includens*(大豆尺蠖)测试大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1。在非转化的大豆品种Maverick外,针对亲本大豆事件(大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1)比较大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1。进行此比较以测定由Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的植物保护水平是否会存在于育种叠加中,该育种叠加将其它转基因导入大豆植物的基因组中。另外,用含有2,4-D和草甘膦的单一除草剂应用(840g ae/ha)喷雾大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者,之后进行昆虫生物测定法以测定除草剂的喷雾对由Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的针对昆虫的植物保护是否具有任何影响。

[0332] 对约三周龄的植物进行温室试验。使用每10个植物来评估大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1、大豆事件pDAB9582.812.9.1、和阴性对照;经除草剂喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1和Maverick。对于测试的每种昆虫物种(黎豆夜蛾和*Chrysodeixis*(以前为*Pseudoplusia*)*includens*),从每个植物生成3个叶冲孔,总共30个叶盘/植物/昆虫物种。将1.4cm直径(或1.54cm²)叶冲孔在2%水琼脂上方的测试场中放置,用一个新生幼虫侵袭,并用穿孔的塑胶盖密封。在侵袭后4天评定死亡率和叶消耗。认为不响应温和探查的幼虫是死亡的。通过视觉评分昆虫消耗的叶冲孔的百分比评估叶损伤。使用JMP®Pro9.0.1(2010SAS Institute Inc.,Cary,NC)对数据实施统计学分析。

[0333] 自这些重复实验获得的结果(表13)指示由大豆事件育种叠加pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1的Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的昆虫保护水平和死亡率与亲本大豆事件pDAB9582.812.9.1一致。如预期的,对于测试的所有昆虫,大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1比大豆事件pDAB8264.44.06.1(58-76%) and Maverick(79-91%)对照植物维持显著更低的昆虫损伤(0.10-0.15%)。另外,对含有cry1F和cry1Ac编码序列的所有大豆事件记录高昆虫死亡率(100%),而阴性对照Maverick和大豆事

件pDAB8264.44.06.1产生小于10%的昆虫死亡率。如此,大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1在与亲本大豆事件pDAB9582.812.9.1相当的水平提供保护免于杀昆虫活性。

[0334] 表13:显示了以各种大豆事件为食的Pseudoplusia includens(SBL)和黎豆夜蛾(VBC)的均值百分比叶损伤和死亡率。(n=24)

[0335]

大豆事件	昆虫	均值%叶损伤	均值%死亡率
Maverick	SBL	91.46	4.2
	VBC	78.96	0
pDAB8264.44.06.1	SBL	75.83	0
	VBC	58.33	8.3
pDAB9582.812.9.1	SBL	0.10	100
	VBC	0.15	100
pDAB9582.812.9.1 x pDAB8264.44.06.1	SBL	0.10	100
	VBC	0.10	100

[0336] 实施例9:大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆昆虫耐受性事件pDAB9582.814.19.1的育种叠加

[0337] 实施例9.1:大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆昆虫耐受性事件pDAB9582.814.19.1的有性杂交

[0338] 将大豆事件pDAB8264.44.06.1与大豆事件pDAB9582.814.19.1有性杂交。将大豆事件pDAB8264.44.06.1的花药遍及大豆事件pDAB9582.814.19.1的柱头手动摩擦,由此使大豆事件pDAB9582.814.19.1受精。对含有来自大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者的整合事件的所得F1后代筛选对2,4-D和草甘膦除草剂的耐受性以鉴定含有这两种整合事件的后代植物。接着,将F1后代植物自花传粉以生成F2后代,其确认为在这两种事件方面独立分离。用含有2,4-D(840g ae/ha)和草甘膦(840g ae/ha)两者的单一除草剂应用喷雾F2植物。使用基于接合性的Taqman测定法筛选所得的F2植物以鉴定在这两种事件方面纯合的植物。这些F2纯合植物的自交生成大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者方面纯合的F3后代。所得的事件标记为大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1。

[0339] 实施例9.2:大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的接合性状态的测定

[0340] 为了测定从大豆事件pDAB8264.44.06.1和大豆事件pDAB9582.814.19.1的育种杂交生成的植物的接合性状态,开发分开的事件特异性TAQMAN®测定法以检测pDAB9582.814.19.1或pDAB8264.44.06.1整合事件的存在。用这些事件特异性

TAQMAN® 测定法测试分离的F2植物(其从大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1的育种杂交的白花传粉生成)以鉴定含有大豆事件pDAB9582.812.9.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者,并且在这两种事件方面纯合的个体植物。

[0341] gDNA分离

[0342] 在本研究中测试来自大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的分离F2植物的gDNA样品。自大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的37个分离F2植物收集新鲜的大豆叶盘,每个植物4个。使用改良的Qiagen MagAttract植物DNA试剂盒®(Qiagen,Valencia,CA)从这些样品提取基因组DNA。

[0343] **TAQMAN®**测定法和结果

[0344] 针对大豆事件pDAB9582.814.19.1(美国临时申请No.61/471845)和pDAB8264.44.06.1(上文所描述)的个别事件特异性测定法的使用设计设计如先前所描述的**TAQMAN®**引物和探针。与下文所列的条件一起使用这些试剂以测定大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1内含有的每个整合事件的接合性。

[0345] 多重PCR扩增条件如下:总反应10μl中1倍Roche PCR缓冲液、0.4μM事件pDAB8264.44.06.1特异性正向引物、0.4μM事件pDAB8264.44.06.1特异性反向引物、0.4μM事件pDAB9582.814.19.1特异性正向引物、0.4μM事件pDAB9582.814.19.1特异性反向引物、0.4μM引物GMS116F、0.4μM引物GMS116R、0.2μM事件pDAB9582.814.19.1特异性探针、0.2μM事件pDAB8264.44.06.1特异性探针、0.2μM GMS116探针、0.1%PVP、20nggDNA。使用以下条件扩增混合物:i)95℃持续10分钟,ii)95℃持续10秒,iii)60℃持续30秒,iv)72℃持续1秒,v)将步骤ii-iv重复35个循环,v)40℃保持。在Roche **LightCycler®** 480上实施实时PCR。数据分析基于通过LightCycler480软件测定的交叉点(Cp值)的测量,其是荧光变化率达到其最大值时的PCR循环数。

[0346] 用事件特异性**TAQMAN®**测定法测试从大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1的育种杂交生成的总共37个分离的F2植物以测定个体植物在大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1两者方面的接合性。来自这些测定法的结果指示大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1在23个植物中都是存在的且检出的。表14中指示每种整合事件的接合性状态(又称为倍数性水平)。在23个鉴定的植物中,鉴定为含有两个拷贝的大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1的1个植物。

[0347] 表14:对大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的事件特异性**TAQMAN®**接合性分析

[0348]

pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1 的 接 合 性 状 态	植 物 数 目
纯合的::纯合的	1
纯合的::半合子的	7
纯合的::空的	1
半合子的::纯合的	3
半合子的::半合子的	12
半合子的::空的	5
空的::纯合的	0
空的::纯合的	2
空的::空的	6

[0349] 实施例9.3:大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中蛋白质表达的表征

[0350] 表征大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中表达的重组Cry1F, Cry1Ac, AAD12, 2mEPSPS, 和PAT蛋白的生物化学特性。使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)来量化PAT的表达。比较地, 利用来自Meso-ScaleDiscovery(MSD, Gaithersburg, Maryland)的电化学发光技术通过多路免疫测定法量化Cry1Ac/Cry1F和AAD12/2mEPSPS蛋白。这些测定法共同用于表征生物化学特性, 并且确认大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中这些蛋白质的强力表达。

[0351] 植物组织中PAT蛋白的表达

[0352] 在F3大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加中测定PAT蛋白的水平, 所述F3大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加鉴定为在事件pDAB9582.814.19.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面是纯合的。与亲本事件大豆事件pDAB9582.814.19.1和大豆事件pDAB8264.44.06.1比较从大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1表达的PAT蛋白水平。

[0353] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的PAT蛋白, 并使用定量ELISA方法(APS014, Envirologix, Portland, ME)测量。从单叶至V1阶段的温室种植的测试植物分离大豆叶组织的样品, 并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取PAT蛋白。然后, 以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心; 将水性上清液收集, 在必要时用合适的缓冲液稀释, 并以三明治式形式使用PAT ELISA试剂盒分析。遵循制造商提示的方案(Envirologix, Portland, ME)使用试剂盒。

[0354] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。育种叠加大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比任一亲本

事件pDAB9582.814.19.1和pDAB8264.44.06.1表达更高浓度的PAT。预期大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加中PAT的浓度升高。较高的PAT浓度是与任一亲本事件相比含有两倍的pat编码序列拷贝的大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的结果(表15)。

[0355] 表15:来自大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1,和亲本事件(大豆事件pDAB9582.814.19.1和pDAB8264.44.06.1)的平均PAT蛋白表达

[0356]

大豆事件	平均 PAT 表达 (ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1	20.1
pDAB9582.814.19.1	12.0
pDAB8264.44.06.1	13.3

[0357] 植物组织中Cry1F和Cry1Ac蛋白的表达

[0358] 在鉴定为在事件pDAB9582.814.19.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面纯合的F3大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中测定Cry1F和Cry1Ac蛋白的水平。与亲本事件大豆事件pDAB9582.814.19.1比较从大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1表达的Cry1F和Cry1Ac蛋白水平。

[0359] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的Cry1F和Cry1Ac蛋白,并使用多路电化学发光MSD测定法测量。从单叶至V1阶段的温室种植的植物分离大豆叶组织的样品,并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取Cry1F和Cry1Ac蛋白。然后,以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心;将水性上清液收集,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用来自Meso-Scale Discovery的Cry1F/Cry1Ac多重MSD测定法分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0360] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比亲本大豆事件pDAB9582.814.19.1表达更高浓度的Cry1Ac蛋白。大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比亲本大豆事件pDAB9582.814.19.1表达更低浓度的Cry1F蛋白。(表16)。尽管表达水平有变化性,这些结果指示大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1植物含有从亲本系大豆事件pDAB9582.814.19.1遗传的cry1F和cry1Ac编码序列的功能性表达拷贝。

[0361] 表16:与亲本事件pDAB9582.814.19.1相比来自大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的平均Cry1Ac和Cry1F蛋白表达

[0362]

大豆事件	平均Cry1Ac表达 (ng/cm ²)	平均Cry1F 表达(ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1	25.3	55.7
pDAB9582.814.19.1	22.4	106.7

[0363] 植物组织中AAD12和2mEPSPS蛋白的表达

[0364] 在鉴定为在事件pDAB9582.814.19.1和事件pDAB8264.44.06.1整合两者方面纯合的F3大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中测定AAD12和2mEPSPS蛋白的水平。与亲本事件大豆事件pDAB8264.44.06.1比较从大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1表达的AAD12和2mEPSPS蛋白水平。

[0365] 从大豆叶组织获得可溶性、可提取的AAD12和2mEPSPS蛋白,并使用多路电化学发光MSD测定法测量。从单叶至V1阶段的温室种植的植物分离大豆叶组织的样品,并准备好进行表达分析。用含有去污剂Tween-20(PBST)和1%聚乙烯吡咯酮40(PVP-40)的磷酸盐缓冲盐水溶液从大豆植物组织提取AAD12和2mEPSPS蛋白。然后,以1500rpm使用GenoGrinder®达5分钟来提取样品。将植物提取物离心;将水性上清液收集,在必要时用合适的缓冲液稀释,并使用来自Meso-Scale Discovery的AAD12和2mEPSPS多重MSD测定法分析。遵循制造商提示的方案使用试剂盒。

[0366] 实施检测分析以调查大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的表达和遗传力。大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的F3世代比亲本大豆事件pDAB8264.44.06.1表达更低浓度的AAD12和2mEPSPS蛋白。(表17)。尽管表达水平有变化性,这些结果指示大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1植物含有从亲本系大豆事件pDAB8264.44.06.1遗传的aad-12和2mEPSPS编码序列的功能性表达拷贝。

[0367] 表17:与亲本大豆事件pDAB8264.44.06.1相比来自大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的平均AAD12和2mEPSPS蛋白表达

[0368]

大豆事件	平均AAD12 表达(ng/cm ²)	平均 2mEPSPS表 达(ng/cm ²)
pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1	261.3	127.9
pDAB8264.44.06.1	320.4	328.9

[0369] 实施例9.4:大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的除草剂耐受性

[0370] 测定育种叠加(大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1)的除草剂耐受性。将大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1种子在温室研究中种植,并用由2,4-D和草甘膦的组合组成的单一除草剂应用喷雾成熟的植物。通过计算存活植物的数目测量对这些除草剂的所得耐受性。比较地,本研究中包括对照植物,其不含aad-12和2mEPSPS

基因,并且预期对2,4-D和草甘膦除草剂的应用易感。

[0371] 在大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的温室培养的F2植物中评估除草剂耐受性。将大豆植物在每个样地含有一个植物的4英寸样品中种植。在单叶生长阶段用2,4-D和草甘膦的单一应用(840ae/ha)喷雾总共37个F3纯合植物。所有25个植物在用除草剂喷雾后存活,指示大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1植物对除草剂草甘膦和2,4-D的应用有耐受性。

[0372] 总之,大豆事件pDAB8264.44.06.1亲本系中存在的aad-12和2mEPSPS基因赋予对2,4-D和草甘膦除草剂的耐受性。这些性状在大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1中传递并遗传,由此对大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1提供除草剂耐受性。对除草剂应用易感的大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1植物由于pDAB8264.44.06.1整合事件的孟德尔分离而不含aad-12和2mEPSPS的拷贝。另外,不含aad-12和2mEPSPS基因的对照植物对2,4-D和草甘膦除草剂的应用易感。

[0373] 实施例9.5:大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的杀昆虫活性的表征

[0374] 进行温室评估以表征大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的杀昆虫耐受性活性,其源自cry1Ac和cry1F转基因表达。针对实验室饲养的大豆有害物,包括黎豆夜蛾(黎豆毛虫)和*Pseudoplusia includens*(大豆尺蠖)测试大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1。在非转化的大豆品种Maverick外,针对亲本大豆事件(大豆事件pDAB9582.814.19.1和pDAB8264.44.06.1)比较大豆事件pDAB9582.812.9.1::pDAB8264.44.06.1育种叠加。进行此比较以测定由Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的免于昆虫损害的植物保护水平是否会存在于育种叠加中,该育种叠加将其它转基因导入大豆植物的基因组中。另外,用含有2,4-D和草甘膦的单一除草剂应用(840g ae/ha)喷雾大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1和pDAB8264.44.06.1两者,之后进行昆虫生物测定法以测定除草剂的喷雾对由Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的针对昆虫的植物保护是否具有任何影响。

[0375] 对约三周龄的植物进行温室试验。使用每10个植物来评估大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1、大豆事件pDAB9582.814.19.1、和阴性对照;经除草剂喷雾的大豆事件pDAB8264.44.06.1和Maverick。对于测试的每种昆虫物种(黎豆夜蛾和*Pseudoplusia includens*),从每个植物生成3个叶冲孔,总共30个叶盘/植物/昆虫物种。将1.4cm直径(或1.54cm²)叶冲孔在2%水琼脂上方的测试场中放置,用一个新生幼虫侵袭,并用穿孔的塑胶盖密封。在侵袭后4天评定死亡率和叶消耗。认为不响应温和探查的幼虫是死亡的。通过视觉评分昆虫消耗的叶冲孔的百分比评估叶损伤。使用JMP® Pro9.0.1(2010SAS Institute Inc., Cary, NC)对数据实施统计学分析。

[0376] 自这些重复实验获得的结果(表18)指示由大豆事件育种叠加pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1的Cry1F和Cry1Ac蛋白提供的昆虫保护水平和死亡率与亲本大豆事件pDAB9582.814.19.1一致。如预期的,对于测试的所有昆虫,大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1比大豆事件pDAB8264.44.06.1(58-76%) and Maverick(79-91%)对照植物维持显著更低的昆虫损伤(0.10-0.12%)。另外,对含有cry1F和

cry1Ac编码序列的所有大豆事件记录高昆虫死亡率(100%),而阴性对照Maverick和大豆事件pDAB8264.44.06.1,产生小于10%的昆虫死亡率。如此,大豆事件pDAB9582.814.19.1::pDAB8264.44.06.1在与亲本大豆事件pDAB9582.814.19.1相当的水平提供保护免于杀昆虫活性。

[0377] 表18:显示了以各种大豆事件为食的Pseudoplusia includens(SBL)和黎豆夜蛾(VBC)的均值百分比叶损伤和死亡率。(n=24)

[0378]

大豆事件	昆虫	均值%叶损伤	均值%死亡率
Maverick	SBL	91.46	4.2
	VBC	78.96	0
pDAB8264.44.06.1	SBL	75.83	0
	VBC	58.33	8.3
pDAB9582.814.19.1	SBL	0.12	100
	VBC	0.10	100
pDAB9582.814.19.1::	SBL	0.10	100
pDAB8264.44.06.1	VBC	0.10	100

序列表

<110> 陶氏益农公司 (Dow AgroSciences LLC); MS 技术有限责任公司 (M.S. Technologies, Inc.)

<120> 叠加的除草剂耐受性事件 8264.44.06.1、相关转基因大豆系、及其检测

<130> DAS-P0189-01

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 570

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 主题大豆事件 pDAB8264.44.06.1 的 5'侧翼边界序列
(5' flanking border sequence for the subject soybean Event
pDAB8264.44.06.1)

<400> 1

```

agcttaacat acnagtaag tatccacag tacgaanaat gicnggttc ttattigtc 60
tccataatig ttcttgatt ccgacnaag caagagcaic cagictcaaa aiiitgtctt 120
ctcaattcac tcattccaca aaatccagag tttiatgcat caacagcat ggaatgtiga 180
accacccatg attaagcccc atatcgttgi gttagataa ctatcactg aagttgtctt 240
ataaaaaaca catcgaata ctlttaaaat cataccitlc tgggctltt ggctaagalc 300
aagtgtagta tctgttctta tcagtttaai atctgataig tgggtcattg gcccaatga 360
tataaattt attttttaa ggttgggggc tgacatagta gcttgcactt ggggttctt 420
aagcgtagcc tgtgtcttgc actactgcat gggcctggcg caccctacga ttcagtgtat 480
atttatgtgt gataatgta tgggttttta ttgttcttgt tgtttctctt ttaggaaatt 540
acatgtaaac gataaggta tcatggagg 570

```

[0001]

<210> 2

<211> 1499

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 主题大豆事件 pDAB8264.44.06.1 的 3'侧翼边界序列

<400> 2

```

acagagaacg aatgicgtgt gatagttga acaaggcaac gacaacaaca tacatgaac 60
tcacaataga gtccgggtcg ccgagttgt atgtaacca tggcatggac atggtagccg 120
atcgaaacag aaaaaagaaa tgcattgata tggtagaaa tgagagtitt tttatacaa 180
ataataaana aaatttaatt atttaccaca aaattattt acatgaccga tacgtacact 240
tttttcctta gtaagaaac accgatttct taattacatt ttttataca tttagaatt 300
ggtttcctta gaaccgattt caaatgttc atttttttt tcaaaacca gtaagazat 360
cggltccttg gaaaacgact tcllaattgc ttttttttt gtttgtttt aaattgttt 420
gtatttttat ttttttggtt ataatgttc tataatttg ttcgtttta atgaaaca 480
atattatttt tcatatgttg ttaattctta atttcttatg catattttat gttttatcat 540
tttttaagag ttgaaatcct ttgtatttt attttattg attattata tacataatta 600
aacaacaact taattgaat taaaaaat atatttaact gacagtiga ctgaaactaa 660
aattttaaa ttscaaaata gatatgaat tacaaacaat agaacaant atttaattt 720
gaaataaac acaaaaaat taaaaaaca acaaatagg caaanaaa algttgtagg 780
cttagacctt caaatgggg ggaatgcac acatggaaca tcattttggt ttacttgatt 840

```

```

cttggatata cattttggig tgtatagag aggagacatg acaaccttta gaatttcttt    900
tcatttlltg gtgggggcaa attcttggct tgigacatgg tgaccaacat gcttcattgc    960
acsaattccc aagttaatcat ttgtacatgt tatngalact tticagcgta tacacaagat    1020
gtatgtagt tctatactca tggtagcat gcttataaac acaacatga gaacaaaaca    1080
tgigcatttt tgaatttgg tcacagtcac actacccttc atctagcttg accaigaaat    1140
ttctactag ttgaactct ctctccagtt aattgtctcc tagactaaga atgtatgic    1200
gcattaatcg aactcaagaa caatgtgaga gtitgccttt ttctgtatgt cttcatagc    1260
cttgtttaat acttttgiat aaacttcacc aaagttaac actcttgcga ctctctccc    1320
cctttggttg aacaatcat tacacctagt ataggttgat ttaccaacr cacattgcc    1380
gattttgtgt ttctttagt accaattta ttacacagc gtcccactcg ccagccacca    1440
tccatcgga gagtccact ttcttggga atcttctaa gctaattaa ttgttagta    1499

```

```

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 4406_WF1

<400> 3
aggttgtcat tccgtgaag aagat    25

```

[0002]

```

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 4406_WF2

<400> 4
cacagtggac aattctgatt tctgg    25

```

```

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 4406_WF3

<400> 5
ggaatgcac tgaacggat catat    25

```

```

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 4406_WF4

<400> 6
ggaatgtga accaccatg attsa    25

```

```

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 4406_WF5

```

[0003]	<400> 7	
	caigtatgtt gtgtcgttg ccttg	25
	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 4406.WR6	
	<400> 8	
	aacatttga aatcgttcc agga	25
	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 4406.WR7	
	<400> 9	
	aggtcagggc caacnscatt aattt	25
	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 4406.WR8	
	<400> 10	
	ggagagaggt cgcacacagtg attacat	27
[0003]	<210> 11	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 ED_v1.C1	
	<400> 11	
	gagtaagga gaccgagagg atgggt	26
	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 PAT.12	
	<400> 12	
	gaacgttacc gatggacag tga	24
	<210> 13	
	<211> 10256	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 质粒 pDAB8264	
	<400> 13	
	agtcagcatc atcacaccaa aagtinggcc cgantagitt gaaatagaa agctcgcaat	60
	tgaggctac aggcacaaat cgtctttage cgtacaatat taatcacagg atcctaacgg	120
	gtgtgaicat gggccggcat taaaatcic aattataitt ggtciaattt agtttggtat	180
	tgagiassac aaaticgaac caaaccaaaa taiaaaataa tagitititai atataigcct	240

[0004]

ttaagacttt ttatagaatt ttetttaaaa aatactaga aatttttgcg acctttctgg	300
catgtaatt ttctgtaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattgggtg	360
tsagatcaat ttcttaacaa ggtttactaa aatggcgcaa tctctttgtt ctccatatt	420
catatgaca aacctatcaa aattcttata tatcttttcc gaatttgang tgaattttcg	480
ataatttana attaataga acatattatt atttaggtat catattgatt ttataactta	540
attactaat ttggtaact ttgaaaggtt acatcaacga auaattagtc aaacgactaa	600
ataaatana tatcatgtgt tatlaagaaa attctcttat agaatattt taatagatca	660
tatgtttgta aaaaaaata atttttacta acacatafat ttaacttata aaaaattgac	720
aaagtaagat taaaatana ttctctaac aaaaaaata ccgaaaatg ctgaaaacc	780
ggcaaaaccg aacctatca aaccgatata gtgtgtttgg ttgattttg atataaaccg	840
aaacaaactg gtccatttc accctaac acatattgct tttatttca agattttatt	900
aagttaactg tgcataatc ctggaaattt tgcataatga atcaagccta tatggctgta	960
ataatgattt aaagcagct cgaatgtgtg gtaattatga atttactga ttctaaaaa	1020
atactccaa gtattatatt ttctgtatgg aagaagggtt gctacgattt acagcaagc	1080
cagaatacaa tgaacctata agtgattgaa gtctgaaata taaggaggaa caaatatttt	1140
taaaaaata cgaatgct ttgaaacaaa gaaagtata tttttttgt tttaaacaa	1200
gcctcccttc taaagaatgg cagtttctt ttgcattgaa ctattatgct cctttctgta	1260
caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaat agtggccacc gcttattaa	1320
ggcgcgcgca gaattgtccc cgaataaatc tggggagct taaagcgaat ataaattgga	1380
accagaatat agaattcttg ttctgtctta gctttcttc tttacatttt ttacgattg	1440
actatgattt tcatcraata accaaaaatc tgaagtgtt catcaagttg ctcaacaaa	1500
cttgtaacgg ttgttttcgg tttaataca gtctacgttt acatttaac caaaatcggt	1560
ttatgtctta ataaaggat ttggtcgttt taactcata ccgtaccant ggaagtcgt	1620
gtccgcgttt cagtatcttt gtctattgtc ttctacggga actttccgg acataggac	1680
cgccttttc ttatctctat ccatcgtaa atcaggaaat aaatgttca agatttgagg	1740
tcaaaagtcg aatttcatgt tgtctctct atttagatac auaattgag caattttac	1800
caatttaagt ccaaaattta aaacaacgt gataaagta aacttgattt gatttatatt	1860
tcaaccgaaa ctgcagagc aagaagaaa agcgtaatt cactaacaa gaacgtacc	1920
gcnaactact aaacgcaaaa ccaaatata aagtaaaacg cagacgtta agtgagaaac	1980
ccagaaaaa caaacgcgga tgggggac cactagttct agagcttaatt tttagacgaa	2040
agtgctcagc acatcgaagt agtcgggaa ggtcttcgg gtgcaccag ggtccggat	2100
ggtagcggg acctcggc acggggcag ggaagaagc atgcacacc tgggtcgtc	2160
gtactgttc atgcgctca cgttcagett ctccggcgcc gtgaatgtc agtagtcgg	2220
cctttctca acagatgtc ccagtttgtt tagctcgtc cggatcgca ccatctctc	2280
ggctctctt actctcagg aagccacgtc tctgatggt gtccggcctt cggcaagag	2340
ggcaaccaca gcaagagica tggcgacac aggcattct ttcatgtga catcaatgc	2400
cttaggtgtt ttcttccaa atgctcccg cgttgggcca ataacagta cgtatgtc	2460
ggctcatgta acctcgtc ccatctctc cagtacctc gcaaaattca catcaccgt	2520
caaaciggtg gtgcacaa ctctcactt cactgtctt ccagtaatt cggcaccagc	2580
caagaatat ctgtcgttg agcatcacc ttcaaatag gattttttg gggacttgta	2640

	tttttgacct cccitaaatgt agaatcctgic ccagctatca gaatgctctg ctitcacacc	2760
	aaaaagctcc atcaatctca atgtcatctc gacgtacgga atggagatla atttatcaat	2760
	gatttcaate tccacatccc caagagccaa aggagcagcc atcagcaagg cactcaagta	2820
	cigactctg atggagccag acagcttgc ctigccacca gtagccctc cgattccatt	2880
	gacacgaaca gggtggcagt cagtgccaag gaacaaatca acatctgcac caagctgctt	2940
	caatccgaca accaagtccg caatgggctt ctccctcaat ctgggtatc catcaagcac	3000
	gtaagtigca tticcaccag cagcagtaac agctgctgic aaggaccgca ttgcgattcc	3060
	agcatccccc aagaagagct gcacttccic tttagcctcc tcaactggga acitccacc	3120
	acagccaaca actacagctc tttaggcagc ttigtccgtc tgcacagaga gaccaagagt	3180
	cttcaaggcc ccgagcaigt agtggacatc ctacactgtc agcaggttat caaccactgt	3240
	tgtccctcgc gacagggcgg caggtaggag gattccgttg gaaagcgact tggaccctgg	3300
	cagcttaacg gtgcgggaga tctccttgat gggtgcagc acgatctcct cggcgccggc	3360
	catgcaccgg atcttccgc cgttgcagc gtgcggagg ctctcgagg agcgccgggc	3420
	gagggggagg ctggcggttg acttgagccc ctggaccgga ccgacggcgg tggccgacga	3480
	ggccatcacc acggtgggcy ccatagacag cggcgccagg taccacagcy tctcgacctt	3540
	cttgttccg taggcggccc acacctgcat acattgaact ctccaccgt tgcctgggaag	3600
	ggtggagaag tctttagcct tcttggtgtt ggggaaggcg gcattggact taaggccgtt	3660
	gaacggagcc accatgttgg ccgagcagg ggcggtccgg ctacccgtcg cgaactgaga	3720
	ggagatcgaa gccatgggga tctgcgcatt taacaagaaa ttgaacagtc aattggggat	3780
[0005]	tttcaatc cctaaataaa tttagaagaa attggaatac taacgtcac cacttaaac	3840
	ccatccagc atgaatggtt atcgaaccag atataacca aaggggcaaa attgactcga	3900
	aaacctagtt tctcgatata cggctaggta atgacaatcg cacacagaca aatctggtta	3960
	tacagaactt cgaagcaaga aaaaaacgat gaagaatgga tcatccaata aatcgactag	4020
	actcaatctt cccagggtta tccatccagc aaacttaaaa gacggacctt tattttcaaa	4080
	ctggaatggg acaaaaccgg aaactctatt gtctgaaaa cagatccggg agacagtaac	4140
	agaaaaaaca ttaaaaagta atggaaagac ctaaaacctt gatctaatc caaaccaatc	4200
	atacctgttc ttgccttagg ggtttcgaaa tccataagct tggatccctt agagtccaga	4260
	gsaattgatg tctgtagaag aagaagAACG gttaagagta gatttgggtg agaaagatgt	4320
	gaaattgttt ttataggcaa agacggagag tctatttttt gagcaatcag atcgcataat	4380
	aatcttcaag gctgagatat cgaatccgtg gtacaataaa atgattgata aaccgtcgat	4440
	cigtittaat cgacggttca tattagtgat cggcgtgag gcagtgatg ccactaagaa	4500
	tctctttttg ttatcaatgt ggcgcccaca attagggtaa tgaagcggca atattttgga	4560
	actcggaaaa taaaatgctg ccatcacatt atttgaaaa ttccacatgc ttatatatta	4620
	aaaaaccacg aattacaggt tacaaacgaa aagatattat aataatgta ttatactaa	4680
	tttttgtagt gctttagtga tatgtatcti ggaasaacaa tgacaaatcat atgttagtat	4740
	tatcaagtta tcttatigat attgatattg gaacatacaa tgggtattgc cttctttcga	4800
	ccataaatat caccnaatit acaaaatttg tctataccaa gtatcaatt gtaaatggga	4860
	tgtcaacatt ttaatttccc tttagaagac tatagaccac aagaacacac ttcaatagat	4920
	aaagttaacta tttaataaag aggttttaaa atcacattaa caaaaatnai taccacccgg	4980
	cactcacaaa tacaacagaa gcacacgaca tgtcaaaagg caaagtaaat tcttttagtg	5040

[0006]

giggtttcat tucsaattgtg tcaattgcag cacaaactat ctgtctcagg gaatcatttc	5100
agcatcaaag atcatgtcca ctccagggga acctagtgtc tccatgcctc gactcatatt	5160
tctctcgagc atgcattctg caggggcgcg ccattgcccg gcaagcggcc gcacaagttt	5220
gtacaaaaaa gcaggctccg cggtagctga ctgaaaagct tgtcgaacct cagggtcaacg	5280
gacaggata ttcttggtta agatgtttaa ctctatggag gttagtata acgaatgac	5340
taggaccgga taagttccct tcttcctagc gaacttattc aaagaagtgt ttgigtatca	5400
ttcttggtac atgttatata atgaaaaaat atatttggtc attggactga acacgagtgt	5460
tcaatatgga ccaggcccca aataagatcc attgatatat gaattsaata acaagaataa	5520
atcgagtcac caaacccatt gcttttttta acgagacttg ttaccaactc tgatacaaaa	5580
gtcattatcc taigcaaatc aataatcata caaaaatac caataacact aaaaaattaa	5640
aagaattgga taatttcaca atatgttata cgataaagaa gttaatttcc caagaaatc	5700
actgatttta taagcccact tgcattagat aaattggcaa aaaaaacaaa agggaaaaga	5760
aaataagcac gaagaattct agaaaatac aaatacgttt caatgcagtg ggaccacagg	5820
ttcaattatt gccatttttc agctccaccg tatattttaa aaataaaacg ataatgttaa	5880
aaaaatata atcgtaacga tegttaaatc tcaacggctg gatcttata cgaccgttag	5940
aaatttggtt tgtcagcagg tcagtaataa acgggcgtcaa agtgattgca gccggcacac	6000
acgagtcgtg ttatcaactc caaagcacaa atactttcc tcaacctaaa aataaggcaa	6060
tiagccaaaa acaactttgc ggttaacaa cgcicatat acgtgtcatt ttattattag	6120
ctattgcttc accgcttagc ctctctctg accttgctgt cctctgtttt tctctcttt	6180
ctctctctaa acaataccac aagcttttcc ttacaaatc agatttcaat ttctctctaa	6240
cttaaaaact ttctctcaat tctctctacc gtagtaacg taaattttc tgttctctat	6300
tctctctaaa tctctcaatt tgttttctgt cgaatccaat ttctgtatag ttctttggtt	6360
tgaattctgt taatctttag tgaagacga ttctctggat ttgatcttta gatatactct	6420
taattctcga ttagggttcc aataatata tccgatttgt tcaataatc ttgattttgt	6480
cgaataatca ctctctgatt tgtgttttct atctagatct ggtgttagtt tctagtttgt	6540
ggatctgaat ttgtctatta atctgatttt ttctgtata cagagatctc catggctcag	6600
accactctcc aaatacacc cactgggtcc accttgggtg ccacagtcac tgggttcac	6660
cttgcacac ttgacgtatc tggtttctgt gccctccatg cagcttggct tcaacatgca	6720
ctcttgatct tccctgggca acacctcagc aatgaccaac agattacctt tctctaaatc	6780
ttggagacaa ttgagaggtt tggcggaggt gacattgttg ccataccaa tctcaaggca	6840
gatggcacag tgcgccagca ctctctctgt gattgggagt acatgatgaa ggtcatgtg	6900
ggcaaatagg cctggcacgc cgaatcaacc tacaigccag tcataggctc aggagctgig	6960
ttcagcggag aagtgttccc agcagttggg ggcagaacct gctttgtcta catgagggca	7020
gcctacagtg ccttgatga ggcaacctgt gctctgttcc accaaaggic tctctgtcac	7080
tcccttggtt attctcagag caagttagga catgtccaac aggcgggttc agctacata	7140
ggttatggca tggacaccac tacaactcct ctcaagcatc tggtaaggtt gcatctgag	7200
actggaaagg ccagctctct gatcgccgcg catgcccatt ccattccctg catggatgca	7260
gtcgaatcag agcgtctctt tgaaggactt gttgacggg cctgcccagg tccagagtc	7320
catgtccacc aatgggtctg tggagatgtg gttgtgtgg accacccgtg ttgtctccac	7380
cgtgtcagac cctgggtttt caagttagca cgtgtgagt ggcatccag atctgcagg	7440

[0007]

cgcccagaaa ctgagggtgc tgccttgggt tgagtagtga gcttaatcac ctgaggctgc	7500
gtccaccaga taatttttat taaigtacia aattactgtt ttgtlaaatg caattttgct	7560
ttctcgggat tttaatatca aattctatit agaaatcac atatttttgt tgcaggcttg	7620
ctggagaatc gactcgetat cataaaaaat acaaaaaaat ttattttgco tcaattatit	7680
taggaattgt attaaggacg cttaaatat ttgtcgggtc actacgcata atgttgattg	7740
agaagatcag cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga aatttcataa	7800
gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaaa acagataaa cccagcaca	7860
ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gagtaagat ccggaatttc tgacaggagc	7920
atgcttcaaa ttccagccca atggcagttg aaatactcaa accgcccata atgcaggagc	7980
ggatcattca ttgttttgtt ggltgccttt gccaaatgg gagtccaagg ttgcggccgc	8040
gcgcgagccc agctttcttg tactaagttg ttgcggccgc ttatttanaa ttaattgccc	8100
gggcgtttta ccgcccgcgc ttatttaagg ccggccttgc gcaaacccag aaggtaatta	8160
tccaagatgt agcatcaaga atccaattgt tacgggaaaa actatggag taitatgtaa	8220
gcacagcaag aagcagatca atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aattgaagaa	8280
tgacagata caagatccca tactgcgaga atcgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa	8340
agaagaacca ggccgaagaa agaatcttga agacgtatg actgacgaca acaatgaaaa	8400
gaagaagata aggtcgggtg ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtagaaaa	8460
gttaagggcg aaagtaacct tatcacaaag gaactctat cccactact tatctttta	8520
tattttccg tgcattttt gcccttgggt ttctctat atggaaccaa gtccggcatt	8580
tgtagaaaca agaaaaaatt tgggttaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact	8640
tcagaganaa ttgttaattt gtatgctcc atgtctccg agaggagacc agttgagatt	8700
aggccagcta cagcagctga tatggccgc gtttgtgata tegttaacca ttacattgag	8760
acgtctacag tgaactttag gacagagcca caaacaccac aagagtggtat tgatgatcta	8820
gagaggttgc aagatagata cctttgggtg gtgtctgagg ttgaggtgt tgtggcigt	8880
attgcctacg ctgggccctg gaaggctagg aacgcctacg attggacagt tgagagtact	8940
gtttacgtgt cacataggca tcaaaagttg ggccatggat ccacatttga cacacattg	9000
cttaagtcta tggaggcgca aggttttaag tctgtgtgt ctgttatagg ctttccaaac	9060
gatccatctg ttaggttgca tggagctttg ggatacacag ccgggggtac attgcgcga	9120
gcctgatata agcatgttg atggcatgat gtgtgtttt ggcaaaagga tttagattg	9180
ccagctcttc caaggccagt taggccagtt acccagatct gaggtaacct gactttgagc	9240
ttatgagctt atgagcttag agctcggatc cactagtaac ggccggccagt gtcctggaa	9300
tgcctcttga ctgatatagg gcccgatcg gggcnaatg ctcttttagc ccttccggg	9360
ttgatcttat ctgtgttgaa atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc	9420
ggccaaagga acccaaggtg aggtgggcta tggctctcag ttctttgtgg aagcgtttg	9480
cttaaggtgc agaggtgtta ggggaagaa gcaaaaggt cegattgtta cagataatgt	9540
tgatccatcg taagataatt aaagtatga ttcatcacta atataatcag tgattccaa	9600
taigtactac gatttccaat gcttttaatt tgcgcgtat taatcggcgt cacaaaaa	9660
tcccggttga ctltctttta atccaggatg aataaatag ttattataat ttttgcatt	9720
tggtccgtta taggaattga agtgtcttg ccgtccgac cacicccatt tcataattt	9780
acatgtattt gaaaaatasa aatttaaggt attcaattta aacacgtata ctgttaaga	9840

	atgatatcct gaaagaaata tagtttaaat aittattgat aaaaiaacaa gtcaggiaatt	9900
	atagttccag caaaaacata aattiatatga tgcagattta aaitcagaaa tatttcaata	9960
	actgattata tcagctggta caatgccga gatgaagac tgagtcgat aiatgtgtgt	10020
	aatacatagc ggcgggttt ctatgcaccg gtiaggatcc gtttaaacctc gaggttagcg	10080
	catgcacata gacacacaca tcaictcatt gatgccttgt aataattgic attagattgt	10140
	ttttatgcat agatgcactc gaaitcagcc aaittttagac agtaiccaa cggatgtgac	10200
	ttcagtaaat taaaaacgic cgcattgtgt tattaagtig tciaagcgic aatttg	10256
	<210> 14	
	<211> 859	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 提供部分的 5'大豆基因组侧翼和部分 5'插入序列	
	<400> 14	
	agcttaacat acaaagaaatg taatccacag taagaaaaat gtcagggttc ttattgtgc	60
	tcataaatg ttcttgatt ccgatcaag caagagcatc cagctcaca aatttgictt	120
	ctcaattcsc tcattcaica aaatcagcag ttttatgcat caacagcat ggaagtga	180
	accacccaig attaagcccc atatcgttgt gttagatata ctatcacctg aatttgictt	240
	ataaaaaaca catctgaata cttttataat catacccttc tcggcctttt ggetaagatc	300
	aagtgtagta tctgttctta tcagttaaat atcagataig tgggtcattg gccacataga	360
	tattasallt attttttgaa ggggtggggcc tgacatagta gcttgctact ggggttctt	420
[0008]	aagcgtagcc tgtgtcttgc actactgcat gggccggcgc caccctacga ttcagtgtat	480
	atttatgtgt gataatgca tgggttttita ttgtcttgtt tgttccctct itaggaactt	540
	acatgttaac ggtaaggta tcaatggaggt ccgaatagat tgaattaga aagctcgcaa	600
	ttgaggtcta caggccaatt tcgtctctag ccgtacata ttactcacgc gatcctaac	660
	gggtgatca tgggcgcga ttaaaaatct caattatatt tggctctant tagtttgga	720
	ttgagtaaaa caaatcgaa ccaaaccaaa atataaata atagttttta tatatatgcc	780
	tttaagactt tttatagaat tttctttaaa aaatctctag aaatatttgc gactctctg	840
	gcatgtaata ttctgttaa	859
	<210> 15	
	<211> 1719	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 部分 3' 大豆基因组侧翼和部分 3'插入序列	
	<400> 15	
	gcacatagac acacacatca tctcattgat gcttggtaat aattgtcatt agattgtttt	60
	tatgcataga tgcactcgaa atcagccaat tttagacaag tatcaaacgg atgtgacttc	120
	agtacattta aaacttcgcg aatgtgttat tangtgtct aagcgtcaat tgaattaca	180
	atigaatata tcttgcccca gccagccaac agctcgattt acagagaacg aatgtcgtgt	240
	gatatgtgga acaaggcaac gacaacaca tacaatgaa tcacaaatga gtcggggtcg	300
	ccagtttgtt atgtaatcca tggcatggac atggggcccg atcgaaaag aaaaaagaaa	360
	tgcatttata tgtgtgaaa tgaagatttt ttttatecaa ataataaaa aaaaattatt	420
	atttaccaca aaaattattt aatgaccga tacgtacact ttttctta gtttaagaaac	480

	accgatttct taatlacatt tttttataca tttagaattt ggtttccttg gaaccgattt	540
	caaaaagttc attttttttt tcaaaaacca gtttagaattt cggttcccttg gaaaacgaet	600
	tcttaattgc tttttttttt gttttgtttt aaaaattgtt gtatttttat ttttttgtt	660
	ataaattgic tatarftgtg ttctgtttta attagaatac atattatttt tctatgttg	720
	ttaatcttta atttcttaag catattttat gttttatcat tttttaagag ttgaattcet	780
	ttgtattttt attttatttg atttttttta tacaatatta acaaacactt taattgaaat	840
	taaaaaatat atattttaac gacaagttag cttagaactaa aatattttaa ttacaaaata	900
	gatattgaat tacaacaact agaacaaaat atttaaatit gaaataatc acaaaaatt	960
	ttaaaatata ascaataagg catataatta atgtttgttg cctgagccta cacaaigggg	1020
	ggaaatgcac acatggaaca tcattttctt ttaccctgatt cttagaatac cattttggg	1080
	tgtatagcag aggagacatg acaaccctta gaatttcttt tcattttttg gtgggggcaa	1140
	attcttggct tgtgacatgg tgaccaacat gcttcatgac acaatttccc aagtaacat	1200
	ttgtacatgt taagatacti ttccagcgta tacaacaagt gtaatgtgtt cctatctca	1260
	tggtagcact gcttatatac acaacaatga gaacaaaaca tggcattttt ttgaatttg	1320
	tcacagctac actaccttcc atctagcttg accatgaant ttctcacatg ttgaatctct	1380
	ctctccagtt aattgtctcc tagactaaga atgttatgtc gcatiaatcg aactcaaga	1440
	caatgtgaga gtttgccttt ttctgtatgt ctctcatagc ctgttttaac acttttgtat	1500
	aaacttcaac aaatgttaac actcttgcga ctctctctcc cttttgttg acaatgcac	1560
	tacacctagt ataggttgat tttaaccaac cacattgcca gtttttgtgt ttctttgagt	1620
[0009]	accsaattta ttaactcagt gtcccccacg ccagccacca tcccatgcga gagtccactt	1680
	ttcttgtgga atcttcccta gctaatiaat tgtttagta	1719
<210> 16		
<211> 98		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 98 碱基对序列跨越 5' 整合交接 (A 98 base pair sequence spanning the 5' integration junction)		
<400> 16		
	ttgttttgtt tttttctctt tttaggaattt acatgtaac gataaggcca tcatggaggt	60
	ccgaatagtt tgaatttaga aagctcgcaa ttagggtc	98
<210> 17		
<211> 131		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 131 碱基对序列跨越 3' 整合交接		
<400> 17		
	aaactgcgcg aattgtttat taattgtctt aagcttcaat ttgaattaca attgaatata	60
	tcttgcacca gccagccaac agctcgattt acagagaacg aaigtctgtt gatagtgga	120
	acaaggcaac g	131
<210> 18		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		

	<223> 引物 4406_5'F	
	<400> 18 ttgttcttgt tgtttctctt ttagga	26
	<210> 19 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物 4406_5'R	
	<400> 19 gacctcatt gctgcttctc taat	24
	<210> 20 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 探针 4406_5'P	
	<400> 20 catggaggtc cgaatag	17
	<210> 21 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物 4406_3'F	
[0010]	<400> 21 aaacgtccgc aatgtgttat taag	24
	<210> 22 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物 4406_3'R	
	<400> 22 cgttgccttg itccacatat ca	22
	<210> 23 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 探针 4406_3'P	
	<400> 23 acagggaacg aatgtc	16
	<210> 24 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物 GMS116F	
	<400> 24 gtastatggg ctccagaggaa tgg	24
	<210> 25 <211> 23	

[0011]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 GMS116R	
	<400> 25	
	atggagagaga acatgggaat tgc	23
	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 探针 GMS116 探针	
	<400> 26	
	ccatggcccg gtaccatctg gtc	23
	<210> 27	
	<211> 13659	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 事件 pDAR8264.44.06.1	
	<400> 27	
	ccgctgaaga agaicaagtg tgggaaccaa agtgaataa atgttttaga gccaacacag	60
	tggacaattt tgatttcagg ttaattgggtg taftaanaat atcagaaaac ttccaatat	120
	ctcgagcagg cagttgggtt gcctaatcca tcacttgaic tcaaagaatc ttgtgtcaa	180
	gcttcgtga gtacggaac ctaccgtgtg ggctctagc tttaggttgc cattgaagat	240
	cttgacaaga cataigacct atgatagcaa ttcaacaatg gticatatca gcctgattgc	300
	agacttagct gctagcattt cactgtgtga atgcaaggagg aaaaatacat agaaaaagag	360
	ggacaaaaat gttaacctt ccatagtac aggttttagc ctcaatttta ccatigatt	420
	gattttattt tgaaaagtaa tcaattatca gaaccagagt ttgttaattca gcttgatcg	480
	taaccaataa taacttagtc aaatttgtgt atataagaa tttaaatgtg agtctctttt	540
	atttaattag tttaataat ttgaatacaa ttggcaaatg ggcaattcaa ctataattag	600
	tgaattgatt tagttgactg ttatgaagaa tttaatttaa gtttagtaata gttagtgat	660
	gtttgtgaa tttaatttaa gttgtgtgaa agttattgat ctacttgat ccatagttg	720
	gtctgtggga ttgacttga aacggatcat atgttttgtt ttgtgactg aattgtgca	780
	atgttaacac tggacttttt caaactatt gtataaatcc agtatatctc acgtgaatct	840
	gaatttagta gcaagcttaa catataagaa tcatattatc taatcagttt ccatatttat	900
	gaatttagta cgttgaaaa ttgtgcaagc tttaatttaa agtaatttaa tccacagtae	960
	gaatttagtg caggttttta ttgtgtctcc ataatgttt ctgtattccg atcaaaagca	1020
	gagcatccag tctcaaat ttgtttcttc aattcaatca ttcatcaaaa tcaagcagtt	1080
	taigcatcaa caagcatgga atgttgaacc acccatgatt aagcccaata tctgttgtgt	1140
	gagatactaa tcaactgaag ttgtcttata aaaaacacat ctgaatactt ttataatcat	1200
	acctttctcg gccctttggc taagatcaag tgaagtatct gtcttatca gtttaaatc	1260
	tgaattgagg gtcattggcc cacatgatat taattttatt ttftgaaggg tggggcctga	1320
	catagtagct tctactggg ggtttttaag cgtagcctgt gtattgcact actgcattgg	1380
	cctggcgca cctacagatc agtgtatat tatgttgtat aatgtcatgg gtftttattg	1440
	ttctgtgtgt tctctcttta ggaacttaca tgtaaaccgt aaggcatca tggaggctcg	1500

[0012]

aatagittga aattagaaag ctgcgaattg aggtctacag gccaaattcg ctcttagccg	1560
tacaatatta ctacccggat cetaaccggt gigaicatgg gcccgattta aaaaatctaa	1620
ttatatttgg tctaatttag ttgggtattg agtaaaacaa attcgaacca aaccaaaata	1680
taaatatata gtltttatat atatgccctt aagacttttt atagaatttt ctttaaaaaa	1740
ttcttagaaa taattcgac tcttctggca tgtaaatatt cgttaaatat gaagtgtccc	1800
attttattta actttaaata attggttgta cgaatcattt cttatcangi gttactaaaa	1860
tgggtcaate tctttgttct tccatattca tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata	1920
tctttttcga atttgaagtg aaatttcgat aatttaaaat taatatagaac atatcatiat	1980
ttaggatata tatigatttt tatactaaat tactaaattt ggtaactttt gaagtgtag	2040
atcaacgana aattngicaa acgactaaaa taataaata tcatgtgtta ttaagaaaaa	2100
tctctataa gaatatatta atagatcata tgtttgtaaa aaaaattaat tttactaac	2160
acatatattt acttatcaaa aatttgacaa agtaagatta aaataatatt catctaacaa	2220
aaaaaaaacc agaaaatgtt gaaaaccggg caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt	2280
tggtttgggt tgattttgat ataaaccgaa ccaactcggt ccaattgcac cctaatcat	2340
aatagcttta atatticaag atattattaa gttaacgttg tcaatctctt ggaaattttg	2400
caaatgaat caagcctata tggctgtaat atgaatttaa aagcagctcg atgtgggtgt	2460
aatatglaat ttacttgatt ctaaaaaaat atcccaagta ttaataattt ctgctaggaa	2520
gaaggtagc tacgatttac agcaaaagca gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc	2580
tgaastata cgaaggasca aatattttta aaaaaatag caatgacttg gaacaaaaga	2640
aagtgatata tttttgttc ttaaacnagc atccctctta aagatggca gttttccttt	2700
gcaigttaact attatgtccc ctctgttaca aaaattttgg actactattg ggaacttctt	2760
ctgaaaatag tggccaccgc ttaattaaag cgcgcgcagc aaigccccc atcaaatctg	2820
agggacgtta aagcgaatgt aaattggaa cagaatatag aatctttgtt ctgctctagc	2880
ttttctctg tcatittttt acgattagac tatgatttc attcaatnac caaatctctg	2940
angttgtca tcaagtgtct caatcaact tgtaccgttt tgttcgggt ttatatcagc	3000
tcactgttac actttaacca aantcgggtt atgtcttaat aaagggaattg agtcgggtta	3060
actcataacc gtaccaatgc gacgtctgtt ccgcgtttca gtactttgc tcaattgtctt	3120
ctacgggaac ttcccggaac ataggaaacc ccttttctt atccataacc atcgtgaat	3180
caggaaataa atgttcgaag atttgaggtc aaaagtcaaa ttcatgttg tctcttctat	3240
ttagatacna aattgaagca attttacca atttaattgc aaattttaaa acaacgtga	3300
taagtgaaa ctigatttga ttatatattt aaccgaaact gctgaagcaa gaagaaaaag	3360
cgtaatitaa caatacaaga acgtaccgc aaactactaa acgcaaaacc caatacaaaa	3420
gtaaaacgca gacgtttaag tgagaaacc agaaacaca aacgcggatc ggggatcca	3480
ctagttctag agcttaattc ttgacgaag tgcctagca atcgaagtag tgggggaag	3540
tcttcgggtt gcaccaggg tcccggttg tgacggggac ctgggcacag ggggcaagg	3600
agaaagccat cgcatactg tggctgtctt acgtgtcat cgcctacag ttacgttct	3660
ccggcgccgt gatgatcag tagtcggcc cttctcaac agatgtctcc agcttggtta	3720
gtctgtctg gatcgaaac atctctctg tctctttac tctcaggaa gccacgtctc	3780
tgatgcctg cgggccatcg gcaagaggg caacacacg aagagtcatt gcacatcag	3840
gcacttgtt catgttaca tcaatgcct tgaagggttt cctcccaaat ggcctcccg	3900

[0013]

```

gtgggcccag aacagttacg ctatgtctcgg tccaigtaac cttegcctccc atcatctcca 3960
gtaccctcagc aaacttcaca tcaacctgca aactggiggt gccacaaact tccacagtca 4020
cagtcacctc agtaattgca gcaccagcca agaaatagct igcgtctgag gcctacacct 4080
caacataggc aiiitluggg gactlgiatt iligacctcc cttaatgiag aalcigctcc 4140
agctatcaga atgtcttget ttcacacca aaegctccat caatctcaat gtcatttcca 4200
cgtacggaaat ggagattant ttaicaatga ttaacatctc cacaacctca agagccaaag 4260
gagcagccat cagcaggcca ctcaagtact gactgtctgat ggagccagac agcttgacct 4320
tgccaccagg tagccctccg aatccatga cagcaacagg tgggcagica gggccaagga 4380
aacaatcaac atctgcacca agctgctcca atccgacaac caagtcgcca atgggtctct 4440
ccctcatctt tggtactcca tcaagcagct aagttgcatl tccaccagca gcagtaacag 4500
ctgtcttcaa ggaaccgatt gcatctccag catctcccaa gaagagctgc actctctct 4560
tagcatcttc aactgggaac ttccaccac agccsacaac tacagctctt ttggcagctt 4620
tgctcgtctc gacagagaga ccaagagtc tcaaggcccc gagcaigtat tggacatctt 4680
cactgttcag caggtaata accactgtt tccctcggg caggcgctcg agtaggagga 4740
tccggttggc aagcagctg gaccccgcca gcttgacgtt gccggagatc tcttgatgg 4800
gcgcagagac gctctctctg gcgcgggcca tgcacggat ccttccgccc ttgtgacgt 4860
tgccgaggct tcgtgaggag cggcgggcca cggggaggct ggcggtggac ttgagcccc 4920
ggaaaggagc gacggcggtg gccgacgagg ccaatcatca ggtggggccc atagacagcg 4980
ggcgagggta cgacagctc tgaactctt igtgcctga ggccggccac accigcatal 5040
atfgaaactt tccaccgtt claggaaagg tggagaagtc gttagcttc ttggtggttg 5100
ggaaaggcgc gttgacata agcccggtga accgagccac catgttgccc tgaacagggg 5160
cggtcgggtt aacgtctcgg actgaggagg agatcgaagc caiggggalt tgcgcatita 5220
acaagaaatl gacagctca ilggggall tcaatacca taacaaatl tgaagaaat 5280
tggaaacta aacgtacca cttaaaaccc taatccagat gaatcgttat cgaaccagat 5340
ataacaaaaa ggggcataat tgactcgaaa accctagttc tggatcacg gctaggtaat 5400
gacaatcgca cacagacaaa tctgttata cagaacttcc aagcaagaaa aaaaagaa 5460
agaatggatc aicraataa tgcactagc tcnatcttc cagtttate gatccagcaa 5520
actaaaaga cggacctita tticaaact ggaatgggac aaaaaccgaa actctatgt 5580
cgtaaaatca gatcgggag acagtaacag aaaaacatt aaaaagtaat ggaagacct 5640
aaaccttga tctaattaca aacaaatcat acctgttctt cggctgaggg gticgaaatc 5700
gataagcttg gatctctag agtcagagaa aattgatgtc tgtagaagaa gaagacgggt 5760
taagagtaga ttgggtgag aaagatgtga aattgtttt ataggcaag accgagagtc 5820
tattttttga gcaatcagat cgcataata atctaaccgc tgaatctcg atcgtgtgt 5880
acaataaant gaigataaaa ccgicgact gltttaacg accgtcata ttatgatcc 5940
gcgtgatgga agtgatagcc actaagaatc gtcttttgtt ttacatgtgg cggcacaat 6000
tagggtaatg aagcgcaat atttggac tggaaataa aattlccgc atcacttat 6060
ttgaaatatt tcaatgctt ttatittaaa aacctcagaa ttacagtia caaccgaaa 6120
agattataa tatagtgatt tatactaaat ttgiatgagc ttatgata ttatcagg 6180
aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagtatc gtattgatat tgatattgga 6240
acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca ccaatattac aaattttgtg 6300

```

[0014]	tataccaagt tatcaattgt aaatgggagt tcaacatttt aatticccit igagaaacia	6360
	tagaccacaa gaacacacit casitagata agtaaciatl lacataagag gttttaaaa	6420
	cacatttaaa aaaaataata ccaaccggca ctacaaaata caaacagagc acacgacatg	6480
	tcaaagccac aagtaaatlc gttgagtggt ggittcaata caattgtgic acitgcagca	6540
	caaacatctc tgcctcggga atcatctcag caataaagat catgctcact tcaggggaac	6600
	ttagtgtaic catgctcaga ctcatatitc tccctgacat gcaicctgca ggggcgcgcc	6660
	atgccggggc aagcggccgc acaagittgt acaaaaaagc aggcctccgc gtagctgact	6720
	gaaaagcttg tcgacctgca ggtcaacgga tcaggatatt ctgttttaag atgttgaact	6780
	ctatggaggt ttgtatgaac tgatgaicta gaaccggata agtcccttic tcatagcga	6840
	acttattcaa agaattgttt gtgtatcatt ctgtttacat tgttttaaat gaaaaataat	6900
	tattgttcac tggactgaac acgagtgtta aataatgacc agccccaaa taagatccat	6960
	tgataiatga afaaataaac aagaataaat cgagtcaaaa aaccacttgc cttttttaac	7020
	gagacttgil caccaacttg atacaaaagi cttaaccta tgcataaana taatcataca	7080
	aaaataacca afaacactaa aaaaataaaa gaaatggata atttcacat atgtttatcg	7140
	ataaagaagt tacttttcca agaaattcac tgattttata agccacttgc catlagataa	7200
	atggcaaaaa aaacaaaaa ggaaaagaaa taaagcaga ayaattctag aaataacgaa	7260
	atagccttca atgcagtggg acccaccgtt caatttatgc caattttcag ctccaccgta	7320
	taittaaaaa ataaaacgat aatgctaaaa aaaiataaat cgtaacgaic gtaaatctc	7380
	aacggctgga tcttatgacg accgttagaa atgttggtg tcgacgagtc agtaataaac	7440
	ggcgtcaaa ggtttgcagc cggcacacac gagtcgtgtt tatcaactca aagcacaaa	7500
	acttttcctc aacctaaaaa taaggcaatt agccaaaaac aacittgcgt gtaaacaaag	7560
	ctcaatacac gttcatitlt attattagct atgtctcac cgccttagct ttctctgac	7620
	ctagtcttcc tegtcttttc ttctctctct tctataaaac aatacccaaa gcttctctct	7680
	cacaaicag attcaattt ctcaaatct taaaacatt ctctaatc tctctacgt	7740
	gaicaaggta aatttcigtg ttcttatitc tctcaaatc ttgatittg ttctcttgc	7800
	atcccaattt cgtatattgt ctttgggtta gattctgita atcttagatc gaagacgatt	7860
	ttctgggttt gatctttaga tatcatctta attctcgatt agggtttcat aaatactatc	7920
	cgatttglic aataaattg agttttgtc aataattact ctctgattg tgatttctat	7980
	ctagalcigg tgltagttic tagttgtgc gacgaattt gtcgattat ctgagtttt	8040
	ctgattaaca gtagcttcca tggctcagac cactctccaa atcacacca ctggtgccac	8100
	cttgggtgcc acagtcactg gtgttcacct tgcacacct gacgatgctg gttctgctg	8160
	cctccatgca gccctgctc aacatgcact ctgtacttc cctgggcaac aacctagcaa	8220
	tgaaccaag attaccttgc cttaaacgtt tggagcaatt gagaaggatt ggggaaggta	8280
	cattgttgc atatccaatg tcaaggcaga tggcacagt cgcacgacct ctctctgta	8340
	gtgggatgac atgaagaagg tcatttggg caacatggcc tggcacgccc actuaacct	8400
	catgccagtc atggctcaag gactgtgtt cagcgcagaa gtgtccag cagtggggg	8460
	cagaacctgc ttgtctgaca tgaaggcagc ctacgatgcc ctgtatagg caaccctgac	8520
	tttgtttcac caaaggctc ctctctactc cctgtgtat tctcagaca agttgggaca	8580
	tgtccaaacg gccgggtcag cctacatagg ttatggcatg gacaccctg caactctct	8640
	cagaccattg gtcaaggctc atctgagac tgaaggccc agcctctga tgggcgcca	8700

[0015]

tgcccatgcc atccctggca tggatgcagc tgaatcagag cacttccitg aaggacttgi	8760
tgaatgggac tgccaggctc ccagagacca tgcacacca tggactgcig gagafiggt	8820
tgtgtgggac aaccctgtgt tgcaccaccg tgcagagccc tgggatttca agtggccacg	8880
tgtgtgtgg cactccagac tgcctggacg cccagaaact gaggggtctg ccttggtttg	8940
agtagliagc ttaacaccci agagctcggg caccagcata atttttatla aigiaciaaa	9000
tiactgtttt gttaaatgca attttgcitt ctccggatll taatatcaaa atctatttag	9060
aaatacacha tattttgttg caggetitgt ggagaatcga tctgtatca taaaaattac	9120
aaaaaatatt tatttgcctc aattatttla ggattggat taaggacgct taaattattt	9180
gtcgggicac tacgcacatc tgtgatlgag aagatcagcg atacgaata ttcttagtac	9240
tatcgatant ttatttggaa attcataaga aaagcaaacg tlacatgaat tgatgaaca	9300
atacaaagac agataaagcc acgcacatit aggaatitgg ccgagatfac tgaattatga	9360
gttagatcac ggaatttctg acaggagcat gtcttcaatt cagcccaaat ggcatitga	9420
atactcaaac cgccecatat gcaggagcgg atcatitcatt gtttgtitgg ttgcctttgc	9480
caacatggga gtccaaggtt gggcccgccg gcgacccag ctttcttgta caaagtgtt	9540
gcggccgctt aattaaattt aaatgcccg gcgtttaaac gcggccgctt aattaagcc	9600
ggcctgcagc aaaccacgna ggtaattatc caagatgtag catcaagaat ccaatgttla	9660
cgggaaaaac tatggsagta ttaigtatgc tcapcaagaa gcagatcaat atcggraca	9720
tatgncacct atgttcaaaa atgaagaatg tacagataca agatccata ctgcngaai	9780
acgaagaaga atagttagaa atgaaaag aagaccagg cgaagaaaag atcttgaag	9840
acgtatgcac tgacgacaac aatgaanaa agaagataag gtccgtgatt gtanaagaa	9900
catagaggac acatgtatga tggaaaatgt aaggccgga atgaacctta tcacaaagga	9960
atcttatecc ccactacita tcttttata tttttccgtg tcatttitgc cctttagttt	10020
tctatataa ggaaccaagt tggccatttg tgaatacaag aaaaaattg gtgtatgcta	10080
ttttcttga agtactgagg atacaacttc agagaatit glaagttgt agatctcat	10140
gtctccggag aggagaccag ttgagatlag gccagrtaca gcagctgata tggcccggt	10200
ttgtatate gttaaccatt acatigagac gtctacagtg aactttagga cagagccaca	10260
aaacaccaca gattggatlg atgactaga gaggttgca galagatcc ctgggtgtg	10320
tgtttaggtt gaggtgttg tggctegiat tctttacgtt gggccctgga aggttagga	10380
cgtttacgtt tggacgttg agagtactgt ttacgttga cataggcatc aaaggittgg	10440
cttaggatcc acatigtaca cacttttgtt taagtctatg gaggcgaag gtitttagtc	10500
tgtgttgtgt gtataggec ttccaacga tccatctgtt aggttgcatg aggttttggg	10560
atacacagcc cggggiaat tgcgcagc tggatcaag catggtgat ggcatgtgt	10620
tgttttttgg caaagggtt ttgagtggc agctcttcca aggccagtta ggccagttac	10680
ccagatctga ggtaccciga gcttagctt atgagctat gagcttagag ctggatcca	10740
ciagtacggc ccgccaggtt gctggaaatc gcccttgaat agataggcgc ccagatggc	10800
ggcaatagct tcttagcgcc atccgggtt gatctatct gigtgaat agttgcgtg	10860
ggcaaggctc tcttcagaa agacaggcgg ccaaaggaa ccaaggtag gttggctatg	10920
gtctcagtt ccttgtgaa gcgttggc taaggigcag aggtgttagc ggatgaagc	10980
aaaagtctc gattgtaca agatatgttg atctacgta aggatattaa agtatgtatt	11040
catacaciaa ataacagtg tatccaata tgiactcga ttccaatgt ctttatgtc	11100

[0016]

```

gccgtatgia atcgcgctca caaantaatc cccggtagct ttcttttaac ccaggatgaa 11160
ataataigtt attataattt ttgcgatttg gtcggttata ggaatigaag tgtccttgcg 11220
gtcgccacca ctcccatlto ataattttac atgtatttga aaataaaaaa ttataggtat 11280
tcaattlaaa cactataact tgaagaat gatatttga aagaatata gttaaatat 11340
ttatgatua aatacaagt caggiaattt agtccaaga aaacataaa ttatitgaig 11400
caagtllaas ttcaaaaata ttcaataac tgattatstc agctggtaaa ttgccgtaga 11460
tgaagactg agtgcgtat tatggigtua taratagegg cccggtttct agtcaccgtt 11520
taggataccg ttaaacitga ggctgcgca tgcacataga cacacacatc atcatttga 11580
tgccttgtaa taattgtcat tagattgitt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 11640
ttatagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaacgtccg caatgigita 11700
tlaagttgic taaggtcnaa ttgatattac aatigaatat atcttcccc agccagccaa 11760
cagctcgatt tacaggaac gaaigtctgt tgatastggt aacaaggcaa cgacaacaac 11820
atacatgaat ctcaaatag agtcggggic gccgagttgt gatgtaatcc atggcatgaa 11880
cattggggcc gatcgaataa gaaaaaagaa atgcatglat atgigtgaaa atgagagitt 11940
tttttatcca antaiaaaaa aaaaattaat tattaccca aaataattat tacatgaccg 12000
atacgtacac ttttttccct agttaagaaa caccgatttc ttaattacat tttttatac 12060
attagaaat tggtttccct ggaaccgatt tcaaaaagtt catitttttt ttcaaaacca 12120
agttaagaaa tccgttccct ggaatacgaac ttcttaattg cttttttttt tgtttgttt 12180
tanaattggt tgiattttia tttttttgtt taattaatgt ctatatttgt gttctgttta 12240
aatigaaaac aatattattt ttcatatggt gtaattctt aatttcttat gcataattta 12300
tgttttatac ttttttsaga gttagaatcc ttgtatttt tatttttttt gattattata 12360
atacataat aaacaacac tttaattgaa ttaaaaata tatatttaac tgacaagttg 12420
acttgaaata aaatatttaa attacaaat agataagaa ttacaacaa tagaacaaa 12480
tatttaaat tgaataata caacaaaaat tttaaatac aaacaaatg gcataaatt 12540
aatgtgtgt gccagagctt acacaatggg ggaatgcga cacatggaac atcattttgg 12600
ttacctgat tcttgataat ccattttgtt ggtatacga gaggagacat gacaccttt 12660
agaattctt ttcaattttg ggttggggca aattcttggc ttgtscatg gtgacnaaa 12720
tgcctcatg cacatttcc caagtaata ttgtataig ttatagatc tttcagcgt 12780
atacacaga tgtatgiagt tctttatct atggtagca tgcattataa caacaacatg 12840
agaacaaaac atgtgcattt ttgaaattt gtcacagta cactacctt catctagctt 12900
gacctgaas ttctcacta gttagatct tctctccagt taattgtct ctgactaag 12960
aatgtiatgt cgcattaat gaactcaaga acaatgtag agtttgcctt ttctgtatg 13020
tctttcatg ccttgtttta tacttttga taacttcc caaatgtaat cactcttgcg 13080
acttctctc cctttgttt gaacatgca ttacactag tataggtga tttaacaa 13140
acacatgcc agatttttgg ttcttttgg taacaaata attaacacag tgcacctc 13200
gccagccacc atccatgag agagtccact ttcttttgg aatcttccca agciaattaa 13260
ttgttagtic agcttggcc taaaacacac atgacaaata ttatattat aaucacaa 13320
cccagtaata caacatgaa caacacacat gacaactaca aatcattaaa taataaatt 13380
acaatcaaat aatttgggga ggggtcttc aaacttgat tcaaggtaaa ttgtatcct 13440
gaggtattca ccaaacctct ccaaatcaa agagcttga gaaactggg gtgtttgtgc 13500

```

```

atagtttat ggggtgtgt ctacgggtgat aacataaac tcaaggcatg tgaagtigaa 13560
gagtttccca aatatagaaa acataglaat tatteccica tcaicttgea gcatadagtc 13620
ctgtactga aaacaatcac caacaaatga tacgggaca 13659

```

<210> 28
 <211> 14619
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 事件 9582.812.9.1 的假定序列, 含有 5' 基因组侧翼, 9582 T-链插入, 3' 基因组侧翼
 (Hypothetical sequence of Event 9582.812.9.1 containing 5' genomic flank, 9582 T-strand insert, 3' genomic flank)

```

<400> 28
ttaattataa tgacttiatt ataaaaigaa caatttcaaa aitttcacac tccaatttla 60
gattcccttt atatcatfct ctatlgagta aaccacatt tccattctta aaaaigtgag 120
gcctgcataa aaagcatgaa aaaggcaaaa acaiccccaa anttaccatt tatcagtcca 180
gttaacaaat cgttaaggatc ttatgtgttc taataacata tgaatagggtg accgtttag 240
tgttatgcaa tgtactgtt gatctgtcat gttgcagaca cgtcagcata aaacaaata 300
aaacttttaa agtacaaat gataataaa tttattttat ttatttctc tgcacacca 360
agatgacagt gaagaaaata aitttttgag accgataat ctacataca ctatlgactt 420
cagattataa agtacgttc aaataigaaa tttaagctt attctagac aaaaactgaa 480
aatlacaaaa atttccctca tgcatacaac taatlgaaat ctatlttlaa gacaaaatcc 540
aatlgaaaaa attataaaag ctatatttla aacttagaaa attactataa tattigaatt 600
[0017] ttttcttaca actatctaga ttttlttla aaattatcaa aataccctga gccitttgat 660
caagagtatt attgtcttla gttatgttcg aaaaatttat caattgacag tataagtta 720
gtactatttt tgaattaaa ttatatttt tttaaggatt aattattata cttttataac 780
ttaatccttt ttattatana atgacaatt ttanaactt ctactccaa ttifatactc 840
actttatatt cttaataata tgttgtatga gcagaactaa actgaatttc cttaaaaaga 900
aagtcctgat attgttatga gtcctgtgaa taaaagaatt gatigagga ttccactaaa 960
tcctgcactt gactttttat catgtctat tttgtttca gaaatcaaat cagtatttat 1020
acttttttat ctgtccattg ttcaatttcg agcgtctcga tatattatgc gcctaaattg 1080
gacatccgag ttaaaagtta tgaacttcg aatttccga caaccagtc gcatcaccac 1140
accaaaagtt aggccgaat agtttgaat tagaagctc gcaattgagg tctacaggcc 1200
aaattcgtc ttggccgtac aaatttacc accgattcct aaccgggtg atcatgggce 1260
ggattaaaa aactcaattt tatitgtctt aatttagttt gttattgagt aaacaaatt 1320
cgccgccatg cccgggcaag cggccgcaca agttgttaca aaaaagcagg ctccgggtg 1380
acigactgaa aagctgttc accgtcaggt caacggatca ggatactctt gtttagatg 1440
ttgaactcta tggaggtttg tatgaactga tgatctagga ccgataagt tccctcttc 1500
atagcaactt tatcaaaaga agttttgtg taatattctt gttacattgt tatlaatgaa 1560
aaaaatttat tggatattg actgaacac agttttaaat atggaccagg ccccaataa 1620
gatccattga tataatgaat aaatacaag aataatcga gtcaccaaac cacttgcctt 1680
tttaacgag actgtttcac caactgata caaaagtcat tatcctatgc aaatcaata 1740
tcatacaaaa atatccaaa acactaaaa attaaagaa atggataatt tcaataatg 1800

```

	ttatagata agaaattac ttitccaaga aattcaciga ttttataage ccacttgcac	1860
	tagataaatg gcaaaaaaaa acaaaaagga aagaaaataa agcacgaaga attciagaaa	1920
	atagaaaata cgttcacatg cagtgggacc cacggttcaa ttatigccaa ttitcagctc	1980
	caccgtatat ttaaaaaata aaacgatat gctaaaaaa tataaatcgt aacgaicgti	2040
	aaatctcaac ggttggaatc tatgacgacc gtlagaattt ggggtgtcg acgagtcagt	2100
	aataaacggc gtcnaagtg ttgcagccgg cacacacgag tcgtgttat caactcaang	2160
	cacaaatact tticctcac ctaaaaataa ggcaattage caaaaaaac ttigcgtgta	2220
	aaacacgctc aaacacgctc tcaatttati attagctatt gcttcacgcg cttagcttct	2280
	tcgtgacctc gtcgtccctg tcttttctc ttcttctctc aiaaaaaaat acccaaacgt	2340
	tcctcttcac aattcagatt tcaatttctc aaatctttaa aaacttctc tcaattctct	2400
	ctaccgtagt caaggtaaat ttctgtgttc ctattctctc caaaatcttc gatttfgiti	2460
	tcgttcgac ccaatttcgt aiaatgtctt tgggttagat tcgtttaa tcgttcgaa	2520
	gcagatttct tgggttagat cgttagatat caatcttatt ctgcattagg gtttcataaa	2580
	tatcaccgta ttgttcaaa taatttgagt ttgttcgaat aattactctt cgatttctga	2640
	ttctatctca gctcgggtg tagttcttag ttgttcgagt cgaatttctc gatttctctg	2700
	agttttctc attacacag atctcatgg agacaaatat ccagaaacag tctgtcccat	2760
	acaattgctt caacaatctt gaattgaga tctcaacga agagaggagc acgtgacgct	2820
	ttcccttga catctccctc tccctcaca ggtctctt ttctgagttt gttctggtg	2880
	tgggtgtgct ctttggctc tttagacctc tctggggtt catcacccca tctgattgga	2940
	gcctctctt tctccagatt gaacaatga ttgacacag gattagagcc ctfgaaagga	3000
[0018]	acagagccat caccacacit cgtggcttgc ctgacagcta tgaattctac attgaagcnc	3060
	tcgtgagtg ggaagccat cccacaaag ctcaactcgc tgaagaatg aggatctct	3120
	ttgccaaac agatgacgt ttgacacag ccaacaaaa ttacacctc accagcttg	3180
	agatccctt gctctcagtc tatgttaag ctgcaaacct ccaattgagc ttgcttaggg	3240
	atgtgtgtc ctctggacaa ggttggggac ttgacatagc cactgtcaac aatcactaca	3300
	acagactctt caacttgat catctctaca ccaaacattg ctggacacc tacaatcag	3360
	gatttgagaa cctcagagcc accaacctc gccaatgggc aaggctaac cagtttagaa	3420
	gggattcac acacactgt ctgacatag ttgtctctt ccccaactat gatgttcga	3480
	ctacccaat tcaaacagc tcccaacta caagggaat ctacacctc taagtcatg	3540
	aggacagccc agttctgct aacataacca atggtttcaa cctgtctgag ttgtgtgta	3600
	gaccacccca tctcatggac ttcatgaat cctgtttgt gactccgag acgttaggt	3660
	cccaactgt gttgggagac cacttgta gctccgcaa caaccgtgc aaccgcatca	3720
	acttccctc ctatggggt ttcaatctg gttgagcat ctgatttga gatgaggacc	3780
	caaggctt ctacagaacc ttgcagatc ctgtttgt cagaggagc ttggcaatc	3840
	cacactatgt tcttggttg agggagtg ctcttcagca gactggcacc aatcacacc	3900
	gcacattcag aaacagcggc accattgaca gctttagta gatccact caagacaa	3960
	gggagcacc ctggaacgac tactccatg tctcttca tctcactt gtcgtctgc	4020
	ctggtagat cagcggtta gattcttga gacacaaat gtctcatgg acccaicgt	4080
	ctgccacacc caaaaacacc attgatccag agagaatcac ccagattccc ttggtaagg	4140
	caacacact tcatcttga accacattg tcaaggggc tgggttact ggtgagaca	4200

[0019]

```

ttctcagacg caccctctgga ggcccatctt cttaacacat tctcaacatc aaigggcaac 4260
ttccccagcg ttaccctggc agaatecgc tgcctecac cactaacctt agaattcaltg 4320
tcacagttgc tgggtgaagg atctttgtct gtctgttcaa cagacaaatg gacacitggg 4380
aiccattgae attccagica ttctctatg ccaccatcaa cactgcattc accttccaa 4440
tgagccagtc cagtttcaca gtgggtgcag ataccticag ctccggcaat gagggttaca 4500
ttgaccgctt tgagttgatt ccagtgacgt ccacattga ggctgagctt gacttggagc 4560
gtcttcagaa ggccctgaat gctctcttca cctcttcaaa tcagattggg ctcaagacag 4620
atgtagctga ctaccatata gaccgtgttt ccaatctgt tggagtcctc tctgattggt 4680
tctgtcttga tgagaagaaa gattgttcag agaagggtcaa gcacgccaag aggtctcttg 4740
atgagaggaa ctgtcttcaa gatcccaact tcagagggat caaccgtcaa ttggaatgtg 4800
gatggagggg atcaactgac ataacattc aaggagggtg cgtatgttgc aaggagaact 4860
atgtcacact ctgtgggacc ttgattgagt gctacccaac atacctttac cagsagatag 4920
acgaagcaa gctcaaggcc tacaacgat accagttgag aggttacctt gaggactctc 4980
agactcttga aatctaccic atcagataca acgccaaca tgagacagtc aatgtgcttg 5040
ggactgttgc actctggcca ctctcagccc caagcccaat tggcaagtgt gccctacact 5100
cacatcacct ctctctggac atagattgtg gctgcactga ctgaatgag gaccttgggt 5160
tgagggtgat ctcaagatc aagacccaag atggccatgc aaggttgggc aatcttgagt 5220
tttttgaaga gaaaccactt gtgggagaag ccttggcag agtgaagagg gcigagaaaga 5280
aatggaggga caagagagag aatgttgagt gggaaacaaa cattgtgtac aangaagcca 5340
aagaatcagt tgatgctttg ttgtgaact cccaatatga tagctctcaa gctgacacca 5400
acatagcaat gattcatgct gcagacaaaa ggttcacag cattctgtaa gcataccitc 5460
ctgaactctc agtgattcct ggggtcaatg ctgcaatctt tgaagagctt gaaggacgca 5520
tcttacttgc ctctctcttg tatgatgcaa ggaatgtcat caagaatggt gacttcacca 5580
atggccttgc ctgctggaat gtgaaagggc acgtggatgt tgaagagcag aacaatcacc 5640
gcctgtctct tgttctctct gattgggaag ctgaagtctt acaagaagtt cgtgtctgcc 5700
ctgtctgttg ctacattctt cgtgtgactg ctacaaaaga aggttatgga gaagggtgtg 5760
tcaccatcca cgagatagag aacaaatcig atgaattgaa gttcagcaac tgtgttaggg 5820
aagaggctta cccaacaaat actgtcactt gcaatgacta cactgcaact caagaagagt 5880
atgagggcac ttacacttct cgcacccgtg gctatgattg agctatagag agcaactcat 5940
ctgtgcttgc tgactatgct tcagccatg aagagaaggg atacactgat ggaaggcgtg 6000
acaatccttg tgaagcaaac agaggtatg gggctacac accctctcca gctggctatg 6060
tgaccaaaag gtltgagttc ttctctgaaa ctgacaaggt ttgattagag ataggagaaa 6120
ctgaaggcac attcatagtt gactctgttg agcttttgtt caiggaagag tgagtattta 6180
gcttatcac ctgagatctg gtcaccagca taatttttat taatgtacta aattactgtt 6240
ttgttaaatg caattttgct ttctcgggat tttaatatca aaactatatt agaaatcac 6300
aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc gatctgtat cataaaaaat acaaaaaaat 6360
ttattttgct tcaattattt taggattggt attsaggacg ctfaaattat ttgtcgggtc 6420
actacgcac atttgtattg agaagatcag cgatacgaaa taattctagt actatcgata 6480
aattatttga aaattcatan gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaag 6540
acagataaag ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gattgaagac 6600

```

	acgggaatttc tgacaggagc aigicttcaa ticagcccaa atggcagltg aaatactcaa	6660
	accgcccct atgcaggagc ggatcattca ttgittgtti ggtagccttt gccacaagg	6720
	gaglcacaagg ttgcggccgc gcgcgaaaa caactltgta taaaaagti gcgcgggiga	6780
	cigactgaac taaccaccaga aggiaattai ccaagaigta gcatacagaa tccaatgtti	6840
	acgggaaaaa ctatggaagi attaigttag ctacgaaga agcagatcaa tatcgggcac	6900
	atatgcacc tatgttcana aaigaagaat gtacagatac aagatcciat acigccagaa	6960
	tacgaagaag aatacgtaga attigaaaaa gaagaccag gcgaagaaaa gaatcttgaa	7020
	gagcttagca ctgacgacha caatgaaga aggaagataa ggicgggat tgigaagag	7080
	acatagagga cacaigtaag gtggaantg taaggcgga aagtaacctt atcacaagg	7140
	aaicttacc cccactactt atccitttai attttccgt gicatttttg ccttaggtt	7200
	ttctatata aggaaccag itcgccattt gtgaaacaa gaaaaaatt gggttagct	7260
	attttcttt aagtactgag gtacaaacti cagagaatt tptaagttg tagatccac	7320
	aatggacaac atcccaaca tcaacgagtg ctctcttac aatggcctga gcaaccciga	7380
	agtgagggt ctaggtgag acggatiga gattgttacc acacctatcg acatctcgtt	7440
	gtacttacc caatccctt ttgicaggti cgtgcccggt gcctgattcg tcttaggtt	7500
	tgctgatac atttggggaa tcttgggtc ctctcaatgg gacgccttc ttgtacagat	7560
	agagcagtta attaacaaa gaatagaaga attcgttagg aaccaaggca tctcaaggtt	7620
	agaaggcttc agcaacctt accagattta cgcagaatct ttccgagagt gggaaacaga	7680
	ccgacraat cctgccttaa gtagggagat gcgcattcaa ttcaatgaca tgaacagcgc	7740
	gcgaacgacc gcaattccg tcttcgcgti tcagaattac caagtctctc tttaatccgt	7800
	gtacgtgag gcgcgaacc tgcactgtc ggtgcctcgc gatgtctccg tgttcggaca	7860
	acgggtgggc ttgtatgcc caactataa tagtcgtat aatgatctga ctaggcttat	7920
	tgcaaciat accgattatg ctgttcgtg gtacacacg ggtctcgaac ggtctgggg	7980
	accgattct agagattggg tcaggtaaca ccagtcagg cgagagttga cactaactgt	8040
	cttagacatt gtgcctctt tcccaacta cgaactagg cgtacccaa tccgtactgt	8100
	gtcacaattg acccgggaaa tctacacaa cccagtcctc gagaacttcg accgtagctt	8160
	tcaggctcgc gctcaggga tagagagaag ctacaggctt ccaacccga tggacattt	8220
	gaacagtatc acgatctaca ccgaagcga ccgcggttat tctactgtt caggccatca	8280
	gatactggca tcaaccgtg gggtctcgg accagaattc acttcccat ttacaggac	8340
	atgggcaat gcagctccac acaacgtat ttgtctcaa ctgggtcagg gcgtgtatag	8400
	aacctgttc agcactctat ataggagac ttcaacatc ggcatcaaca atcaacaatt	8460
	gtctgtgctt gacgggacag aatttgcctt tggaaacctc tcaaatctgc catccgtgt	8520
	ctacagaagg agcgggaacg ttgatagcti ggaagatc cctccacaga acaacaact	8580
	tcaacctagg caagggttta gccatgcctt tggcatgtg tcaatgttc gttcaggcti	8640
	tagiaatagc agcgttagta tcatcagagc tccgtgttc tottggatac atcgtagtgc	8700
	tgagttaac aacataatt catccgatg cttactcag atccagctg tcaaggggaa	8760
	ctttctctt aatgttctg tcaattcagg accaggattc actggaggcg acttggttag	8820
	gcgaattct tccggcaaca acatccagaa tagagggtat atgaagtgc ccatcactt	8880
	cccatgaca tctaccagat atcgtgttcg tgaagggtat gcctctgtta cccctattca	8940
	ctcaacgtc aattggggtt attctccat ctittccaat acagtaccag cgacagctac	9000

[0020]

[0021]

atccttggat aatctccast ctagegattt cggttacttc gaaagtgcca atgccttcac	9060
ctcttcccta ggtaacatag taggtgttag aaatttcicc ggaaccgccg gattgataat	9120
cgaccgcttc gaattcattc cegttacttc aacgcctcag gcagagcttc acttggaag	9180
agcacagaag ggggtgaatg ctctgttcac ttctgccaat cagattgggc tcaagacaga	9240
tgtgactgac tatcacatcg atcagcttcc caaccttggt gaggccctct ctgatgagtt	9300
ctgtttggat gagaagaagg agttgtccga gaaggtcasa catgctaagg gacttagtga	9360
tgaggggaa cttgttcaag atcccaactt tgggggagc aacaggcacc tagatcgigg	9420
atggagggga agtaccgaca tcarcatcca aggagggtgt gatgtgttca aggagactca	9480
tgttaccctc ttgggtacct ttgatgagtg ctatccaaca taccgttacc agaagaaga	9540
tgaatcgaaa ctcaaagcct acacaagata ccagttgaga ggttaccatg aggaacttca	9600
agaccttgag atctaccctc tcagatacna cgcnaaacat gagacagtca atgtgcctgg	9660
gacgggttca ctctggccac tticagcccc aagtcctacc ggcaagtggt cccatcactc	9720
acaccacttc tccitggaca tagacttggc ctgtaccgac ctgaacgaag accctgggtt	9780
gtgggtgagt ttaagatca agactcaaga tggccaigcc aggttaggca atctggagtt	9840
ctagaaagag aatccacttg ttggagaagg cctcgctaga gtaagagggt ctgagangaa	9900
gtggagggac aagagagaga agttggaag ggaacaaac attgtgttca aagaagccaa	9960
agaaagcgtt gacgcctgtt ttgtgaactc tcagtatgat agactccaag ctgataccaa	10020
calagctatg attcaltctg cagacaaacg cgttcaatgc attcgggaag cttaacttcc	10080
tgaactttag gtagttccgg gtgtcaatgc tgcatacttt gtagagttag aaggcgcat	10140
cttacttcca ttctccttgt atgatgcag gaaigtctc aagaatgggt acttcaacaa	10200
tggcciatcc tgcgtgaag ttgaagggca cgtatagtga gtagaacga acaatcaacc	10260
ctctgtcttt gttgttctg agtgggaagg agaagtcca caagaagttc gtgtctgtcc	10320
tgttcgtggc taacttttc gtgttaccgc gtacaaagaa ggatacggag aaggttgcgt	10380
caccatacac gagattgaga acacacccga cggctgag ttacgcaact gcgtcagga	10440
ggaggtctac ccaaacacaa cgttacttg caatgactac actgcgactc aagaggagta	10500
tgagggtact taacttttc gcaatcgagg atacgatgga gcctatgaga gcaactcttc	10560
tgtacccgtt gactatgcat cagctatga ggagaaggct taacccgatg gacttaggga	10620
caatccctgc gaaatcnaa gaggctatgg ggaactacaa ccgttaccag ccggctatgt	10680
caccaagag tttaggtact ttccagaaac cgaacaaggt tggattgaga ttggagaaac	10740
ggagggaaca ttcatgttg atagcgtaga gttaacttct atggaggaat gattgattag	10800
cttaatcacc tagagctcgg ttacctatca aaatctatct agaaatacac aatattttgt	10860
tgcaggcttg ctggagaatc gatctgctat caataaaatt acaaaaaaat ttattttgcc	10920
tcaattatct taggatttgt attaaggacg cttaaatat ttgtcgggtc actacgcate	10980
attgtgttg agaaatcag cgtatcgaaa taticgtagt actatcgata atttatttga	11040
aaattcafan gaaaagcaaa cgttacctga atgatgaaa caatcacaa acagataaag	11100
ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt actgaatat ggttaagatc accgaatttc	11160
tgcaggagac atgtcttcaa ttacgcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat	11220
atgcaggagc ggaatcttca ttgtttgttt ggttgccttt gccacatagg ggttccaagg	11280
tggcgccgc gcgcgcaccc agctttcttg tacaagttgg ttgcggccgc ttaattaat	11340
ttaaatgcc gggcgtttta accgcccgc ttaattaaag ccggccttga gcaaacccag	11400

[0022]

```

aaggtaattt tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa aciatggsag 11460
tattatgtaa gtccagcaag aagcagatca atatgcggca caatgcaac ctatgtlcaa 11520
aatatgaaga tftacagata caagatccta tactgccaga atcagaagaa gaatacgtag 11580
aatatgaaa agaagaacca ggcaagaaa agaacttga agacgtiagc acigacgaca 11640
acaaatgaan gaagangata aggtcgggtg ttgtgaaaga gacatagagg aacaaigian 11700
ggggaaaaai gtaagggcgg aaaglaaccc lalcacaaag gaactttatc ccccaclaci 11760
tatccctttt tatttttccg tgtcaatttt gcccttgagt tticctatat aaggaacca 11820
gttcggcalt tgtgaaaaca agaaaaaai tggiglaagc taattttctt gaagtaacta 11880
ggatacaact tcagagaat ttgttaagtt gtagatctcc atgtctccgg agaggagacc 11940
agttagagtt aggccagcta cagcagctga tatggccgcy gtttgtgata tegttaacca 12000
tiacatttag acgtctacag tgaactttag gacagagcca caaacaccac aagagtggat 12060
tgaatgata gagaggttgc aagatagata cctttgggtg gtgtctgagg ttgaggggtt 12120
tggtgctgtt attgtttacg ctgggcccig gaaggttagg aacgttiacg attggaacgt 12180
tgagagtact gttacgtgt cacaatggca tcaatgggtg ggcttaggat ccacattgta 12240
cacacatttg cttatgcta tggagcgcca aggtttttag tctgtgttg ctgttatagg 12300
ccttccaaac gatccatctg ttaggtttga ttaggtttg ggatacacag cccggggtac 12360
attgcgcgca cctggatata agcatgttgg atggcatgat gtgtgtttt ggcaaaaggga 12420
ttttgagttg ccagctctc caaggtccgt taggcagtt acccagatct gaggtaacct 12480
gagcttgagc ttatgagct atgagcttag agctcggatc cactagtacc ggccgccagt 12540
gtgtctggaat tgcctttga ctatagagg gccagatcg gcgcacatag cttcttagcg 12600
ccatcccggt ttgatccat ctgtgttga atagtgcga tggcgaagge tctctttcag 12660
aaagacagcg gcccaaggga acccaaggta aggtgggcta tggctctcag ttctttgtg 12720
aagcgtttgg tctaagggtc agaggttga gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa 12780
caagatatgt tgaftctacg taaggatatt aaagtatga ttatcacta atataatcag 12840
tgtattccaa tatgactac gatttccaat gtctttattg tgcctgtatg taatcggtgt 12900
cacaataaa tccccgtga cttctttta atccaggatg aaataatag ttattataat 12960
ttttcgat ttgtcgtta taggaatga agtggtttg cggtcgcac cactccctt 13020
tcataattt acatgtatt gaaaaataa aatttatgtt attcaattt aacacgtata 13080
ctgttaaga atgatatctt gaagaaata tagttaant atttatgat aaaaataaa 13140
gtcagatatt atagccaag caaaacata aatttatga tgcagttta aattcagaaa 13200
tattcaata actgattata tcagctggta cattgccgta gatgaaagc tgagtgcgat 13260
attatgtgtt aatacatagc ggccgggttt ctatgcaccg gttaggtacc gtttaaac 13320
gaggttagcg catgcacata gacacacaca tcatctcat gtgtgttgtt aataatgtc 13380
attagattgt tttatgcat agatgcac  gaaatragcc aattttagac agiatcaca 13440
cgatgtgac ttcatgcat taaaacgtc cgaatgtgc cattggcac aacctctgat 13500
gcgttaact ttctttgtg gticagaaat ccaaccgtta tggataatc taaatctca 13560
tacttcatct ttccacaaa gcacaaatc tctactagt aggttttga ttgttttat 13620
atctctaaa gaattaaata tttttattt ttcaatcatt attcataaa agatagttaa 13680
gtccctttg tctgcagaga aaatgttga aaaagaaat aaataataa ataataangi 13740
gtgttaaat tcatattttt atattatatt ttattcaaa aactttaac tcatgtgact 13800

```


[0024]

tgaagaaat ccaaccattg gantaaaaa taaagttttt tcttggaaat tgetaaiget	1320
acagcactta ttgttacttg tectaaaaat gaaactctag ctatatttag cacttgatat	1380
tcaigantca aacttctcta tgaataaacc ggggtgcgca tgggtgcttg ttgatccgcg	1440
gcaagttggg atcttgaagc aagttccgct catcactaag tgccttagca tgtttgacct	1500
tctcgacaa ctcttctctc tctttaaattg atcaacagtc agctcatca caccanaagt	1560
taggcccgaa tagtttgaat ttgaaaagct cgcatttagg gtctadagcg caatttcgct	1620
cttagccgta caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatggcg cgggattaaa	1680
aatctcaatt atatttggic taatttagtt ttgtatttag taaaacaaat tgggcgccat	1740
gccggcgcaa ggggcgcgac aagtttctac aaaaaagcag gctccgcggt gactgaciga	1800
aaagctgtc gacctgcagg tcaacggatc aggaattctt tgtttaagat gtigaactct	1860
atggagggtt gtaigaactg atgactaggg accggataag tccccctct catngcgac	1920
ttattcaag aatgttttgt gtatcattct tgttaccttg ttattaatga aaaaatatta	1980
ttgttacttg gactgaacac gaggtttaa tatggaccg gcccaataa agatccattg	2040
atatagaat taaataacaa gaataaatcg agtaccaaa ccacttgcct tttttaacga	2100
gacttgttca ccaacttgat acaaaagtca ttactctatg caaatcaata atcafacaaa	2160
aatatccaat aacactaaaa aattnaaagn aatggataat ttcaaatat gtatacgat	2220
aaagaagtta ctittccaag aaattcacgt attttaaaag cccacttgca ttagataaat	2280
ggcaaaaaa accaaaaagg aaaagaata aagcacgaag aattctagaa aatagcaaat	2340
acgtttcaat gcagttggac ccacggttca attattgcca attttcagct ccaccgtata	2400
tttaaaaaat aaanagaata tgciaaaaa atataaatcg taacgatcgt taaatctcaa	2460
cggctggate ttatgacgac cgttngaaat ttgggttctc gacgagtcag taataaacgg	2520
cgtcaaatgt gtgtagccg gcacacacga gtctgttcta tcaactcaaa gcacaatac	2580
tttctctca cctaaaaata aggcatttag ccaaaaacaa ctttgcgtgt aaacaacgct	2640
caataacgt gtcattttat tattagctat tgccttaccg ctttagcttt ctcttgacct	2700
agctgcctc gtcttttctt ctcttctctc tatasaacaa tacccaagc ttcttcttca	2760
caattcagat ttcaatttct caaatctta aaactttct ctcaattctc tctaccgiga	2820
tcaaggtaaa ttctgtgtt ctttattctc tcaaaatctt cgaatttgtt ttcttctgat	2880
cccaatttcg tatatgttct ttgtttttag ttctgttaat cttagatcga agacgatttt	2940
cgttggttga tcttagata tcatcttaat tctcgattag gttttcataa atatcatcgg	3000
atttgitena ataatttagg ttgtgtcgaa taattactct tctgatttgg atttctatct	3060
agatctegtg ttagtctcta gttgtgcga tgaatttgt cgattaatct gattttttct	3120
gattaacaga gatctccatg gagaacata tccagaacca gttgttccca tacaattgcc	3180
tcaacaatcc tgaatttag atctcaacg aagagaggag cactggacgc ctcccccttg	3240
acatctccct ctcccctcaa aggttctttt tgtctagatt ttgtcttggg gtgggtgtgg	3300
cctttggcct ctttgacctc atctggggct tcttccccc atctgattgg agctcttccc	3360
ttctccagat tgaacaattg attgagcaga ggattgagac ctttgaagg aacagagcca	3420
tcaccacact tcttgccctt gctgacagct atgaatcta cattgaagca ctccgtgagt	3480
gggaagccaa tcccaacaat gctcaactcc gtgaagatgt gaggatttgc ttigccasca	3540
cagatgaagc ttgtatcaca gccatcaaca atttaccctt caccagcttt gagatccctt	3600
tgtctcagat ctatgttcaa gctgcaaac tccacttagg ctgtcttagg gatgtgtgt	3660

[0025]

ccctcggaca aggttgggga ctgacatag ccactgtcaa caatcactac aacagactca	3720
tcacattgat tcatcgctac accaaacatt gcttggacac ctacaatcaa ggattggaga	3780
acctcagagg caccacacat cgcgaatggg caagggtcaa ccagtttaga agggatctca	3840
cactcactgt gcttgacata gttgtctctt tcccacata tgaigtctgc acctaccctaa	3900
ttcaaacag ctcctacatt acaagggaat ctacacctc ctacgtcttt gaggacagcc	3960
cagttttctg caacataccc aatgttttca accgtgtga gtttgggtgc agaccacccc	4020
atctcatgga ctctatgaac tcttgtttg tgaatgcga gactgttagg tcccaaatg	4080
tgtggggagg ccaccttgtt agtcccgca acaccgttg caaccgcatc aacttccat	4140
ccatggagt ttcaatctt ggtaggcca tctggattgc agataggagc ccaaggcctt	4200
ctacagaa cttgtcagat cctgtctttg tcagaggagg cttaggcaat ccacactatg	4260
ttcttgggtt gaggggagt gcttttcagc agatggcac caatcacacc cgcacattca	4320
gaaacagcgg caccattgac agccttgatg agatccacc tcaagacaa agcggagcac	4380
ccgggaacga ctactccat gigtctaat atgtacctt tgtgccttg ccgggtaga	4440
tcagcgttc agattcttg agagcaacca tgttctcatg gacctatgc tctgccacac	4500
ccacaanac cattgatcca gagagaaica cccagattcc cttagtgaa gcaacacac	4560
ttcagcttgg aaccacagtt gtcagagggc ctgggttca tggtagagac attctcagac	4620
gcacctctgg agggccattt gcttaccca ttgtcaaat caatgggcaa ctcccacgc	4680
gtaccgtgc cagaatccgc tatgttcca ccactaactt gagaactat gtcacattg	4740
ctggtagaag gatctttgtt ggtcagttca acagacaat ggaactggt gatccattg	4800
cattccagtc attctctat gccaccata scactgcatt cactttcca atgagccagt	4860
ccagcttca agtgggttga gatacttca gctccggcaa ttaggtgtac attgaccgtt	4920
ttgagtgtat tccagtact gccacacttg agcctagtc tgaattggag cgtgtcaga	4980
agcccgtaga tgcctcttc acctttcaa atcagattgg gctcaagaca gatgtgactg	5040
actaccatat agaccgtgtt tccaatcttg ttgagtgct ctctgatgag ttctgcttgg	5100
atgagaagaa agagtgtca gagaaggta agcacgccaa gaggctctct gatgagagaa	5160
actgttcca agatcccaac ttcagaguga tcaaccgtca atggatcgt ggaaggaggg	5220
gatcaactga cataaccatt caaggagggt acgatgtgtt caagggaac taigtacac	5280
tcttgggac cttagatgag tgcatacca cataccttta ccagaagata gacgaagca	5340
agctcaggc ctacacaga taccgttga gaggttacat tgaggactct caagaccttg	5400
aatctactct catcagatac aacgccaaac atgagacagt caatgtacct gggactggtt	5460
csctctggcc actttcagcc ccaagcccca ttggcaagtg tgccatcac tcacatcact	5520
tctccttga catagatgtt ggtgtcacgt actgaatga ggaccttggt gtgtgggtga	5580
tctcaagat caagaccaa gatggccatg caaggttgg caatcttgag ttcttgaag	5640
agaaaccact tgttggagaa gcccttgcca gaggaagag ggtgagaag aaaggaagg	5700
acagagaga gaagttagg tgggaacaa acatttgta caaagaagcc aagaatcag	5760
ttgatgttt gttagtgaa tcccaataig ataggctcca agctgacac aacatagcaa	5820
tgaattcag tgcagacaa aggtttcaca gcatcttga agcatacct cctgaacctt	5880
cagtgattcc tgggttcaat gctgcaatct ttgaagagct tgaggagcc atcttactg	5940
ctttctctt gtatgatga aggaatgtca tcaagaatga tgacttcaa aatggccttt	6000
ccgtctgga tgtgaagggt cactggatg ttgaagagca gaacaatcac cgtctgtcc	6060

[0026]

tigtgtgcc tgagtgga gctgaagtt cacaagaagt tegtgtcgc cctgtgtgt	6120
gtacatctt tegtgtgact gcttacaag aaggctatgg agaaggttgt gtcacatcc	6180
acgagataga gaacaaact gaigaatga agttcagca cigtgttgag gaagaggtct	6240
acccaaccaa tactgtcact tgcataact acactgcaac tcaagaagag taagsggca	6300
cttacacttc tgcacacct ggctatgat gagcctatga gaguaccca tctgtgctg	6360
cigactatgc ttacagctat gaagagaagg caaacactga tggagggct gacatccct	6420
gtgaagcna cagagggctat ggggaactaca cccccctcc agctggctat gtgacaaag	6480
agttggagta ctttctgaa actigacaagg ttggattga gataggagaa actgaaggca	6540
catcatagt tgactctgtg gagcttltgc tcatggsaga gtaggiagt agctaatca	6600
cctagagctc ggtaaccagc ataatttita ttaattgact aaattactgt ttgttaaat	6660
gcaatttgc tttctcggga ttttaataic aaaaatcatt tugaaiaca caatatttg	6720
ttgcaggctt gctggagaat cgaactgcta tcaataaat tacaataaaa tttatttgc	6780
ctcaattait ttaggattgg tattaaggac gcttaatta ttgtcgggt cactacgcat	6840
catgtgatt gagaagatca gcgatacga atattcgtag tactatcgt aatttatgt	6900
aaattcata agaaagcaa acgttacatg aattgaiga acaatcaca gacagataa	6960
gcacgcaca tttaggatat tggccgagat tactgatat tsgiaagat caggaattt	7020
ctgacaggag catgtctca attcagcca aatggcagt gaaatacca aaccgcccc	7080
taigcaggag cggatcatc attgtttgt ttgttgcct tgcacacat ggagtccaag	7140
gttgcggccg cgcgcgaaa acacttgtt atacaaaagt tgcgcgggt actgactga	7200
ctaaacccag aaggtaaita tccaagatg agcatcaag atccatgtt taccggaaa	7260
actatgaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca atatgcggca catatgcaac	7320
ctatgttca aaatgaagaa tgtacagata caagatctc tactgccaga atacgaagaa	7380
gaatagctg aaatgaaag agagaacca ggcgaagaa agaatctga agacgtaac	7440
actgacgaca acaatgaaa gagaagata aggtcggga ttgtaaga gacatagag	7500
acacatgta ggtagaaat gttagggcg aaaglaacci tatcacaag gaacttalc	7560
ccccactact tatcttita tattttctg tgcatttlt gccctttagt ttctctaat	7620
aggaaccaa gtctggcatt tgtgaaaca agaaaaatt tgggtgaagc tatttctt	7680
gaagtactga ggtacacct tcaagaaaat ttgtaagtt gtatgccaa caatggacaa	7740
caatccacc atcaacgagt gcatctctta caactgctg agcaacctg aggttaggt	7800
gttggttga gaacggattg agactggtt cacacctat gacatctgt tgcacttac	7860
ccaattcct ttgtcagagt tctgtcccg tcttggaatc gtgttggac ttgtcagat	7920
catltggga atctttggt cctctcaatg ggaacccctt ctgtacaga tagagcatt	7980
aatnaccaa agaatagaag aattcgctag gaaccaagcc atctcaaggt tagaagcct	8040
cagcaacct taucgaatt acgcagatc ttctcgagag tgggaagcag acccgacaa	8100
tcctgctta agagaggaga tgcgcttca atcaatgac atgaacagcg cgtgaogac	8160
cgcatttccg ctcttcgag atcagaatta ccaagttcct ctltatccg tgaactgca	8220
ggctgccaac ctgcactgt cgggtctcg cgaatctcc agtttcgac aacggtggg	8280
ctttgatgc gcaactatca atagtctga taatgactg actaggtta ttggcaacta	8340
taccgattat gctgttcctt ggtacacac ggtctctga cgtgtctgg gacggatc	8400
tagagatttg gtcaggatca accgttcag gcgagattg auctaactg tcttagacat	8460

[0027]

tgtagctctc ttteccaact acgactctag gcgctaccca atccgiactg tgcacaaatt	8520
gacccggaga atctacacaa acccagictt cgagaacttc gacagtagct tttagagctc	8580
ggctcagggc atagagagaa gcctcaggic tccacacctg atggacatat tgaacagtat	8640
cacgactctc accgaigcgc acccgggta ttaactactgg tcaggggctc agatcaiggc	8700
atccccggtt gggttctctg gaccagaaat cactttccca ctttaccgga ctaigggcaa	8760
tgcagctcca caacaacgta ttgttgctca acicggctcag ggcgigtata gaacctigtc	8820
cagcactcta tataggagac ctttcaaat eggcatcaac aaacaacaat tgtctgtgct	8880
tgaagggaac gaatttgcct aiggaaacct ctcaaatctg ccatccgctg tctacagaaa	8940
gagcggaaac gttagatgct tggatgagat cctctcacag aacaacaacg ttccacctag	9000
gcagggaatt agcctatgcc tttagcctgt gtccatgttc cgttcaggct ttagtaatat	9060
cagcgttagt atcatcagag ctccgaigt tctctggata catcgtatgt ctgagttaa	9120
caacataatt gcatccgata gcattactca gatccagct gtcaagggga actttctctt	9180
taattggtct gtaatttcag gaccaggatt cactggaggc gacttggata ggcigaaatc	9240
ttccggcaac aacatccaga atagagggtt taitgaagtg cccaatcact tcccatcgac	9300
atctaccaga taicgtgttc gigttaaggta tgcctctgtt acccctatlc acccaacgt	9360
caattgggtt aattctctca tcttttccaa tacagtacca ggcacagcta catcttggga	9420
taatctccaa tctagcgatt tgggttactt cgaaggigcc aatgcttca cctcttccct	9480
aggtaacata gtaggigita gaaattctc cggaaaccgc ggagtgataa tggaccgttt	9540
cgaattcaat cccgttactg caacgcctga ggcagagctt gacttggaaa ggcacagaa	9600
ggcgggaatt gctctgttca cttcttccaa tcagattggg ctcaagacag atgtgactga	9660
ctaicacatc gatcgcgttt caaacctgt tgaatgcctc tctgaatagt tctgtttgga	9720
tgagaagaag gattgtctcg agaaggicaa acatgtctag cgaattagtg atgagcggaa	9780
cttgcttcaa gatcccaact ttgcggggat caacaggcaa ctatgctgtg gatggagggg	9840
aagtacggac atcaccaatc aaggagggga tgatgtgttc aaggagaact atgttacgtt	9900
cttgggiacc ttgtatagt gctatccaac ataccgtac cagaagatag atgaatcgaa	9960
actcaaaacc tacacaagat accagttag aggttacatc gaggacagtc aagaccttga	10020
gacttacctc atcagatcaa accccaaca tgagacagtc aatgtgctg ggaagggttc	10080
actctggcca ctttcagccc caagtccat cggcaagtgt gccatcaact cacaccatt	10140
ctcttggac atagacgtg gctgtaccga cctgaacgaa gacctcgtg tgtaggggat	10200
cttcaagatc aagactcaag atggcctatc caggctaggc aaatcggagt ttctagagga	10260
gaaaccactt gttagagaag cctctcgtag agtgaagagg gctgagaaga agtggagaga	10320
caagagagag aagttggaat gggaaacaa cattgtgtac aaagaagcca aagaagcgt	10380
tgaagctctg ttgtgaact ctcatatga taggtccaa gctgatacca acatagctat	10440
gattcatgct gcagacaaac gcgttcaatg caatcgggaa gcttaccttc ctgaacttag	10500
cgtgattcgc ggtgtcaatg ctctatctt tgaagagtta gaaggcgca tcttacttgc	10560
attctcttga taatagcga ggaatgcat caagaatgtt gacttcaaca atggcctatc	10620
cgtctgaat gtgaaggga acgtagatgt agaagaacag aacaatcacc gctctgtctt	10680
tgttgtctct gattgggaag cagaagtttc acnagaagt cgtgtctgtc ctggctgtgg	10740
ctacattctt cgtgttaccg cgtacaaaga aggaatcgga gaaggttgcg taccatata	10800
cgagatttag aacacacacg acgagctgaa gtacagcaac tgcgtcaggg aggaagtcta	10860

[0028]

```

cccaaacac accglaacti gcaatgacta cactgcgact caagaggagi atgagggtac 10920
ttacacttct cgaatcgag gatacgaagg agcctaigag agcaactctt ctgtaccgcg 10980
tgactatgca icagcciatg aggagaaggc ttacacgat ggacgtaggg acaatccitg 11040
cgaatctaac agaggctatg gggactacac accgttacca gccggctatg tcaccaaaaga 11100
gttagagtac ttccagaaa ccgacaaggi ttggatigag atggagaaa cggaaaggaa 11160
atcattgtit gatagcgigg agttactict gatggaggaa tgagtatgta gcttaatcac 11220
ctagagctcg gtacctatc aaaatctatt tagaataca caatattitg ttgcaggctt 11280
gtcggagaa cgaatcgta tcatanaaa tacaaaaaa ttttatitg ctaattatt 11340
ttaggatigg tattaaggac gcttaatta ttgtcgggt cactacgat cattgtgatt 11400
ggagaagta gcgatacga atattcgtag tactatgat aatttatitg aaattcata 11460
agaaaagca argttacatg aatgatgaa acaaiacaa gacagataaa gccacgcaca 11520
ttaggatai tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cagggaattt ctgacaggag 11580
catgtcttca atcagccca aatggcagtt gaataactca aaccgcccca tatgcaggag 11640
cggatcttc atgtitgtt tgggttgcct tgcacaaig ggagtcgaag gtgcggccg 11700
cgcgcgcacc cagcttctt gtacaaagtg gtgcggccg ctaattaaa tttaaatgcc 11760
cggcggtta aacgcggccg ctaattaaag gccggcctgc agcaaaccca gaaggtaat 11820
atcagaagtg tagcatcag aatccaatgt ttacgggaaa aactatggaa gtattatgta 11880
agctcagaa gaagcagatc aatatgcgc acatacgaa cctatgttca aaatgaaga 11940
atgtacgat acaagatct atactgcag aatacgaaga agaatacgt gaaattgaaa 12000
aagaagaacc aggcgaagaa aagaatctt aagacgtatg cactgacgac acaatgaaa 12060
agaagaagt aaggtcggg atgttgaaag agacatagag gacacatga aggtgaaaa 12120
tgaaggcg gaaaglaacc ttatcacaan ggaatctat cccctactac ttatcttct 12180
atattitct gtgtcatit ttgccttgag ttctctata taaggaaaca agtgcgcat 12240
ttgtgaaac aagaaaaat ttgtgtgaag ctatttctt tgaggtactg aggatacaac 12300
ttcagagaaa ttgtatgtt tgtatgctc catgtctcg gagaggagac cagttagat 12360
tggccagct acagcagctg atatgcgcg gtttgggat atcgttaacc attacatga 12420
gactctaca gtgaactta ggacagagcc acaaacacca caagagtga ttgatgatc 12480
agagaggit caagatgat acccttgggt gttgtctgag gttagggatg ttgtgcctg 12540
tatgtctac gctggccct ggaaggctag gaacgttac gattggatg ttgaggtac 12600
tgittacgt tcacatagc atcaaagggt ggccctagga tccacattg acacacatt 12660
gcttaagct atggagcgcc aaggttttaa gtctgtggt gctgttatg gcctccaaa 12720
cgatccatc gttaggtg atgaggttt gggatacaca gcccgggta cattgcgcg 12780
agctggatac agcatgtg gatggcatg ttgtgtttt tagcaagggt atttgagtt 12840
gccagctct ccaaggccag ttaggccag taccagatc tgaggtacc tgagcttag 12900
ctatagatc tatagctta gactcggat ccaatagta cggccgccg tgtgttgaa 12960
ttcgccttg actagatag cgcacagatc ggccgaata gcttcttag gccatcccg 13020
gttgacctc tctgttga aatagtgcg gtggcaagg ctctcttca gaaagacag 13080
cgccaaagg aaccaaagg gagggggtc atggcttca gttcttggg gaaagcggt 13140
gtctaagggt caggggtgt agcggatga agcaaaagt tccgattga acaagatag 13200
ttgatctac gtaaggatat taaagtatg attctcact aataataca gtgtattca 13260

```

[0029]

```

atagtacta cgattlccaa tglctitait gtgcgcgtat gaaicggcg tcacaaaata 13320
atccccgtg actitctitt aatccaggat gaaataatat gttattataa tittitcgat 13380
tiggiccggt ataggaattg aagtgtgctt gcggtcgcca ccactcccat ttcataatit 13440
tacaigtatt tgaanaataa aaattiatgg taticaatit aaacacgtat acttgtaaag 13500
aatgatatct tgaagaant atagittaaa taittatiga taaantaaca agtcaggfat 13560
tatagtccea gcaaaaacat aaattiatig atgcaagtti aaaticagaa atatttcaat 13620
aactgattat atcagctggg acattgccgt agatgaaaga ctgagtcgca tattaiggtg 13680
taatacatag cggccgggtt tctagtcacc ggtaggac cgtttaaact cgaggctagc 13740
gcattgcacat agacacacac atcatctcat tgaigcttgg taataattgt cattagattg 13800
tittitaiuca tagaigcact cgaatcagc caattitaga caagiatcaa acggaigtga 13860
cttcagtaca ttaaaaacgt ccgaataig atattcatta attitaiati aictaaaaga 13920
gttaaaagag aaaaaagaaa tatgacaatt titttcttcc acatcttcta acctaaaagt 13980
atgactctat ggaggctaa gttagaaaaa gatacggatc taggggtgtg aaacatcaat 14040
ggtaacatcc tttitaiatt caatcaattg ggttttgcct tatctttaca ttttctctt 14100
ttatittcca cgtctattca aatctacttg ttagegggtg attactcttt tttctittat 14160
agatgccaat tatttctctc ctatgiatta aattagagta taitgtcttg aaagtgactt 14220
agtaittiag tttatagtct cttaagaac gacacctttt attcttaact cttttatca 14280
agtittaat taaaattiat ttaatttaag taigcataca taacttaata tttttcttaa 14340
ttatitttaa attccctaaa tttaagtgtt tcatacaatg taagagatai acataattaat 14400
tatattttaa gataaaactt actttctctg aataaaaata agaaaaggac agtcatacaa 14460
ttatataatt aatccagaat aittatagct tttaaacatt tatttctat caaitaagta 14520
ataactttaa ataaaattaa gagtactttt ttatcttcca aagaatttai ttatttcaa 14580
caaatctgtc tgaactgttc aattgatcat tatcagctta gcataacctt aatttcattt 14640
tcaaacataa cttttggcac caaatccccc ggcatgtcaa aaaagtcttt tgcgatatga 14700
ccctccagca cgcagaacca ctgtatttca ttaccaatcc ttttaattctt aatttcccat 14760
acactttacc tttcaatgac aicttcaaa gctttatitt gcttttcttg ttaagctgtt 14820
tttaacctaa tttaigcat ataaacaaag agtaagcaa aggcaaatat tigtacgiat 14880
agtittttag cagaaaagga aagtaaatia tagagataat gaagtittgt cttttaaatt 14940
cgtcgtgatg ttatccatca tatctaaatg ctatttcttg tttttgtctt ttttctctt 15000
taccggagtt tattttatat aatttaattaa agttagttaga tctatattct tttcataga 15060
taatccatct tctttggagg cacatcgatc ataatcata gagttttgag aagcattatc 15120
actaaagctt caatttaata tatccaataa acggtatttg tgtatgatgt tatgatagca 15180
aatagataat ctaatctata cgagccacaa aaggggcatg aactctatct cgaagaaatt 15240
ggagatgaag ggattgagat tggcaccitg tgcatttatt gccactaat cati 15294

```

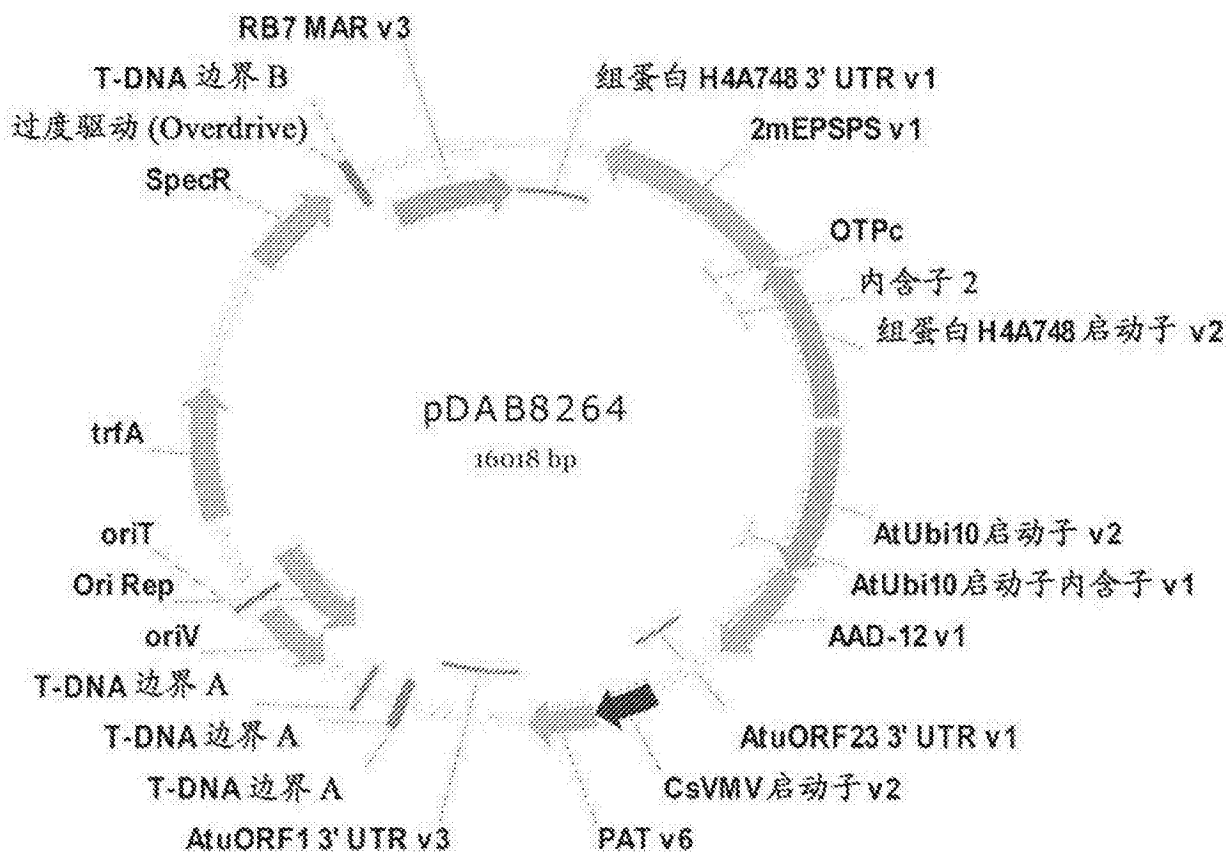


图1:含有2mepspsv1、aad-12和pat表达盒的pDAB8264的质粒图

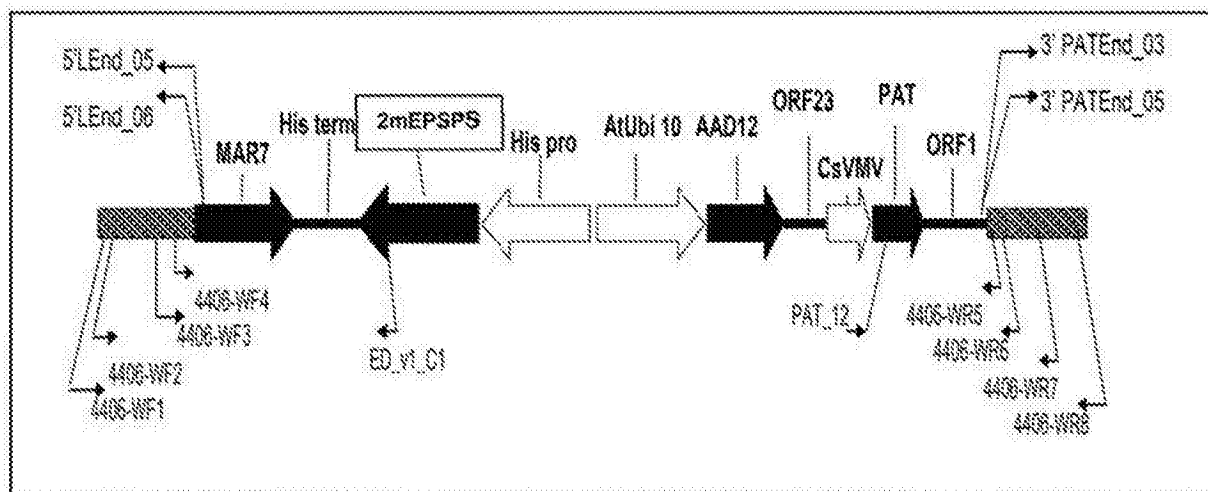


图2:从5'至3'边界的大豆事件pDAB8264.44.06.1的引物位置的示意图

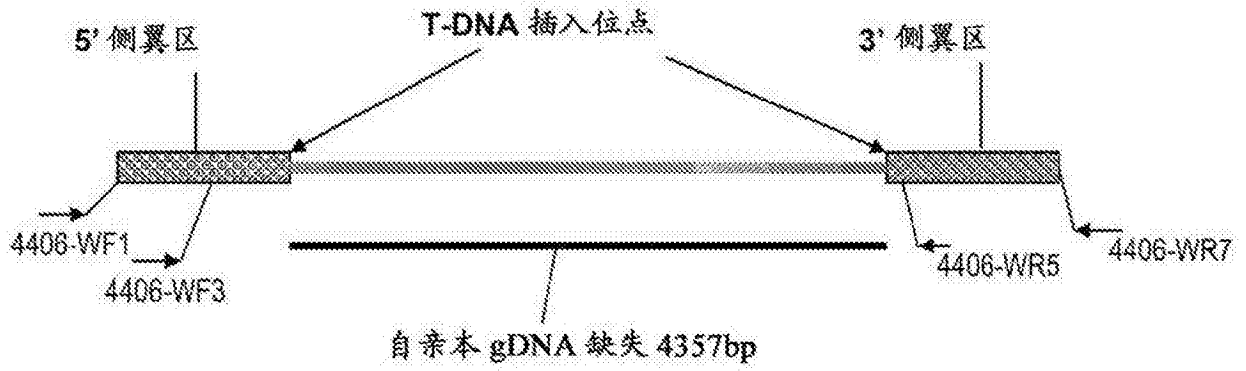


图3:描绘大豆事件pDAB8264.44.06.1中引物位置和基因组缺失的示意图

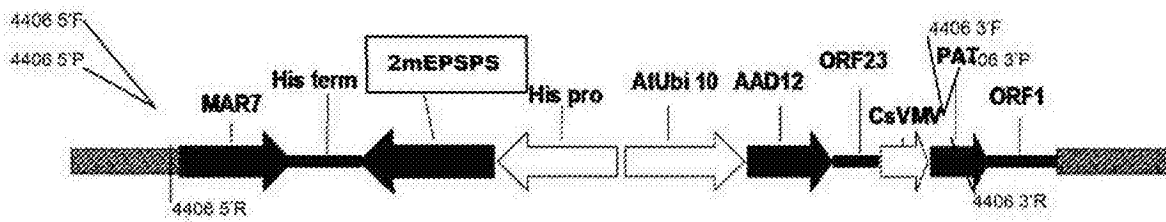


图4:描绘用于大豆事件pDAB8264.44.06.1的TaqMan测定法的引物位置的示意图