



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104928256 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201510427640. 5

代理人 陈静

(22) 申请日 2010. 11. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/263, 950 2009. 11. 24 US

C12N 5/10(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

201080062201. 4 2010. 11. 24

(83) 生物保藏信息

PTA-10442 2009. 10. 22

(71) 申请人 陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 Y. C. 崔 T. 霍夫曼 N. 周

G. 吉勒斯 T. 赖特 J. 科隆

R. 巴恩斯 N. 瓦诺普多普 Y. 白

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

权利要求书1页 说明书63页

序列表10页 附图4页

(54) 发明名称

AAD-12 事件 416、相关的转基因大豆系及其事件特异性鉴定

(57) 摘要

本发明涉及 AAD-12 事件 416、相关的转基因大豆系及其事件特异性鉴定。具体地,本发明包括关于大豆植物中的除草剂耐受性的新的 aad-12 转化事件,在本文中称为 pDAB4468-0416。本发明包括插入大豆细胞基因组内的特定位点中的异源多核苷酸。在一些实施方案中,所述事件/多核苷酸可以与其它性状,包括例如其它除草剂耐受性基因和/或昆虫抑制性蛋白“叠加”。另外,本发明提供了用于检测样品(例如大豆)中的主题事件的存在测定法。该测定法可以基于插入大豆基因组中的重组构建体的 DNA 序列及在插入位点侧翼的基因组序列。还提供了可用于进行所述测定法的试剂盒和条件。

1. 一种包含基因组的转基因大豆植物细胞,所述基因组包含 SEQ ID NO:1,其中所述细胞不能再生为完整植物。
2. 一种包含基因组的大豆种子细胞,所述基因组包含 AAD-12 事件 pDAB4468-0416,如存在于以登录号 PTA-10442 保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 的代表性种子中的,其中所述细胞不能再生为完整植物。
3. 一种包含基因组的大豆种子细胞,所述基因组包含 SEQ ID NO:1,其中所述细胞不能再生为完整植物。
4. 通过种植权利要求 2 的种子细胞生成的大豆植物的细胞,所述植物包含 SEQ ID NO:1。
5. 权利要求 4 的大豆植物细胞的后代植物细胞,所述后代植物包含 AAD-12 事件 pDAB4468-0416。
6. 权利要求 1 的大豆植物细胞的除草剂耐受性后代植物细胞,所述后代植物包含 SEQ ID NO:1。
7. 一种转基因大豆植物细胞,其包含位于染色体 4 上在 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的 SNP 标志物间的大豆染色体靶位点中的转基因插入物,其中所述靶位点包含异源核酸,其中所述细胞不能再生为完整植物。
8. 一种制备转基因大豆植物的方法,包括在染色体 4 上在 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的 SNP 标志物间的位置插入异源核酸,其中所述靶位点包含异源核酸。
9. 权利要求 4 的植物的一部分的细胞,其中所述一部分选自下组:花粉、胚珠、花、枝条、根、和叶,所述一部分包含 SEQ ID NO:1。其中所述细胞不能再生为完整植物。
10. 一种包含转基因插入物的转基因大豆植物的细胞,所述转基因插入物在选自下组的基因组序列中或者侧翼有选自下组的基因组序列:SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 和 SEQ ID NO:1 的残基 9122-10, 212,其中所述细胞不能再生为完整植物。
11. 一种分离的多核苷酸分子,其中所述分子包含至少 15 个核苷酸,并且在严格清洗条件下维持与选自下组的核酸序列杂交:SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 和 SEQ ID NO:1 的残基 9122-10, 212。

AAD-12 事件 416、相关的转基因大豆系及其事件特异性鉴定

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 11 月 24 日、申请号为 201080062201.4 (PCT 申请号为 PCT/US2010/058001)、发明名称为“AAD-12 事件 416、相关的转基因大豆系及其事件特异性鉴定”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] aad-12 基因 (最初来自食酸戴尔福特菌 (*Delftia acidovorans*)) 编码芳氧基链烷酸酯加双氧酶 (aryloxyalkanoate dioxygenase, AAD-12) 蛋白。该性状赋予对例如 2,4-二氯苯氧基乙酸及对吡啶基氧基乙酸酯 (pyridyloxyacetate) 除草剂的耐受性。关于植物中的除草剂耐受性的 aad-12 基因自身在 WO 2007/053482 中第一次披露。

[0004] 异源或外来基因在植物中的表达受到外来基因在何处插入染色体中影响。例如,这可以是由于染色质结构 (例如,异染色质) 或转录调节元件 (例如,增强子) 接近整合位点的接近性 (Weising 等, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988)。相同类型的转基因植物 (或其它生物体) 中的相等基因可以在不同事件间展现出表达水平的广泛变化。还可能存在着空间或时间表达样式的差异。例如,转基因在多个植物组织中的相对表达差异可以不对应于自存在于导入的基因构建体中的转录调节元件预期的样式。

[0005] 如此,经常创建大量事件,并筛选以鉴定以对于给定的目的满意的水平表达导入的感兴趣基因的事件。对于商业目的,生成成百上千个不同事件,并对那些事件筛选具有期望的转基因表达水平和样式的单一事件是常见的。具有期望的转基因表达水平和/或样式的事件可用于使用常规的育种方法通过有性异型杂交 (outcrossing) 将转基因基因渗入 (outcross) 其它遗传背景中。此类杂交的后代维持初始转化体的转基因表达特征。使用此策略来确保充分适应于地方生长条件的许多品种 (variety) 中的可靠基因表达。

[0006] 美国专利申请 20090130071 涉及大豆事件 MON87701 及检测方法。美国专利申请 20090036308 和 20080051288 涉及大豆事件 3560.4.3.5 及检测方法。美国专利申请 20080312082 涉及大豆事件 DP-305423-1 及检测方法。美国专利申请 20060282915 涉及大豆事件 MON89788 及检测方法。

[0007] 先前尚未披露具有本文中所公开的特定事件的 AAD-12 大豆。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及具有以保藏号 PTA-10442 保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 的种子的称作 DAS-68416-4 的 AAD-12 大豆 (*Glycine max*) 事件,及其衍生的后代。本发明的其它方面包括大豆事件 DAS-68416-4 的后代植物、大豆、种子、和/或植物的可再生部分及种子和后代,以及自其任一种制成的食物或饲料产品。本发明还包括大豆事件 DAS-68416-4 的植物部分,其包括但不限于花粉、胚珠、花、枝条、根、和叶及营养细胞、花粉细胞、和卵细胞的细胞核。本发明进一步涉及对苯氧基生长素和/或芳氧基链烷酸酯除草剂 (无论那些除草剂是否对大豆植物过多 (over-the-top) 应用,对邻近或附近的土壤、或对邻近或附近的杂草应用) 具有耐受性的大豆植物、大豆事件 DAS-68416-4 的新遗传组成、和包含大豆事件 DAS-68416-4 的大豆植物的农艺学性能方面。

[0010] 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的 aad-12 转化事件,其包含插入大豆细胞基因组内的特定定位点中的多核苷酸序列,如本文中所描述的。

[0011] 在一些实施方案中,所述事件 / 多核苷酸序列可以与其它性状,包括例如其它除草剂耐受性基因和 / 或昆虫抑制性蛋白“叠加”。然而,本发明包括具有单一事件的植物,如本文中所描述的。在本发明的一个具体的实施方案中,为了控制各种除草剂抗性杂草(例如,草甘膦抗性杂草),将一种或多种除草剂耐受性性状与大豆事件 DAS-68416-4 叠加。

[0012] 另外,本发明提供了用于检测(例如大豆)样品中的主题事件的存在性的测定法。该测定法可以基于插入大豆基因组中的重组构建体的 DNA 序列及基于在插入位点侧翼的基因组序列。还提供了可用于进行该测定法的试剂盒和条件。

[0013] 如此,本发明部分涉及整个 aad-12 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。基于这些插入和边界序列,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 扩增子来鉴定这些事件。如此,可以使用这些和其它相关规程来唯一地鉴定包含本发明的事件的大豆系。

[0014] 更具体地,本发明涉及如下各项:

[0015] 1. 一种包含基因组的转基因大豆植物,所述基因组包含 SEQ ID NO:1。

[0016] 2. 一种包含基因组的大豆种子,所述基因组包含 AAD-12 事件 pDAB4468-0416,如存在于以登录号 PTA-10442 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的代表性种子中的。

[0017] 3. 一种包含基因组的大豆种子,所述基因组包含 SEQ ID NO:1。

[0018] 4. 通过种植项 2 的种子生成的大豆植物,所述植物包含 SEQ ID NO:1。

[0019] 5. 项 4 的大豆植物的后代植物,所述后代植物包含 AAD-12 事件 pDAB4468-0416。

[0020] 6. 项 1 的大豆植物的除草剂耐受性后代植物,所述后代植物包含 SEQ ID NO:1。

[0021] 7. 一种转基因大豆植物,其包含位于染色体 4 上在 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的 SNP 标志物间的大豆染色体靶位点中的转基因插入物,其中所述靶位点包含异源核酸。

[0022] 8. 一种制备转基因大豆植物的方法,包括在染色体 4 上在 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的 SNP 标志物间的位置插入异源核酸,其中所述靶位点包含异源核酸。

[0023] 9. 项 4 的植物的一部分,其中所述一部分选自下组:花粉、胚珠、花、圆荚、棉绒、枝条、根、和叶,所述一部分包含 SEQ ID NO:1。

[0024] 10. 一种包含转基因插入物的转基因大豆植物,所述转基因插入物在选自下组的基因组序列中或者侧翼有选自下组的基因组序列:SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 和 SEQ ID NO:1 的残基 9122-10, 212。

[0025] 11. 一种分离的多核苷酸分子,其中所述分子包含至少 15 个核苷酸,并且在严格清洗条件下维持与选自下组的核酸序列杂交:SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 和 SEQ ID NO:1 的残基 9122-10, 212。

[0026] 12. 一种分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:2-28。

[0027] 13. 一种分离的多核苷酸,其在严格清洗条件下与选自下组的核苷酸序列杂交:SEQ ID NO:1 的残基 2720 至 2740、SEQ ID NO:1 的残基 9112 至 9132 及其互补物。

[0028] 14. 项 13 的多核苷酸,其中所述多核苷酸是通过聚合酶链式反应生成的扩增子。

- [0029] 15. 一种包含 SEQ ID NO:1 的多核苷酸。
- [0030] 16. 一种生成项 15 的多核苷酸的方法。
- [0031] 17. 一种将转基因插入大豆基因组的 DNA 区段中的方法,所述 DNA 区段包含含有 SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 的 5' 端和含有 SEQ ID NO:1 的残基 9122-10,212 的 3' 端。
- [0032] 18. 一种育种大豆植物的方法,所述方法包括将包含 SEQ ID NO:1 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的 SEQ ID NO:1 的存在。
- [0033] 19. 一种将除草剂耐受性性状基因渗入大豆植物中的方法,所述方法包括将包含 SEQ ID NO:1 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的 SEQ ID NO:1 的存在。
- [0034] 20. 一种控制杂草的方法,所述方法包括对田间施用芳氧基链烷酸酯除草剂,所述田间包含项 1 的植物。
- [0035] 21. 项 20 的方法,其中所述除草剂选自下组:2,4-D;2,4-DB;MCPA;和 MCPB。
- [0036] 22. 项 20 的方法,其中所述方法包括对所述田间施用第二除草剂。
- [0037] 23. 项 22 的方法,其中所述第二除草剂选自下组:草甘膦和麦草畏。
- [0038] 24. 一种控制杂草的方法,所述方法包括对田间施用芳氧基链烷酸酯除草剂,并且在施用所述除草剂的 14 天内,在所述田间中种植项 3 的种子。
- [0039] 25. 一种在包含大豆 DNA 的样品中检测大豆事件的方法,其中所述方法包括使所述样品与在 AAD-12 事件 pDAB4468-0416 方面诊断性的至少一种多核苷酸接触,所述 AAD-12 事件 pDAB4468-0416 如存在于以保藏号 PTA-10442 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的代表性种子中的。
- [0040] 26. 项 25 的方法,其中所述方法包括使所述样品与下列各项接触
- [0041] a. 第一引物,其结合选自下组的侧翼序列:SEQ ID NO:1 的残基 1-2730、SEQ ID NO:1 的残基 9122-10,212 及其互补物;和
- [0042] b. 第二引物,其结合包含 SEQ ID NO:1 的残基 2731-9121 或其互补物的插入序列;
- [0043] 将所述样品进行聚合酶链式反应;并测定所述引物间生成的扩增子。
- [0044] 27. 项 26 的方法,其中所述引物选自下组:SEQ ID NO:2-7。
- [0045] 28. 项 25 的方法,其中所述多核苷酸包含至少 30 个核苷酸,并且在严格条件下与选自下组的序列杂交:SEQ ID NO:1 的残基 2720 至 2740、SEQ ID NO:1 的残基 9112 至 9132 及其互补物;其中所述方法进一步包括将所述样品和所述多核苷酸进行严格杂交条件;并对所述样品测定所述多核苷酸与所述 DNA 的杂交。
- [0046] 29. 一种 DNA 检测试剂盒,其包含依照项 27 的第一引物和第二引物。
- [0047] 30. 一种 DNA 检测试剂盒,其用于实施项 28 的方法。
- [0048] 31. 一种包含多核苷酸的 DNA 检测试剂盒,其中所述多核苷酸包含至少 30 个核苷酸,并且在严格条件下与选自下组的序列杂交:SEQ ID NO:1 的残基 2720 至 2740、SEQ ID NO:1 的残基 9112 至 9132 及其互补物。
- [0049] 32. 项 20 的方法,其中使用所述方法来处理或预防除草剂抗性杂草。
- [0050] 33. 项 20 的方法,其中在种植所述植物前施用所述除草剂。
- [0051] 34. 一种在包含项 1 的至少一种植物的地区控制草甘膦抗性杂草的方法,其中所

述植物进一步包含草甘膦耐受性性状,且所述方法包括对所述地区的至少一部分施用芳氧基链烷酸酯除草剂。

[0052] 35. 项 34 的方法,其中所述除草剂是苯氧基生长素。

[0053] 36. 项 34 的方法,其中自具有草甘膦的罐混合物施用所述除草剂。

[0054] 37. 项 20 的方法,其中至少一种所述杂草是与所述植物不同种的草甘膦抗性自生植物。

[0055] 附图简述

[0056] 图 1 含有 aad-12 和 pat 表达盒的 pDAB4468 的质粒图。

[0057] 图 2 显示了大豆事件的基因组 DNA 的图,其中将 DAS-68416-4 用 EcoRV 或 Pvu II 消化,并用于生成相应的 GENOMEWALKER™文库,其作为模板用于扩增靶 DNA 序列。

[0058] 图 3 显示用于自 5' 至 3' 边界对大豆事件 DAS-68416-4 进行全长测序的引物位置和克隆策略。描绘了用于确认大豆事件 DAS-68416-4 从 5' 至 3' 边界的全长序列的引物位置。

[0059] 图 4 描绘了用于确认大豆事件 DAS-68416-4 从 5' 至 3' 边界的全长序列的引物位置。

[0060] 图 5 描绘了用于确认 AAD-12 大豆事件 DAS-68416-4 的插入位点序列的引物位置。

[0061] 图 6 显示了遍及整个植物生命周期的表达水平。

[0062] 表的简述

[0063] 表 1 提供了就事件 DAS-68416-4 的插入和侧翼序列 SEQ ID NO:1 而言的残基编号方式。

[0064] 表 2 提供了在 Southern 分析中使用的探针的位置和长度。

[0065] 表 3 提供了在 Southern 印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。

[0066] 表 4 提供了用于对大豆事件 DAS-68416-4 进行基因组步行 (walking) 以扩增侧翼边界区的条件。

[0067] 表 5 提供了用于大豆事件 DAS-68416-4 中的边界区和事件特异性序列的标准 PCR 扩增的条件。

[0068] 表 6 提供了关于 T 链插入物的扩增子 1-4 的引物描述。

[0069] 表 7 提供了用于大豆事件 DAS-68416-4 中的边界区和事件特异性序列的标准 PCR 扩增的 PCR 混合物。

[0070] 表 8 提供了自美国和加拿大在 2008 年期间生成的大豆事件 DAS-68416-4 收集的的组织中的 AAD-12 蛋白水平汇总。

[0071] 表 9 提供了用于 Southern 分析的探针的位置和长度。

[0072] 表 10 提供了 Southern 印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。

[0073] 表 11 提供了实验 1 中评估的农艺学参数。

[0074] 表 12 提供了对来自实验 1 的工艺学特征的分析。

[0075] 表 13 提供了在 2009 年的农艺学和田间试验中收集的数据。

[0076] 表 14 提供了位置间的 2009 年农艺学特征结果的汇总。

[0077] 表 15 提供了对来自实验 1 的发病率和昆虫损害的分析。

[0078] 表 16 提供了在 DAS-68416-4 和常规大豆试验中观察到的疾病和昆虫应激源

(stressor)。

[0079] 表 17 提供了在温暖和寒冷条件下萌发大豆事件 DAS-68416-4 种子。

[0080] 表 18 提供了对大豆饲料的近似、纤维和矿物分析的汇总。

[0081] 表 19 提供了对大豆粒的近似和纤维分析的汇总。

[0082] 表 20 提供了对大豆粒的矿物分析的汇总。

[0083] 表 21 提供了对大豆粒的氨基酸分析的汇总。

[0084] 表 22 提供了对大豆粒的脂肪酸分析的汇总。

[0085] 表 23 提供了对大豆粒的维生素分析的汇总。

[0086] 表 24 提供了对大豆粒 (grain) 的异黄酮分析的汇总。

[0087] 表 25 提供了对大豆粒的抗营养物 (抗营养物) 分析的汇总。

[0088] 表 26 提供了关于 2, 4-D 出土前 (preemergence) 耐受性试验的位置和处理信息。

[0089] 表 27 显示了对 2, 4-D 的出土前应用的 DAS-68416-4 大豆耐受性。

[0090] 序列简述

[0091] SEQ ID NO:1 提供了主题大豆事件 DAS-68416-4 的插入物和侧翼序列。

[0092] SEQ ID NO:2-28 是如本文中所描述的引物。

[0093] SEQ ID NO:29 和 30 是侧翼 SNP 标志物 BARC-019093-03299 和 BARC-044607-08736, 如本文中所描述的。

[0094] 发明详述

[0095] 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 (大豆) 的新转化事件, 其包含插入大豆细胞基因组内的特定定位点中的主题 aad-12 多核苷酸序列, 如本文中所描述的。在一些实施方案中, 例如, 所述多核苷酸序列可以与其它性状 (诸如其它除草剂耐受性基因和 / 或编码昆虫抑制性蛋白的基因) “叠加”。然而, 本发明包括具有单一事件的植物, 如本文中所描述的。

[0096] 另外, 本发明提供了用于检测样品中的主题事件的存在性的测定法。本发明的各方面包括设计和 / 或生成本文中例示或提示的任何诊断核酸分子, 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。

[0097] 更具体地, 本发明部分涉及转基因大豆事件 DAS-68416-4、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且提示的序列来检测本发明的植物系。

[0098] 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, 包括用于检测所述事件的方法, 并且例如对于遵守要求上市前批准的规则及标记源自例如重组作物植物的食品是有帮助的。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 杂交来检测主题事件的存在。事件特异性 PCR 测定法例如由 Windels 等 (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999) 讨论。这涉及使用跨越插入与侧翼 DNA 间的连接的引物组通过 PCR 来鉴定草甘膦耐受性大豆事件 40-3-2。更具体地, 一条引物包含来自插入物的序列, 而第二条引物包含来自侧翼 DNA 的序列。

[0099] 通过对编码芳氧基链烷酸酯加双氧酶 (AAD-12) 蛋白的 aad-12 基因 (源自食酸戴尔福特菌) 的插入来修饰大豆。该性状赋予对 2, 4-二氯苯氧基乙酸和吡啶基氧基乙酸酯

除草剂的耐受性,并且可以在植物转化期间及在育种圃中作为选择标志物使用。

[0100] 更具体地,本文中描述了 AAD12 事件 pDAB4468-0416 及其在世代间在全植物和分子水平的稳定性和表达方面的选择和表征。

[0101] 依照本发明使用的主题合成基因 (aad-12) 源自食酸戴尔福特菌,并且编码能够使具有芳氧基链烷酸酯模块的几种除草剂,包括苯氧基生长素(例如 2,4-D, MCPA)及吡啶基氧基生长素(例如氟草烟(fluroxypyr)、定草酯(triclopyr))灭活的酶。经由根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)技术来将 aad-12 基因(由 atUbi10 启动子驱动)导入大豆系 Maverick 中。将转基因 T0 植物自花传粉 4-6 代。平行地,还将 aad-12 基因基因渗入良种大豆品种中。在含有的且受调节的田间苗圃和实验室背景中对所有转基因事件表征 4-5 个世代。

[0102] 已经对事件 pDAB4468-0416 插入物的两个末端测序并表征。开发出事件特异性测定法。还已经将其定位至大豆基因组(大豆染色体 4)上;侧翼 SNP 标志物在本文中称为 SEQ ID NO:29 和 30。将事件基因渗入别的良种系中。事件提供针对 2,4-D 和草丁磷(glufosinate)的耐受性。

[0103] 由 atUbi10 启动子驱动,经由根癌土壤杆菌技术产生超过 100 个 AAD12T1Maverick 大豆事件。经由 5 个自花传粉世代和几次回交世代的单个谱系选择来选择事件 pDAB4468-0416。它在形态学上是正常的,并且遍及每个自花传粉世代在 V3 时耐受 2240g ae/ha 2,4-D 喷雾。该事件以单一显性基因(dominated gene)遗传,并且在自花传粉世代和回交世代中也具有正常的孟德尔分离。

[0104] 发现了事件 pDAB4468-0416 与全长植物转录单元(PTU)具有单一整合。自载体主链没有发现抗生素抗性基因序列,并且在 aad-12 基因纯合和半合子状态遍及几个世代没有检出基因沉默。aad-12 基因以预期的水平表达,这导致 2,4-D 耐受性水平。所述事件遍及整个世代及在给定世代内的同胞谱系中稳定表达 aad-12 基因。

[0105] 如上文在背景部分中暗示的,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,表述的给定插入的名称“事件”)。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连接区的 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。

[0106] 因为“事件”最初是随机事件,所以作为本公开内容的一部分,包含该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(但是受限于专利权)可获得。保藏物已经称为 ATCC 保藏号 PTA-10442。25 个小瓶的大豆种子(AAD-12 事件 pDAB4468-0416)以 Dow AgroSciences LLC 的名义于 2009 年 10 月 22 日保藏。保藏物在 2009 年 11 月 2 日进行测试,并且在该日期,种子是能活的。生成此保藏物,并且会依照布达佩斯条约为了专利规程的目的就种子保藏物而言的条款及在该条款下维持。保藏物会无限地在 ATCC 储藏所(其是一所公共储藏所)维持一段 30 年的时间或者最近请求后五年或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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 如本文中所使用的,术语“后代”意指包含 AAD-12 大豆事件 DAS-68416-4 的亲本植物的任何世代的后代。

[0110] 转基因“事件”如下产生,即用异源 DNA,即包含感兴趣转基因的核酸构建体转化植物细胞、源自转基因插入植物基因组的植物群体的再生、并选择以插入特定的基因组位置中为特征的特定植物。术语“事件”指包含异源 DNA 的初始转化体和转化体的后代。术语“事件”也指通过转化体和包含基因组 / 转基因 DNA 的另一品种间的有性异型杂交产生的后代。即使在对回归亲本进行重复回交后,插入的转基因 DNA 和来自所转化亲本的侧翼基因组 DNA (基因组 / 转基因 DNA) 在杂交后代中也存在于相同的染色体位置。术语“事件”也指来自初始转化体及其后代的 DNA,该 DNA 包含插入的 DNA 和紧邻插入 DNA 的侧翼基因组序列,由于包含所插入 DNA 的亲本系(例如初始转化体和自交后代)和不含所插入 DNA 的亲本系间的有性杂交,可以预期该 DNA 会转移到接受包含感兴趣转基因在内的插入 DNA 的后代中。

[0111] “连接序列”跨越插入基因组中的 DNA 与在插入点侧翼的大豆天然基因组的 DNA 连接的点,在植物遗传物质中鉴定或检测出一个或另一个连接序列便足以诊断该事件。包括跨越本文中所描述的大豆事件中的插入物和类似长度的侧翼 DNA 的 DNA 序列。本文中提供了此类诊断序列的具体例子;然而,与各插入物的连接,或插入物与基因组序列的连接重叠的其它序列也是诊断性的,并且可以依照本发明使用。

[0112] 本发明涉及此类侧翼、连接、和插入序列的鉴定。本发明中包括相关的 PCR 引物和扩增子。依照本发明,可以使用 PCR 分析方法检测或鉴定源自主题专利转基因大豆系的商业化转基因大豆品种或系,所述 PCR 分析方法使用跨越整个插入 DNA 及其边界的扩增子。

[0113] 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侧翼序列加插入序列的序列。

[0114] 这些插入物之每种的整个序列及相应侧翼序列的部分在本文中以 SEQ ID NO:1 提供。下文表 1 中印刷了就 SEQ ID NO:1 (总共 10,212 个碱基对)而言的此事件的插入和侧翼序列的坐标。例如,这在实施例 3 中更为详细地讨论。

[0115] 表 1:事件 DAS-68416-4 的插入和侧翼序列的残基编号方式(就 SEQ ID NO:1 而

言)。

[0116]

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

[0117] 这些序列(尤其是侧翼序列)是独特的。基于这些插入和边界序列,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。

[0118] 本发明的检测技术特别可用于与植物育种联合,以测定在将包含感兴趣事件的亲本植物与致力于在后代中赋予一种或多种额外的感兴趣性状的另一植物系杂交后,哪些后代植物包含给定的事件。这些 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。

[0119] 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谱系数据。

[0120] 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)。

[0121] 根据全部的本公开内容,应当清楚的是,本发明包括以 ATCC 保藏号 PTA-10442 可获得的种子。本发明还包括自以保藏号 PTA-10442 保藏于 ATCC 的种子种植的除草剂抗性大豆植物。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。

[0122] 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 DNA 连接序列的基因组,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。

[0123] 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。

[0124] 可以如下育种除草剂耐受性大豆植物,即首先将由自本文中提及的任一种系的种子种植的大豆植物组成的第一亲本大豆植物与第二亲本大豆植物有性杂交,由此生成多个第一后代植物,然后选出对除草剂有抗性(或拥有本发明的至少一个事件)的第一后代植

物；并自交第一后代植物，由此生成多个第二后代植物；然后自第二后代植物选出对除草剂有抗性（或拥有本发明的至少一个事件）的第二后代植物。这些步骤可以进一步包括第一后代植物或第二后代植物与第二亲本大豆植物或第三亲本大豆植物的回交。然后，可以种植包含本发明的大豆种子的大豆作物或其后代。

[0125] 还应当理解，也可以将两种不同转基因植物杂交以生成含有两个独立分离的添加的外源基因的后代。合适后代的自交可以生成在这两种添加的外源基因方面纯合的植物。因为是无性繁殖，所以也涵盖与亲本植物回交和与非转基因植物的异型杂交。通常用于不同形状和作物的其它育种方法是本领域中已知的。已经使用回交育种来将简单遗传的、高度可遗传性状的基因转移入期望的纯合栽培种或近交系（其作为回归亲本）中。要转移的性状的来源称作供体亲本。预期所得的植物具有回归亲本（例如栽培种）的属性和自供体亲本转移的期望的性状。在初始杂交后，将拥有供体亲本表型的个体选出并与回归亲本重复杂交（回交）。预期所得的亲本具有回归亲本（例如栽培种）的属性和自供体亲本转移的期望的性状。

[0126] 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。

[0127] 本发明的方法包括一种生成除草剂耐受性大豆植物的方法，其中所述方法包括用本发明的植物育种。更具体地，所述方法可以包括杂交本发明的两种植物，或本发明的一种植物和任何其它植物。优选的方法进一步包括通过分析依照本发明可检出的事件的所述后代来选择所述杂交的后代。例如，可以经由与包含其它期望的性状，诸如农艺学性状诸如那些在本文中在多个实施例中测试的性状的植物的育种循环使用本发明来追踪主题事件。例如，可以将包含主题事件和期望性状的植物检出，鉴定，选出，并在进一步的育种轮次中快速使用。也可以经由育种来组合主题事件 / 性状，并用昆虫抗性性状和 / 或用别的除草剂耐受性性状依照本发明追踪。后一种的一种优选的实施方案是包含与编码对除草剂麦草畏的抗性的基因组合的主题事件的植物。

[0128] 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 EPSPS、GOX、GAT）、草丁磷抗性（例如，Pat、bar）、乙酰乳酸合酶（ALS）抑制性除草剂抗性（例如，咪唑啉酮 [诸如咪草烟（imazethapyr）]、磺酰脲、三唑嘧啶磺酰苯胺、嘧啶基硫代苯甲酸（pyrimidinylthiobenzoate）、和其它化学品 [Csr1, SurA, 等]）、溴草腈（bromoxynil）抗性（例如 Bxn）、对 HPPD（4- 羟苯基 - 丙酮酸 - 加双氧酶）酶抑制剂的抗性、对八氢番茄红素去饱和酶（PDS）抑制剂的抗性、对光系统 II 抑制性除草剂（例如 psbA）的抗性、对光系统 I 抑制性除草剂的抗性、对原卟啉原氧化酶 IX（PPO）抑制性除草剂（例如 PPO-1）的抗性、对苯基脲除草剂（例如，CYP76B1）的抗性、麦草畏降解酶（见例如 US 20030135879）的性状组合，并且其它性状可以单独或以多种组合叠加以提供有效控制或预防杂草移动和 / 或对上述种类的任何除草剂的抗性的能力。

[0129] 关于其它除草剂,一些其它优选的 ALS(又称为 AHAS)抑制剂包括三唑嘧啶磺酰苯胺(诸如氯酯磺草胺(cloransulam-methyl)、双氯磺草胺(diclosulam)、双氟磺草胺(florasulam)、唑嘧磺草胺(flumetsulam)、甲氧磺草胺(metosulam)、和五氟磺草胺(penoxsulam))、嘧啶基硫代苯甲酸(诸如双草醚(bispyribac)和嘧草硫醚(pyriithiobac))、和氟酮磺隆(flucarbazone)。一些优选的 HPPD 抑制剂包括甲基磺草酮(mesotrione)、异口恶唑草酮(isoxaflutole)、和磺草酮(sulcotrione)。一些优选的 PPO 抑制剂包括氟烯草酸(flumiclorac)、丙炔氟草胺(flumioxazin)、吡嗪氟草酯(flufenpyr)、吡草醚(pyraflufen)、噻草酸(fluthiacet)、氟丙嘧草酯(butafenacil)、唑酮草酯(carfentrazone)、甲磺草胺(sulfentrazone)、和二苯醚(diphenylether)(诸如三氟羧草醚(acifluorfen)、氟磺胺草醚(fomesafen)、乳氟乐草灵(lactofen)、和乙氧氟草醚(oxyfluorfen))。

[0130] 另外,单独的或与一种或多种其它 HTC 性状叠加的 AAD-12 可以与一种或多种其它输入(例如,昆虫抗性、真菌抗性、或应激耐受性等)或输出(例如,增加的产率、改善的油概况、改善的纤维质量等)性状叠加。如此,可以使用本发明来提供具有灵活地且成本有效地控制许多农艺学害虫的能力的改善的作物质量的完整农艺学包装。

[0131] 主题 AAD-12 酶实现转基因表达,导致对会控制几乎所有阔叶和禾本科杂草的除草剂组合的耐受性。例如,AAD-12 可以充当卓越的除草剂耐受性作物(HTC)性状以与其它 HTC 性状(例如,草甘膦抗性、草丁磷抗性、咪唑啉酮抗性、溴草腈抗性等)、和昆虫抗性性状(Cry1F、Cry1Ab、Cry 34/45 等)叠加。另外,AAD-12 可以充当选择标志来帮助选择用第二基因或基因的组遗传工程化改造的植物的初级转化体。

[0132] 本发明的 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。它们在易感的植物内通过 β -氧化被转化成其相应的酸形式,并且它是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,随后通过 AAD-12 保护能够快速 β -氧化并且可以将丁酸除草剂转化成乙酸形式的植物。

[0133] 应用除草剂的方法是本领域中已知的。此类应用可以包括超过一种除草剂的罐混合物。依照本发明使用的一些优选的除草剂包括苯氧基生长素除草剂诸如 2,4-D ; 2,4-DB ; MCPA ; MCPB。这些可以与一种或多种其它除草剂耐受性基因和相应的除草剂(例如草甘膦和 / 或草丁磷)叠加。可以有利的组合使用 1、2、3 或更多种除草剂,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的 14 天内。也可以在种植时和 / 或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)或对杂草和 / 或本发明的转基因植物过多应用。可以将主题除草剂轮换或组合使用以例如,控制或预防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。本发明还提供了用于控制 AAD-12 自生植物植物的方法。见同时提交的 PCT 申请,题目为“CONTROL OF AAD DICOT VOLUNTEERS IN MONOCOT CROPS”。

[0134] 本发明的 HTC 性状可以与其它 HTC 性状（包括但不限于草甘膦耐受性）以新的组合使用。这些性状组合产生控制杂草（等）物种的新方法，这是由于最近需要的对除草剂（例如草甘膦）的抗性或固有耐受性。如此，在 HTC 性状外，使用除草剂（对于该除草剂，通过转基因作物中的所述酶来创建除草剂耐受性）来控制杂草的新方法在本发明的范围内。

[0135] 另外，全世界种植的草甘膦耐受性作物是普遍的。与其它草甘膦耐受性作物轮作多次，草甘膦抗性自生植物的控制在轮作作物中可能是困难的。如此，对作物个别叠加或转化的主题转基因性状的使用提供了一种用于控制其它 HTC 自生植物作物的工具。

[0136] 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（见上文表 1）而言鉴定的。此外，SEQ ID NO:1 包括初始转化体中插入的异源 DNA 和刚好与插入 DNA 相邻的例示性侧翼基因组序列。可以预期所有或部分的这些侧翼序列被转移到由于包含该事件的亲本系的有性杂交而接受插入 DNA 的后代。

[0137] 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。

[0138] 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：

[0139] 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”）：

[0140] (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；

[0141] (ii) 它与初始品种明显可区别；并且

[0142] (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。

[0143] UPOV 国家组织第六次会议（Sixth Meeting with International Organizations），1992 年 10 月 30 日；文件由联盟办公室制备。

[0144] 如本文中所使用的，“系”指一组在至少一种性状上个体之间展现出很少或没有遗传变异的植物。所述系可以通过几个世代的自花传粉和选择、或者使用组织或细胞培养技术自单一亲本进行营养繁殖来产生。

[0145] 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。

[0146] “稳定性”或“稳定的”就给定的组分而言意指组分在世代间且优选地至少三个世代以基本上相同的水平得到维持，例如优选地 $\pm 15\%$ ，更优选地 $\pm 10\%$ ，最优选地 $\pm 5\%$ 。稳定性可以受到温度、位置、应激和种植时间影响。在田间条件下比较随后的世代应当以相似的方式生成组分。

[0147] “商业效用”定义为具有良好的植物活力和高能育性，使得农民可以使用常规的耕作设备生产作物，并且可以使用常规的破碎和提取设备自种子提取具有所描述组分的油。

为了在商业上有用,产率(如通过每英亩生产的种子重量、油含量、和总油量测量的)在相同地区种植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。

[0148] “农艺学良种”意指在由主题事件所致的昆虫抗性外,系具有期望的农艺学特征,诸如产率、成熟度、疾病抗性等。在包含本发明的事件的植物中个别或以任意组合采用的农艺学性状(如下文实施例中所列的)在本发明的范围内。可以使用任何和所有这些农艺学特征和数据点来作为用于限定此类植物的一系列特征的点或在该一系列特征的任一末端或两个末端鉴定此类植物。

[0149] 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“连接序列”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连接序列(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)连接序列的扩增子,如上文所指示的。

[0150] 在侧翼序列中“降落”的引物通常不设计为超出约200个碱基或超出连接杂交。如此,典型的侧翼引物会设计为包含进入侧翼序列中的距离插入物开始200个碱基内的任一条链的至少15个碱基。也就是说,包含自SEQ ID NO:1的残基约2530-2730和/或约9122-9322(或与其杂交)的合适大小的序列的引物在本发明的范围内。同样地,插入引物可以在插入物上的任何地方设计,但是例如可以不仅为此类引物设计使用残基约2731-2931和约8921-9121。

[0151] 本领域技术人员还会认可,引物和探针可以设计为在一系列标准的杂交和/或PCR条件下与SEQ ID NO:1(或其互补物)的区段及其互补物杂交,其中引物或探针与例示的序列不完全互补。也就是说,可以容忍一定程度的错配。对于约20个核苷酸的引物,例如,若错配碱基是内部的或在扩增子相反的引物末端,则通常1或2个左右的核苷酸不需要与相反链结合。下文提供了各种合适的杂交条件。也可以在探针中使用合成的核苷酸类似物诸如肌苷。也可以使用肽核酸(PNA)探针及DNA和RNA探针。重要的是此类探针和引物诊断(能够独特地鉴定并区别)本发明事件的存在。

[0152] 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微小的差别不是罕见的。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。

[0153] 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。

[0154] “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。

[0155] 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/基因组插入区连接序列(在SEQ ID NO:1的残基2730-2731和9121-9122间)、其区段、和例示序列的互补物及其任何区段。插入区连接序列跨越插入基因组中的异源DNA与来自在插入位点侧翼的来自大豆细胞的DNA间的连接。此类序列可以诊断给定的事件。

[0156] 基于这些插入和边界序列,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。

[0157] 在一些实施方案中,包含新的转基因/基因组插入区域的连续片段的DNA序列是本发明的一方面。包括包含足够长度的转基因插入序列多核苷酸和足够长度的来自一种或多种上述三种大豆植物的大豆基因组序列的多核苷酸的DNA序列,和/或用作生成对于这些大豆植物中的一种或多种诊断性的扩增子产物的引物序列的序列。

[0158] 相关实施方案属于如下的DNA序列,其包含本文中鉴定的DNA序列(诸如SEQ ID NO:1及其区段)或其互补物的转基因部分的至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25或更多个连续核苷酸,和来自这些序列或其互补物的侧翼大豆DNA序列的相似长度。此类序列可用作DNA扩增方法中的DNA引物。使用这些引物生成的扩增子诊断本文中提及的任何大豆事件。因此,本发明还包括通过此类DNA引物和同源引物生成的扩增子。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 在又一些实施方案中,本发明包括生成包含本发明的AAD-12事件的大豆植物的方法,其中所述方法包括下列步骤:(a)将第一亲本大豆系(包含本发明的表达盒,其对所述系的植物赋予所述除草剂抗性性状)和第二亲本大豆系(其缺乏此除草剂耐受性性状)有性杂交,由此生成多个后代植物;并(b)通过使用分子标志物来选择后代植物。任选地,此类方法可以包括将后代植物与第二亲本大豆系回交以生成包含所述昆虫耐受性性状的真实育种大豆植物的进一步的步骤。

[0162] 依照本发明的另一方面,提供了测定与所述三种事件中的任一种(或多种)杂交的后代的接合性的方法。所述方法可以包括使样品(包含大豆DNA)与本发明的引物组接触。所述引物在与来自至少一个所述大豆事件的基因组DNA的核酸扩增反应中使用生成诊断至少一个所述大豆事件的第一扩增子。此类方法进一步包括实施核酸扩增反应,由此

生成第一扩增子；检测第一扩增子；并使包含大豆 DNA 的样品与所述引物组（所述引物组在与来自大豆植物的基因组 DNA 的核酸扩增反应中使用生成第二扩增子，其包含与大豆基因组区同源的天然大豆基因组 DNA）接触；并实施核酸扩增反应，由此生成第二扩增子。该方法进一步包括检测第二扩增子，并比较样品中的第一和第二扩增子，其中这两种扩增子的存在指示样品在转基因插入物方面是杂合的。

[0163] 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引物在 DNA 杂交方法中使用。试剂盒还可以含有实施检测方法必需的试剂和材料。

[0164] “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。

[0165] “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。

[0166] 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。

[0167] 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 1-3 卷, Sambrook 等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989。PCR 引物对可以源自已知的序列, 例如, 通过使用意图出于所述目的的计算程序来进行。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] 如本文中所使用的, 基本上同源的序列是如下的核酸序列, 其会在高严格性条件下与其比较的核酸序列的互补物特异性杂交。术语“严格条件”就通过 Sambrook 等, 1989, 于 9.52-9.55 讨论的特定杂交规程实现的核酸探针与靶核酸 (即, 与感兴趣的特定核酸序列) 杂交而言进行功能限定。还可见 Sambrook 等, 1989, 于 9.47-9.52 和 9.56-9.58。因而, 可以使用本发明的核苷酸序列来实现其与 DNA 片段的互补区段选择性形成双链体分子的能力。

[0171] 根据想象的应用, 可以使用不同杂交条件来实现探针对靶序列的不同程度的选择性。对于需要高灵敏性的应用, 通常会采用相对严格的条件来形成杂合物, 例如会选择相对较低的盐和 / 或高温的条件, 诸如通过约 0.02M 至约 0.15M NaCl 于约 50°C 至约 70°C 的温度提供。例如, 严格条件可以牵涉用高严格性清洗缓冲液 (0.2X SSC, 0.1% SDS, 65°C)

将杂交滤膜清洗至少两次。促进 DNA 杂交的适当严格性条件,例如,6.0X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 于约 45℃,接着于 50℃用 2.0X SSC 清洗是本领域技术人员已知的。例如,可以自约 2.0X SSC 于 50℃的低严格性至约 0.2X 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。此类选择性条件耐受 (tolerate) 很少的 (若有的话) 探针与模板或靶链间的错配。经由杂交检测 DNA 序列是本领域普通技术人员公知的,并且美国专利 Nos. 4,965,188 和 5,176,995 的教导是杂交分析方法例示性的。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] 关于使用特定扩增引物对来扩增靶核酸序列 (例如通过 PCR 进行),“严格条件”指容许引物对仅与如下的靶核酸序列杂交,并且优选地生成独特的扩增产物,即扩增子的条件,所述靶核酸序列会与具有相应的野生型序列 (或其互补物) 的引物结合。

[0175] 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。

[0176] 如本文中所使用的,“扩增 DNA”或“扩增子”指作为核酸模板一部分的靶核酸序列的核酸扩增产物。例如,为了测定源自有性杂交的大豆植物是否含有来自本发明大豆植物的转基因事件基因组 DNA,可以使用引物对将自大豆植物组织样品提取的 DNA 进行核酸扩增方法,所述引物对包括源自植物基因组中在插入异源 DNA 的插入位点附近的侧翼序列的引物,和源自插入异源 DNA 的第二引物以生成诊断事件 DNA 存在的扩增子。扩增子具有一定的长度,并且具有也是事件诊断性的序列。扩增子的长度范围可以为引物对加一个核苷酸碱基对的组合长度和 / 或引物对加约 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 2

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

[0177] 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。

[0178] 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。

[0179] 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 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、荧光

素酶、腺苷三磷酸双磷酸酶、腺苷 5' 磷硫酸 (phosphosulfate) 和萤光素的情况中温育。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。

[0180] 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。

[0181] 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 连接重叠。在存在耐热性聚合酶和 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。

[0182] 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 连接重叠。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。在存在耐热性聚合酶和 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。

[0183] 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 插入物的大豆种子和 / 或大豆植物。一个选项是用不同插入物替换本文中例示的 aad-12 插入物。一般在这些方面, 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, WO 03/080809A2 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, 其包含侧翼有所有或可识别部分的本文中所鉴定侧翼序列 (例如 SEQ ID NO:1 的残基 1-2730 和 9122-10, 212) 的异源插入物 (替换或具有多个拷贝的 aad-12)。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 aad-12 基因以实现插入。

[0184] 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. 2009/0111188 A1 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. WO2008/021207 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 USA 93(1996) 第 5055-5060 页。

[0185] 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 155-159 页)。此外,已经在几种原核和高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)。

[0186] 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。

[0187] 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,如记载于美国临时专利申请 No. 61/297,628 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。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) 的无意改变的能力。

[0188] 本发明在本文中公开了大豆基因组中的染色体 4 上对于插入异源核酸卓越的特定定位点。还公开了 5' 分子标志物、3' 分子标志物、5' 侧翼序列、和 3' 侧翼序列,其可用于鉴定染色体 4 上的靶定位点的位置。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切除和 / 或替代不同插入物,替换本文中例示的 pat 表达盒。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。

[0189] 如本文中所使用的,基因、事件或性状“叠加”指将期望的性状组成入一个转基因系中。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也可以认为是基因叠加。

[0190] “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”。

[0191] 通过提及而将本文中提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请、和出版物以它们不与本申请的明确教导矛盾的程度完整收入。

[0192] 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。

[0193] 除非另有指示,使用下列缩写。

[0194] AAD-12 芳氧基链烷酸酯加双氧酶 -1

[0195] bp 碱基对

[0196] °C 摄氏度

[0197] DNA 脱氧核糖核酸

[0198] DIG 洋地黄毒苷

[0199] EDTA 乙二胺四乙酸

[0200] kb 千碱基

[0201] μ g 微克

[0202] μ L 微升

[0203] mL 毫升

[0204] M 分子量

[0205] OLP 重叠探针

[0206] PCR 聚合酶链式反应

[0207] PTU 植物转录单元

[0208] SDS 十二烷基硫酸钠

[0209] SOP 标准的操作规程

[0210] SSC 含有氯化钠和柠檬酸钠混合物的缓冲溶液, pH 7.0

[0211] TBE 含有 Tris 碱、硼酸和 EDTA 混合物的缓冲溶液, pH 8.3

[0212] V 伏特

实施例

[0213] 实施例 1 :aad-12 大豆事件 DAS-68416-4 的转化和选择

[0214] 经由土壤杆菌属介导的大豆子叶节外植体转化生成转基因大豆(大豆)事件

DAS-68416-4。使用携带在 T 链 DNA 区内具有选择标志 (pat) 和感兴趣基因 (aad-12) 的二元载体 pDAB4468 (图 1) 的解除的 (disarmed) 土壤杆菌菌株 EHA101 (Hood 等, 2006) 来启动转化。

[0215] 使用 Zeng 等 (Zeng 等, 2004) 的改良规程来实施土壤杆菌属介导的转化。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。

[0216] 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, 用于确认选择标志基因和 / 或感兴趣的基因。容许 T_0 植物在温室中自体受精以生成 T_1 种子。

[0217] 将 T_1 植物回交, 并基因渗入良种种质 (Maverick) 中。自独立的经转化隔离区 (isolate) 生成此事件, 即大豆事件 DAS-68416-4。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, 包括在宽基因型背景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。以下实施例含有用于表征大豆事件 DAS-68416-4 的数据。

[0218] 实施例 2 : 经由 Southern 印迹的大豆事件 DAS-68416-4 表征

[0219] 使用 Southern 印迹分析来建立大豆事件 DAS-68418-4 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 转基因的整合和完整性。将大豆事件 DAS-68418-4 表征为全长的、简单的整合事件, 其含有来自质粒 pDAB4468 的 aad-12PTU 的单一拷贝。

[0220] Southern 印迹数据提示了插入大豆事件 DAS-68418-4 的基因组中的 pDAB4468T 链片段。使用对 aad-12 基因 (其包含在 pDAB4468 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 的连接片段 (边界片段)。自限制性酶和探针组合的 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-12PTU 的重排。

[0221] 实施例 2.1 : 大豆叶样品收集和基因组 DNA (gDNA) 分离

[0222] 从自含有大豆事件 DAS-68416-4 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 基因) 分离 gDNA。

[0223] 遵循标准的 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。

[0224] 实施例 2.2 : DNA 消化和分离

[0225] 对于大豆事件 DAS-68416-4 的 Southern 印迹分子表征, 将十微克 ($10 \mu\text{g}$) 基因组 DNA 消化。通过对每份 DNA 样品添加每 μg 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事件 DAS-68416-4 和非转基因大豆系 Maverick 的基因组 DNA。将每份样品于约 37℃ 温育过夜。个别使用限制性酶 SpeI、KpnI、和 PacI 以进行消化 (New England Biolabs, Ipswich, MA)。另外,通过组合质粒 DNA,即 pDAB4468 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 20ul 1X 上样缓冲液 (0.1% 溴酚蓝、100mM EDTA、50% 甘油、10mM Tris, pH 7.5) 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。用溴化乙锭 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 对凝胶染色,并在紫外 (UV) 光下显现 DNA。

[0226] 实施例 2.3 :Southern 转移和膜处理

[0227] 实施 Southern 印迹分析,如由 Severson 等 (1997) 所描述的。在电泳分离并在 UV 光下显现 DNA 片段后,将凝胶在变性溶液 (150mM NaOH, 3mM EDTA) 中浸没约 20 分钟,然后转移至中和溶液 (150mM NaPO₄, pH 7.8) 达至少 20 分钟。使用具有转移缓冲液 (25mM 焦磷酸钠, pH 10) 的芯吸 (wicking) 系统来将对尼龙膜 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 上的 Southern 转移实施过夜。在转移后,通过于 65℃ 将膜烘烤约 2 小时来将 DNA 与膜结合。此过程导致准备好杂交的 Southern 印迹膜。

[0228] 实施例 2.4 :DNA 探针标记和杂交

[0229] 使用经标记的探针来检测与尼龙膜结合的 DNA 片段。使用针对质粒 pDAB4468 的特定核苷酸区的引物通过 PCR 扩增来生成用于此实验的探针。将扩增的 PCR 片段分离,自琼脂糖凝胶纯化,并作为杂交探针的模板使用。使用 GE Healthcare READY-TO-GO™ DNA 标记珠 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 遵循制造商的用法说明书通过随机引发用 α³²P-特异性核苷酸标记 Southern 印迹杂交探针,并通过 PROBEQUANT™ G-50 微柱 (Amersham/Pharmacia, Piscataway, New Jersey, USA) 来纯化。表 2 中描述了描述用于此实验的探针的表。使用杂交缓冲液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 于 65℃ 实施预杂交 4 小时。然后,倒掉预杂交溶液,并用含有期望量的特异性探针的杂交溶液更换,所述特异性探针通过在水中煮沸 5 分钟来预变性。将杂交 / 探针混合物与尼龙膜于 65℃ 一起温育过夜。

[0230] 在杂交后,将膜于 65℃ 在清洗缓冲液 (10mM 磷酸钠、2.5mM 焦磷酸钠、0.5mM EDTA、0.1% SDS, 用磷酸将 pH 调节至 7.8) 中清洗 20 分钟 (三次)。将清洗的滤膜暴露于 Phosphorimager 屏以进行放射自显影术,并扫描图像。对探针记录检测条带的数目和大小。另外,使用分子量标志物来测定 Southern 印迹上的杂交片段大小。

[0231] 表 2 :Southern 分析中使用的探针的位置和长度。

[0232]

探针名称	遗传元件	pDAB4468 (bp) 上的位置	长度 (bp)
aad-12	aad-12	10118-10768	671

[0233] 实施例 2.5 :Southern 印迹结果

[0234] 表 3 中给出了基于 aad-12PTU 的已知限制性酶位点的用特定的消化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 pDAB4468 的质粒图 (图 1), 而观察到的

片段大小通过这些分析估计,并且基于经 $\alpha^{32}\text{P}$ - 标记的 DNA 分子量标志物 II 片段的指示大小。

[0235] 自这些消化和杂交鉴定两类片段:内部片段,其中已知酶位点在探针区侧翼,并且完全包含在 aad-12PTU 的插入区内,和边界片段,其中已知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 DAS-68416-4 的三个大豆世代完成的 Southern 印迹分析产生如下的数据,其提示了来自质粒 pDAB4468 的低拷贝、完整的 aad-12PTU 被插入大豆事件 DAS-68416-4 的大豆基因组中。

[0236] 表 3 :Southern 印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。

[0237]

DNA 探针	限制性酶		预期的片段大小(bp) ¹	观察到的片段大小(bp) ²
aad-12	SpeI	pDAB4468	12,154	12,154
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	>5,436 (边界)	约12,000
	KpnI	pDAB4468	12,154	12,154
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	>5,383 (边界)	约16,000
	PacI	pDAB4468	2,904	2,904
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	2,904	2,904

[0238] 限制性酶 SpeI 和 KpnI 在质粒 pDAB4468 中含有独特的限制性位点。随后,选择这些酶来表征大豆事件 DAS-68416-4 中的 aad-12 基因插入物。预测大于 5,436bp 或大于 5,383bp 的边界片段在 SpeI 和 KpnI 消化后分别与 aad-12 基因探针杂交(表 3)。在使用 SpeI 和 KpnI 时分别观察到约 12,000bp 和约 16,000bp 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 DAS-68416-4 的大豆基因组中的单一插入位点的存在。选择限制性酶 PacI 以释放 2,904bp 的片段,其含有 aad-12 植物转录单位(PTU,启动子/基因/终止子)(表 3)。在 PacI 消化后用 aad-12 基因探针观察到预测的 2,904bp 片段。用对 DAS-68416-4 样品的所有三种酶消化,接着进行 aad-12 基因探针杂交获得的结果指示来自质粒 pDAB4468 的完整 aad-12PTU 的单一拷贝被插入大豆事件 DAS-68416-4 的大豆基因组中。

[0239] 实施例 2.6 :主链序列的缺乏

[0240] 为了监测大豆事件 DAS-68416-4 中大观霉素抗性基因的存在或缺乏,实施多重 PCR 测定法。设计实验,用于检测大观霉素抗性基因编码序列的 5 个不同区域和内源大豆凝集素基因(GenBank ID No:K00821M30884)序列中的 407bp 区,作为内部对照。另外,包括下列对照:(i) 用携带对非转化大豆基因组 DNA 添加的大观霉素抗性基因的质粒 DNA 的阳性对照;(ii) 使用来自非转化大豆 Maverick 的基因组 DNA 的阴性对照;和(iii) 没有基因组 DNA 的空白。

[0241] 使用 CTAB 方法来分离来自大豆的基因组 DNA, 并使用 Pico Green 来量化。相对于 100ng/μl 标准化每份样品的 DNA 浓度。使用对大观霉素抗性基因编码序列和凝集素基因序列特异性的引物序列来实施 PCR 反应。通过在 2% E- 凝胶上加载每份样品 20 μl PCR 产物来分析反应物。

[0242] 在 E- 凝胶上的多种扩增子的存在 (100bp、150bp、和 407bp 的条带) 会指示大豆事件 DAS-68416-4 含有大观霉素抗性基因编码序列 (对大观霉素抗性基因编码序列预期 100bp 和 150bp 的扩增条带)。若仅存在与内部对照凝集素基因序列对应的 407bp 扩增子, 则这指示大豆事件 DAS-68416-4 不含大观霉素抗性编码序列。

[0243] 来自大豆事件 DAS-68416-4 的 DNA 样品没有扩增出 100bp 或 150bp 的片段。仅扩增出 407bp 片段。然而, 100bp、150bp、和 407bp 扩增片段存在于阳性对照中, 其中将携带大观霉素抗性基因的质粒 DNA 添加至大豆基因组 DNA。含有来自非转化大豆的 DNA 的阴性对照扩增出单一 407bp 片段。最后, 不含任何基因组 DNA 的反应不生成任何扩增片段。因此, 在大豆事件 DAS-68416-4 中没有检测出大观霉素抗性编码序列。

[0244] 实施例 3: 大豆事件 DAS-68416-4 的插入物和侧翼边界区中的 DNA 序列的克隆和表征

[0245] 为了表征并描述基因组插入位点, 测定大豆事件 DAS-68416-4 的 T- 链 DNA 插入物和侧翼基因组 DNA 边界区的序列。总体上, 确认 10, 212bp 的大豆事件 DAS-68416-4 基因组序列, 其包含 2, 730bp 5' 侧翼边界序列、1, 091bp 3' 侧翼边界序列、和 6, 391bp T- 链插入物 (SEQ ID NO:1)。序列分析确认大豆事件 DAS-68416-4 含有单一拷贝的完整转基因, 其含有 MAR 元件、aad-12 表达盒、和 pat 表达盒, 与预期的 T- 链插入物没有序列变化。

[0246] 基于大豆事件 DAS-68416-4 插入物和边界序列的 PCR 扩增证实边界区是大豆起源的, 而且连接区可以用于大豆事件 DAS-68416-4 的事件特异性鉴定。对跨越连接区 (包括侧翼边界序列) 的序列的分析没有鉴定源自 T- 链插入的任何新的可读框 (ORF > = 150 个密码子)。另外, 通过克隆如下的基因组片段来表征 T- 链插入位点, 所述基因组片段对应于鉴定的来自非转基因大豆基因组的侧翼边界序列的区域。比较大豆事件 DAS-68416-4 与野生型基因组序列揭示自初始基因座的 55bp 缺失和在所述事件的 3' 整合连接处的 9bp 插入。总体上, 大豆事件 DAS-68416-4 的插入物和边界序列的表征指示, 单一的、完整的 T 链拷贝存在于大豆基因组中。

[0247] 实施例 3.1: 基因组 DNA 提取和量化

[0248] 使用改良的 CTAB 方法自冻干的或新鲜碾碎的叶组织提取基因组 DNA。在基因组 DNA 提取后, 将 DNA 样品在 1X TE (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) (Fluka, Sigma, St. Louis, MO) 中溶解, 并使用 Pico Green 法依照制造商的用法说明书 (Molecular Probes, Eugene, OR) 来量化。对于 PCR 分析, 用分子生物学级水 (5PRIME, Gaithersburg, MD) 将 DNA 样品稀释以产生 10-100ng/μL 的浓度。

[0249] 实施例 3.2: PCR 引物

[0250] 表 4 列出了用于克隆并确认大豆事件 DAS-68416-4 的 DNA 插入物和侧翼边界区的引物序列, 其中图 2 中标记了位置和描述。所有引物由 Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA) 合成。将引物在水 (5PRIME, Gaithersburg, MD) 中以 100 μM 的浓度 (对于储备溶液) 溶解, 并用水稀释至 10 μM 的浓度 (对于工作溶液)。

[0251]

表4: 用于对大豆事件DAS-68416-4进行基因组步行(walking)以扩增侧翼边界区的条件。

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)	变性 (°C/ 秒)	退火 (°C/秒)	延伸 (°C/分钟: 秒)	最终的延伸 (°C/分钟)
5'边界	ES_LEnd03 (SEQ ID NO:2)/ _AP1 (SEQ ID NO:3)	F	95/3	95/30	68 ^{-0.5/循环} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
					8个循环			22个循环		
5'边界 (套式)	ES_LEnd04 (SEQ ID NO:4)/ _AP2 (SEQ ID NO:5)	F	95/3	95/30	68 ^{-0.5/循环} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
					8个循环			24个循环		
3'边界	ES_PATEnd03 (SEQ ID NO:6)/ AP1 (SEQ ID NO:1)	F	95/3	95/30	68 ^{-0.5/循环} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
					8个循环			22个循环		
3'边界 (套式)	ES_PATEnd04 (SEQ ID NO:7)/ AP2 (SEQ ID NO:5)	F	95/3	95/30	68 ^{-0.5/循环} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
				8个循环				24个循环		

[0252] 表5:用于大豆事件 DAS-68416-4 中的边界区和事件特异性序列的标准 PCR 扩增

的条件

[0253]

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)	最后的 延伸 (°C/分钟)
5'边界	16LEndG01 (SEQ ID NO:8)/ AIILEnd05 (SEQ ID NO:9)	B	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			
5'边界	16LEndG02 (SEQ ID NO:10)/ AIILEnd06 (SEQ ID NO:11)	B	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			
5'端插入连接 中的特定序列	Soy416-F (SEQ ID NO:12)/ Soy416-R (SEQ ID NO:13)	C	95/15	94/30	60/30	72/1:00	72/10
				35个循环			
3'边界	16PATG01 (SEQ ID NO:14)/ PATEnd06 (SEQ ID NO:15)	B	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			
3'边界	16PATG02 (SEQ ID NO:16)/ PATEnd06 (SEQ ID NO:15)	B	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			
在整个 插入基 因座间	16LEndG03 (SEQ ID NO:17)/ 16PATG03 (SEQ ID NO:18)	A	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			
在整个 插入基 因座间	16LEndG04 (SEQ ID NO:19)/ 16PATG04 (SEQ ID NO:20)	A	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
				35个循环			

[0254] 表6:关于T-链插入物的扩增子1-4的引物描述

[0255]

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)	最后的 延伸 (°C/分 钟)
5'基因组DNA/ DNA插入物 (978bp)	416-5-1 (SEQ ID NO:21)/ 4468-1R (SEQ ID NO:22)	D	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/15
				35个循环			
DNA插入物 (2414bp)	4468-1 (SEQ ID NO:23)/	E	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/15
				35个循环			

[0256]

	4468-2R (SEQ ID NO:24)					
DNA插入物 (1834bp)	4468-2 (SEQ ID NO:25)/ 4468-3R (SEQ ID NO:26)	E	95/2	94/60	55/60	72/2:00
				35个循环		72/15
DNA插入物/ 3' 基因组DNA (1705bp)	4468-3 (SEQ ID NO:27)/ 416-3-1R (SEQ ID NO:28)	E	95/2	94/60	55/60	72/2:00
				35个循环		72/15
DNA插入位点 (约470bp)	416-5-1 (SEQ ID NO:21)/ 416-3-1R (SEQ ID NO:28)	E	95/2	94/60	55/60	72/1:30
				35个循环		72/15

[0257] 表 7 :用于大豆事件 DAS-68416-4 中的边界区和事件特异性序列的标准 PCR 扩增的 PCR 混合物。

[0258]

PCR混合物A		PCR混合物B		PCR混合物C	
试剂	1 x 反应 (μ L)	试剂	1x反应 (μ L)	PCR混合物	1x反应 (μ L)
H2O	29	H2O	30.5	H2O	31
10X PCR 缓冲液II (加Mg)	5	10X PCR缓冲液II (加Mg)	5	10xQIA 缓冲液	5
MgCl ₂ [25mM]	1.5	MgCl ₂ [25mM]	0	MgCl ₂	1.5
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	8
引物1 (10 μ M)	1	引物1 (10 μ M)	1	引物1 (10 μ M)	1
引物2 (10 μ M)	1	引物2 (10 μ M)	1	引物2 (10 μ M)	1
DNA[10ng/uL]	4	DNA[10ng/uL]	4	DNA[10ng/uL]	4
LA Taq (5U/ul)	0.5	LA Taq (5U/ul)	0.5	QIA Hstaq(5U/ul)	0.5
反应体积:	50	反应体积:	50	反应体积:	50
PCR混合物D		PCR混合物E		PCR混合物F	
试剂	1 x反应 (μ L)	PCR混合物	1x反应 (μ L)	试剂	1x反应 (μ L)
H2O	40.25	H2O	22	H2O	32
10X PCR 缓冲液II (加Mg)	5	Easy-A 2x大师级混合物 (Master Mix)	25	10X PCR缓冲液II (加Mg)	5
MgCl ₂	0	MgCl ₂	0	MgCl ₂ [25mM]	1.5
dNTP[10mM]	1	dNTP[2.5mM]	0	dNTP[2.5mM]	8
引物1 (100 μ M)	1	引物1 (100 μ M)	1	引物1 (10 μ M)	1

[0259]

引物2 (100 μ M)	1	引物2 (100 μ M)	1	引物2 (10 μ M)	1
DNA[100ng/uL]	1	DNA[10ng/uL]	1	DNA模板	1
扩充高保真性 (Expand High Fidelity) (5U/ul)	0.75	反应体积:	50	LA Taq (5U/ul)	0.5
反应体积:	50			反应体积:	50

[0260] 实施例 3.3 :基因组步行

[0261] 使用 GENOMEWALKER™通用试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) 遵循制造商的用法说明书来克隆大豆事件 DAS-68416-4 的 pDAB4468T- 链插入物的 5' 和 3' 侧翼边界区。将约 2 μ g 来自大豆事件 DAS-68416-4 的基因组 DNA 用 EcoRV 和 PvuII 消化过夜 (图 2)。使用 DNA CLEAN&CONCENTRATOR™-25 (ZYMO Research, Orange, CA) 来纯化 DNA 消化物,接着与 GENOMEWALKER™衔接头连接以构建 GENOMEWALKER™文库。使用每个 GENOMEWALKER™文库作为 DNA 模板以用衔接头引物 AP1 (试剂盒中提供) 和构建体特异性引物 ES_LEnd03 或 ES_PATEnd03 (表 4) 进行一级 PCR 扩增。然后,使用一微升 (1 μ L) 1:25 稀释的一级 PCR 反应物作为模板以用试剂盒中提供的嵌套衔接头引物 AP2 和嵌套构建体特异性引物 ES_LEnd04 或 ES_PATEnd04 (表 4、7、和图 2) 的二级 PCR 扩增。

[0262] 实施例 3.4 :常规的 PCR

[0263] 使用标准 PCR 来克隆并确认大豆事件 DAS-68416-4 的插入物和边界序列。使用 TaKaRa LA TAQ™ (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)、HOTSTARTAQ™DNA 聚合酶 (Qiagen, Valencia, CA)、HIGH FIDELITY™PCR 试剂盒 (Roche Diagnostics, Inc)、或 EASY-A™高保真性聚合酶试剂盒 (Stratagene, LaJolla, CA) 依照制造商的推荐规程进行常规的 PCR 扩增。表 5、6、和 7 中列出了特定的 PCR 条件和扩增子描述。

[0264] 实施例 3.5 :PCR 产物检测、纯化、PCR 产物的亚克隆、和测序

[0265] 使用 1.2 % 或 2 % E-GEL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) 依照产品用法说明书通过电泳来检查 PCR 产物。通过与 DNA 标志物比较来评估片段大小。若必要的话,使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 通过自用溴化乙锭染色的在 1x TBE (89mM Tris-硼酸盐, 2mM EDTA, pH 8.3) 中的 1% 琼脂糖凝胶切出碎片来纯化 PCR 片段。

[0266] 使用供测序用的 TOPO TA CLONING® 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 依照产品用法说明书来将 PCR 片段亚克隆入 PCR®4-TOPO® 载体中。具体地,遵循制造商的用法说明书将 2 至 5 微升 TOPO® 克隆反应物转化入 One Shot 化学感受态 TOP10 细胞中。通过微量制备质粒 DNA (QIAprep 旋转微量制备试剂盒, Qiagen, CA), 接着用 EcoRI 限制性消化或者通过使用 T3 和 T7 引物的直接菌落 PCR 来确认克隆片段。然后,将选定菌落的质粒 DNA 或甘油储液外包 (outsource) 测序。

[0267] 在亚克隆后,最初对推定的靶 PCR 产物测序以确认已经克隆出预期的 DNA 片段。选出含有预期 DNA 片段的菌落以通过引物步行完成双链全长测序。所有测序由

Cogenics (Houston, TX) 实施。

[0268] 使用**SEQUENCHER®**软件 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) 来完成插入物和边界序列的最终装配。使用 Vector NTI (第 10 和 11 版, Invitrogen, Carlsbad, CA) 来实施大豆事件 DAS-68416-4 的插入物及其侧翼边界序列的注释。

[0269] 针对 GenBank 非冗余核苷酸数据库使用 BLAST 程序来实施同源性搜索。实施使用 Vector NTI (第 11 版, Invitrogen) 的可读框 (ORF) 分析以鉴定大豆事件 DAS-68416-4 的完整插入物和侧翼边界序列, 和野生型 Maverick 大豆系的初始基因座中的 ORF (> = 150 个密码子)。

[0270] 实施例 3.6 :5' 端边界序列

[0271] 使用针对转基因 5' 端的特异性嵌套引物组自每个大豆事件 DAS-68416-4 GENOMEWALKER™ 文库扩增 DNA 片段。观察到来自 EcoRV GENOMEWALKER™ 文库的约 1.8kb 片段和来自 PvuII GENOMEWALKER™ 文库的约 3kb 片段。将这些片段克隆入**PCR®4-TOPO®**载体中。随机挑出每个文库的 5 个菌落以进行末端测序, 从而产生核苷酸序列数据。选出含有这两种 PCR 引物的序列的菌落以通过引物步行获得完整的序列。序列分析揭示了自大豆事件 DAS-68416-4 EcoRV GENOMEWALKER™ 文库扩增的克隆含有 1,744bp DNA 片段, 并且自大豆事件 DAS-68416-4 PvuII GENOMEWALKER™ 文库扩增的克隆含有 3,047bp DNA 片段。序列分析揭示了自 EcoRV GENOMEWALKER™ 文库获得的 DNA 片段与自 PvuII GENOMEWALKER™ 文库克隆获得的 DNA 片段在引物 ES_1End04 与 EcoRV 位点间的区域重叠。这些 DNA 片段都含有转基因中的 T-链边界 B 的 5' 端连接, 指示它们是自大豆事件 DAS-68416-4 中的 5' 端转基因插入物及其侧翼边界的同一区域扩增的。发现所得的 2,730bp 大豆基因组序列与 GenBank 中的序列没有显著同源性。

[0272] 实施例 3.7 :3' 端边界序列

[0273] 使用针对转基因 3' 端的特异性嵌套引物组自大豆事件 DAS-68416-4 EcoRV GENOMEWALKER™ 文库扩增具有约 1.3kb 大小的 DNA 片段。然后, 将 DNA 片段克隆入**PCR®4-TOPO®**载体中。随机挑出 5 个菌落以进行末端测序。所有 5 个克隆含有引物 AP2 和引物 ES_PATEnd04 两者的序列。对这些克隆的完整测序生成 1,359bp 共有 DNA 片段。序列分析公开了 1,359bp 片段, 其由来自 T-链边界 A 的 3' 端区的 268bp 片段和来自大豆基因组 DNA 的 1,091bp 片段组成。BLAST 搜索没有鉴定出此 1,091bp 大豆 DNA 序列与 GenBank 中的序列间的任何显著同源性。

[0274] 实施例 3.8 :DNA 插入物和连接序列

[0275] 使用基于 PCR 的方法自大豆事件 DAS-68416-4 克隆 DNA 插入物和侧翼边界区, 如先前所描述的。使用 5' 和 3' 侧翼边界序列和预期的转基因序列来设计表 6 中所列的 PCR 引物。总共将 4 个重叠的 DNA 片段 (978bp 的扩增子 1、2,414bp 的扩增子 2、1,834bp 的扩增子 3、和 1,705bp 的扩增子 4) 克隆并测序 (图 3)。基于四个片段间的重叠序列装配整个插入物和侧翼边界序列。对最终装配序列的分析确认源自 pDAB4468 转基因的 6,391bp 片段的存在, 并且在与来自质粒 pDAB4468 的预期序列比较时没有遇到插入 DNA 序列的碱基变化。

[0276] 实施例 3.9 :大豆基因组序列的确认

[0277] 为了确认大豆事件 DAS-68416-4 转基因在大豆基因组中的插入位点, 用不同引物对 (图 4 和表 5) 实施 PCR。使用来自大豆事件 DAS-68416-4 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, 为了确认获得的 5' 端边界序列是否正确, 使用两个

aad-12 特异性引物,例如 AIIEnd05 和 AIIEnd06,和依照 5' 端边界序列设计的两个引物(称作 16LEndG01 和 16LEndG02)来扩增跨越 aad-12 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-End06 和依照 3' 端边界序列设计的两个引物(称作 16PATG01 和 16PATG02)来扩增跨越 pat 基因至 3'端边界序列的 DNA 区段。仅自大豆事件 DAS-68416-4 的基因组 DNA 用每个引物对(位于大豆事件 DAS-68416-4 的侧翼边界的一条引物和一条转基因特异性引物),而非自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 DAS-68416-4 中 T- 链插入物的侧翼边界序列。

[0278] 为了进一步确认大豆基因组中的 DNA 插入物,完成跨越两个大豆序列的 PCR 扩增。使用依照 5' 端边界序列设计的两个引物 16LEndG03 和 16LEndG04,和用于 3' 端边界序列的两个引物 16PATG03 和 16PATG04 来扩增如下的 DNA 区段,其含有整个转基因、5' 端边界序列、和 3' 边界序列。如预期的,用引物对 16LEndG03 和 16PATG03 的 PCR 扩增自大豆事件 DAS-68416-4 的基因组 DNA 扩增出约 9kb DNA 片段和自非转基因大豆对照和其它大豆转基因系扩增出 2.7kb DNA 片段。类似地,相应地用引物对 16LEndG04 和 16PATG04 完成的 PCR 反应生成来自大豆事件 DAS-68416-4 样品的约 9kb DNA 片段及来自所有其它大豆对照系的 2.8kb DNA 片段。注意到在使用这两种引物对进行 PCR 时在除了大豆事件 DAS-68416-4 外的所有大豆样品中,具有约 6kb 大小的微弱条带是可见的,提示了此微弱的条带源自在大豆基因组中用此引物对的非特异性扩增。

[0279] 实施例 3.10 :大豆基因组序列的确认

[0280] 将来自非转基因大豆系 Maverick 的 2.7kb 和 2.8kb 扩增 DNA 片段(使用引物对 16LEndG03 和 16PATG03 或引物对 16LEndG04 和 16PATG04 得到)克隆并测序。其序列彼此匹配,并且与来自大豆事件 DAS-68416-4 的克隆 5' 和 3' 边界序列比对。这表明克隆的 DNA 序列含有 pDAB4468 的 T- 链整合入大豆事件 DAS-68416-4 中的基因座。比对分析还揭示了自初始基因座的 55bp 缺失和 3' 整合连接处的 9bp 插入物(图 5)。在克隆的初始基因座的大豆基因组区域中没有鉴定出可读框(>/ = 450bp, 150 个 aa)。

[0281] 实施例 4 :经由大豆事件 DAS-68416-4 的侧翼 SNP 标志物的基因组表征

[0282] 为了表征并描述基因组插入位点,测定位于插入物附近的标志物序列。使用一组多态性单核苷酸多态性(SNP)标志物来鉴定并定位转基因位置。大豆事件 DAS-68416-42 位于染色体 4 上的 119.6cM 处。此位置在两个侧翼 SNP 标志物 BARC-044607-08736 和 BARC-019093-03299 之间。更具体地,将转基因的位置定位于距离 SNP 标志物 BARC-019093-03299 为 1.3cM(480kb)。

[0283] 实施例 4.1 :用侧翼边界区序列的 BLAST

[0284] 使用大豆事件 DAS-68416-4 的侧翼边界区序列(SEQ ID NO:1)来对大豆全基因组序列进行 BLAST。BLAST 结果显示了大豆事件 DAS-68416-4 的这两个边界序列都位于作为连锁群 C1 的染色体(Gm04)上。

[0285] 实施例 4.2 :SNP 定位和 BLAST 结果

[0286] 基于来自用边界序列的 BLAST 和定位的结果,将事件归入染色体 4。因此,自大豆遗传连锁图选出 10 种 SNP 标志物。从由 Cregan 博士(Beltsville 农业研究中心)和 USDA 开发的 SNP 标志物选出 SNP 标志物。这些 SNP 标志物与对应于染色体 4 的连锁群 C1 有关。

使用 SNP 序列来对大豆全基因组序列进行 BLAST 以测定大豆事件 DAS-68416-4 的 T- 链插入物的物理位置。

[0287] 实施例 4.3 :SNP 标志物结果

[0288] 将大豆事件 DAS-68416-4 定位于染色体 4 上的 119.6cM 处。两个侧翼 SNP 标志物是 BARC-044607-08736 和 BARC-019093-03299。转基因距离 SNP 标志物 BARC-019093-03299 为 1.3cM(480kb),在 SNP 标志物 BARC-044607-08736 和 BARC-019093-03299 间约 119.6cM。

[0289] 实施例 5 :大豆事件 DAS-68416-4 中的 AAD-12 蛋白的表征

[0290] 表征源自转基因大豆事件 DAS-68416-4 的重组 AAD-12 蛋白的生物化学特性。使用定量酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 用考马斯蓝和糖蛋白检测方法染色)、和 Western 印迹法来表征蛋白质的生物化学特性并确认 AAD-12 蛋白的表达。

[0291] 实施例 5.1 :植物组织中的 AAD-12 蛋白的表达

[0292] 在大豆事件 DAS-68416-4 中测定 AAD-12 蛋白水平。使用定量酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 方法在大豆叶中测量可溶性、可提取的 AAD-12 蛋白。

[0293] 将大豆组织样品自测试植物分离,并制备好进行表达分析。用含有 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) 的含有去污剂 Tween-20 的磷酸盐缓冲盐水溶液 (PBST) 自大豆植物组织提取 AAD-12 蛋白。将植物组织离心;将水性上清液收集,若必要的话,用合适的缓冲液稀释,并以三明治式形式使用 AAD-12ELISA 试剂盒来分析。遵循制造商提示的方案来使用试剂盒。

[0294] 实施检测分析以在大豆事件 DAS-68416-4 中在纵向 (在世代间) 和横向 (在谱系间) 两者上调查表达稳定性和可遗传性。在 T5 世代,大豆事件 DAS-68416-4 表达是稳定 (不分离) 且在所有谱系间一致 (图 6)。

[0295] 在 V3 前、V3 后、R2 前、和 R2 后对大豆事件 DAS-68416-4 实施多个植物阶段的田间表达水平研究。表达数值对于所有喷雾处理以及对于用 2,4-D 除草剂喷雾和未喷雾的样地是相似的。应用 2X 喷雾率 (2,240gm ae/ha 2,4-D),并且在任何研究点时没有对植物观察到损伤。在 v3 前植物阶段中在所有谱系间的平均表达是 300ug/cm²。在喷雾 2,4-D 后,表达保持稳定,谱系间平均值为 400ug/cm²。当大豆达到 R2 前时,平均表达已经略微下降至 200ug/cm²的平均值。在喷雾 2,4-D 后,R2 后的表达已经回到 400ug/cm²的先前平均值。见图 6。

[0296] 实施例 5.2 :植物组织中的 AAD-12 蛋白的表达

[0297] 在 2008 年期间在美国和加拿大的六个地方进行额外的田间表达研究。测试大豆事件 DAS-68416-4 的 4 个处理 (未喷雾、用 2,4-D 喷雾、用草丁磷喷雾、或用 2,4-D 和草丁磷两者喷雾)。取样的植物组织包括叶、颗粒 (grain)、根、和饲料 (forage)。在 V5 和 V10 阶段时收集叶组织,并在发育的 R3 阶段时收集根和饲料。在发育的 R8 阶段时收集颗粒 (Gaska, 2006)。使用证实的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 方法来测量可溶性、可提取的 AAD-12 蛋白,如先前记载于实施例 5.1 的。按 ng/mg 干重计算所有组织类型的 AAD-12 蛋白水平。

[0298] 表 8 中显示了多个大豆基质中的 AAD-12 蛋白浓度 (位置间取平均值) 的汇总。平均表达数值范围为 R3 阶段根中的 15.5ng/mg 干重至 V5 阶段叶组织中的 66.1ng/mg。表达数值对于所有喷雾处理以及对于用 2,4-D 和草丁磷除草剂喷雾和未喷雾的样地是相似的。

在六个位置间在对照组织中没有检测到 AAD-12 蛋白。

[0299] 表 8 :自在 2008 年期间在美国和加拿大生成的大豆事件 DAS-68416-4 收集的
组织中的 AAD-12 蛋白水平的汇总

[0300]

大豆		AAD-12ng/mg组织干重		
组织	处理	均值	标准偏差	范围
V5叶	DAS-68416-4未喷雾	51.4	25.2	26.4 - 97.7
	DAS-68416-4 + 草丁磷	50.6	23.7	28.0 - 94.0
	DAS-68416-4 + 2,4-D	51.7	25.4	27.2 - 101
	DAS-68416-4 + 草丁磷和2,4-D	66.1	37.8	25.1 - 165
V10叶	DAS-68416-4未喷雾	54.0	20.9	29.8 - 90.9

[0301]

	DAS-68416-4 + 草丁磷	56.1	22.0	25.1 - 92.0
	DAS-68416-4 + 2,4-D	55.2	20.6	30.8 - 91.8
	DAS-68416-4 + 草丁磷和2,4-D	57.1	23.0	32.0 - 95.2
根	DAS-68416-4未喷雾	17.1	5.68	8.80 - 27.6
	DAS-68416-4 + 草丁磷	15.5	4.58	6.30 - 23.1
	DAS-68416-4 + 2,4-D	16.0	6.64	3.16 - 27.9
	DAS-68416-4 + 草丁磷和2,4-D	16.7	6.81	1.84 - 26.5
饲料	DAS-68416-4未喷雾	41.1	25.7	5.70 - 91.2
	DAS-68416-4 + 草丁磷	39.4	24.5	5.49 - 88.0
	DAS-68416-4 + 2,4-D	40.6	25.6	5.02 - 88.0
	DAS-68416-4 + 草丁磷和2,4-D	39.7	22.4	4.96 - 69.6
颗粒	DAS-68416-4未喷雾	16.5	3.55	9.40 - 21.9
	DAS-68416-4 + 草丁磷	16.9	3.15	11.9 - 22.7
	DAS-68416-4 + 2,4-D	16.5	3.78	9.71 - 22.0
	DAS-68416-4 + 草丁磷和2,4-D	16.2	3.62	9.91 - 23.4

[0302] 实施例 5.3 :对 AAD-12 蛋白的 SDS PAGE 和 Western 印迹分析

[0303] 在具有添加的稳定剂的基于 PBST (具有 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4) 的缓冲液中自大豆事件 DAS-68416-4 的冻干的叶组织提取 AAD-12 蛋白,并通过离心来收集可溶性蛋白质。将上清液过滤,并容许可溶性蛋白质结合苯基 Sepharose (PS) 珠 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。在温育 1 小时后,将 PS 珠用 PBST 清洗,并将结合的蛋白质用 Milli-Q 水洗脱。添加氯化钠以提高电导率,并将经 PS 纯化的蛋白质加载到抗 AAD-12 免疫亲和柱上,所述抗 AAD-12 免疫亲和柱已经与 AAD-12 特异性多克隆抗体缀合。自该柱收集未结合的蛋白质,并用预冷却的 PBS (磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4) 广泛清洗该柱。用 3.5M NaSCN, 50mM Tris, pH 8.0 缓冲液自该柱洗脱结合的蛋白质,并通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹检查。使用相同的方案来自对照大豆系 Maverick 的叶组织分离蛋白质。Maverick 不含 aad-12 基因,但是具有代表大豆事件 DAS-68416-4 植物的遗传背景。

[0304] 将来自大豆事件 DAS-68416-4 和 Maverick 的冻干叶组织与含有约 2.0% 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, St. Louis, MO) 的 PBST 缓冲液混合, 并通过在 Geno 研磨机中用球轴承研磨来提取蛋白质。将样品离心, 并将上清液与 Laemmli 样品缓冲液混合, 加热, 并短暂离心。将样品直接加载到 Bio-Rad 规范 SDS-PAGE 凝胶上。还将阳性参照标准品, 即微生物衍生的 AAD-12 蛋白与样品缓冲液混合, 并加载到凝胶上。用 Tris/ 甘氨酸 /SDS 缓冲液 (Bio-Rad, Hercules, CA) 进行电泳。在电泳后, 将凝胶切成两半, 一半用 Pierce GelCode Blue 蛋白质染料染色, 而将另一半凝胶电印迹到硝酸纤维素膜上。然后, 用 AAD-12 特异性多克隆兔抗体探查硝酸纤维素膜。使用化学发光底物来显现免疫反应性条带。在微生物衍生的 AAD-12 中, 如在考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶上显现的主要蛋白质条带是约 32kDa。如预期的, 相应的植物衍生的 AAD-12 蛋白在大小上与微生物衍生的蛋白质相同。可预测地, 在 AAD-12 蛋白外, 植物纯化的级分含有微量的非免疫反应性杂质。共纯化的蛋白质有可能通过与柱基质的弱相互作用而保留于柱上 (Williams 等, 2006, Kennedy 和 Barnes, 1983 及 Holroyde 等, 1976)。

[0305] 微生物衍生的 AAD-12 和 DAS-68416-4 植物组织提取物显示了使用抗 AAD-12 多克隆抗体在 Western 印迹上的预期大小的阳性信号。在 AAD-12 Western 印迹分析中, 在对照 Maverick 提取物中没有观察到免疫反应性蛋白质, 并且在来自转基因植物的样品中没有看到交替大小的蛋白质 (聚集体或降解产物)。单克隆抗体确实在微生物衍生的蛋白质中检出少量 AAD-12 二聚体。这些结果增加如下的证据, 即 AAD-12 蛋白在大豆中表达。

[0306] 实施例 6 : 经由 Southern 印迹对大豆事件 DAS-68416-4 的甲基化检测分析

[0307] 导入的转基因在整合入植物基因组中后可以经历沉默。转基因表达可以在转录水平和 / 或转录后水平受到抑制。已经报告了转录基因沉默与转基因、其启动子和其它相关序列的甲基化有关 (Stem 等, 1997)。为了检测特定序列中的甲基化, 一种方法利用甲基化敏感性限制性酶来消化 DNA, 接着对 DNA 产物进行 Southern 印迹分析。在特定的限制性酶位点被甲基化时, 酶不会切割 DNA。限制性位点的甲基化导致更高的分子量 DNA 片段, 其在 Southern 印迹上可检出。实施基于 Southern 印迹的甲基化分析来测定大豆事件 DAS-68416-4 的 T 链插入物的甲基化状态。使用对 aad-12 基因及其启动子特异性的探针和两种甲基化敏感性限制性酶进行此测定法。未检出 aad-12 表达盒的甲基化。

[0308] 6. 1. 大豆叶样品收集和基因组 DNA (gDNA) 分离

[0309] 自大豆事件 DAS-68416-4 和非转基因大豆系 Maverick 的个体植物的叶制备基因组 DNA。使用传统的 CTAB 法自冻干的叶组织分离基因组 DNA。在提取后, 使用 Pico Green 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来量化 DNA。

[0310] 6. 2. DNA 消化和分离

[0311] 对于 DNA 的分子表征, 通过将每 μg DNA 约 5 个单位的选定的限制性酶和相应的反应缓冲液添加至每份 DNA 样品来消化十微克 ($10\ \mu\text{g}$) 来自大豆事件 DAS-68416-4 和非转基因大豆系 Maverick 的基因组 DNA。将每份样品于约 37°C 温育过夜。使用限制性酶 AclI 和 Hyp188III 来进行消化 (New England Biolabs, Ipswich, MA)。使用与测试样品相同的规程和限制性酶来消化来自非转基因大豆 Maverick 的 DNA 以充当阴性对照。将经消化的 DNA 样品在将 NaCl 添加至终浓度 0.1M 后用异丙醇沉淀, 并在 $20\ \mu\text{l}$ 1X 加样缓冲液 (0.1% 溴酚蓝、100mM EDTA、50% 甘油、10mM Tris pH 7.5) 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。用溴化乙锭 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 染色凝胶,并在紫外 (UV) 光下显现 DNA。

[0312] 6.3. Southern 转移和膜处理

[0313] 实施 Southern 印迹分析,如由 Severson 等, (1997) 所描述的。简言之,在电泳分离和在 UV 光下显现 DNA 片段后,将凝胶暴露于变性溶液 (150mM NaOH, 3mM EDTA) 达约 20 分钟,接着是中和溶液 (150mM NaPO₄, pH 7.8) 达至少 20 分钟。使用具有转移缓冲液 (25mM 焦磷酸钠, pH 10) 的芯吸系统对尼龙膜 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 实施 Southern 转移过夜。在转移后,将膜于 65℃ 烘烤约 2 小时。此过程导致准备好杂交的 Southern 印迹膜。

[0314] 6.4. DNA 探针标记和杂交

[0315] 使用经标记的探针来检测与尼龙膜结合的 DNA 片段。将探针作为用特异性引物自质粒 pDAB4468 扩增的 PCR 片段生成。自琼脂糖凝胶切出并纯化这些 PCR 扩增片段。使用纯化的 DNA 片段作为生成杂交探针的模板。使用 GE Healthcare READY-TO-GO™ DNA 标记珠 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 遵循制造商的用法说明书通过随机引发用 α³²P 特异性的核苷酸标记杂交探针,并通过 PROBEQUANT™ G-50 微柱 (Amersham/Pharmacia, Piscataway, New Jersey, USA) 纯化。表 9 中描述了用于该研究的探针列表。

[0316] 使用杂交缓冲液 (Sigma, St. Louis, MO), 分别将预杂交和杂交于 65℃ 实施 4 小时和过夜。在杂交后,将膜于 65℃ 在清洗缓冲液 (10mM 磷酸钠、2.5mM 焦磷酸钠、0.5mM EDTA、0.1% SDS, 用磷酸将 pH 调节至 7.8) 清洗三次,达 20 分钟。将清洗的滤膜暴露于 Phosphorimager 屏以进行放射自显影术,并扫描图像。

[0317] 表 9 :用于 Southern 分析的探针的位置和长度。

[0318]

探针名称	遗传元件	在 pDAB4468(bp) 上的位置	长度 (bp)
ProAU10-a	泛素启动子 (AtUbi10)	10827-11905	1100
ProAU10-b	泛素启动子 (AtUbi10)	10942-12020	1100
aad-12	aad-12	10118-10768	671

[0319] 6.5 探针剥离

[0320] 在获得 Southern 杂交数据后将 DNA 探针剥离膜印迹,并可以挽救膜印迹以与不同 DNA 探针进行杂交。简言之,在暴露后,将膜印迹在再生溶液 1 (30mM NaOH, 1mM Na₂EDTA) 中于室温清洗 10 分钟,并在再生溶液 2 (5mM NaPO₄, 1mM Na₂EDTA, 0.1% SDS) 中于 65℃ 清洗 30 分钟。然后,将膜印迹在 2X SSC 中短暂清洗,并准备好与另一个 DNA 探针杂交。将膜印迹暴露于 Phosphorimager 屏以进行放射自显影术,从而确保在进行下一次杂交前剥离所有 DNA 探针。

[0321] 6.6. Southern 印迹结果

[0322] 在此研究中使用甲基化敏感性限制性酶 Aci I 和 Hpy188III 以测定 aad-12 基因及其启动子 AtUbi10 的甲基化状态。表 10 中给出了基于 pDAB4468 的 T 链 DNA 的已知限制性

酶位点的用特定消化和探针得到的预期片段大小。在 Southern 印迹上检出更高分子量片段会指示 AciI 和 Hyp188III 限制性酶位点的识别序列中的胞嘧啶的甲基化。因此,甲基化会导致限制性酶不能消化基因组 DNA。

[0323] 使用限制性酶 AciI 和 Hyp188III 来检查 aad-12 基因甲基化状态。使用 aad-12 探针来观察具有预期大小的杂交条带。此数据提示了在大豆事件 DAS-68416-4 中在 AciI 和 Hyp188III 的识别位点中没有发生甲基化。类似地,使用 AtUbi10 探针在用 Hyp188III 消化的大豆事件 DAS-68416-4 的 DNA 样品中检测出预测分子量的条带。此数据指示识别位点在 aad-12 启动子序列中没有被甲基化。

[0324] 表 10 :Southern 印迹分析中预测的和观察到的杂交片段。

[0325]

DNA 探针	限制性酶		预期的片段大小 (bp) 1	观察到的片段大小 (bp) 2
ProAU10	Hyp188III	pDAB4468	495、368、279、210 和 87	约 200bp*
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	495、368、279、210、 和 87	约 500bp 和 约 300bp
aad-12	Aci I	pDAB4468	673、597、422、138	太弱以致于看不 见
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	673、597、422、138	约 700bp 和 约 600bp
	Hyp188III	pDAB4468	472、211、209	太弱以致于看不 见
		Maverick	无	无
		DAS-68416-4	472、211、209	约 500bp 和 约 200bp

[0326] 实施例 7 :农艺学数据

[0327] 用大豆事件 DAS-68416-4 进行农艺学试验作为美国和加拿大的 6 个位置的 2008 组成研究的一部分,而且还在分开的研究中在 2009 年在美国和加拿大的 8 个位置进行。这些研究比较事件 DAS-68416-4 大豆(有和没有 2,4-D 和 / 或草丁磷除草剂应用)与其非转基因近等基因对照(Maverick)。这两项研究间的结果显示了农艺学参数在对常规大豆系获得的范围内。

[0328] 实施例 7.1 :2008 农艺学数据的产生

[0329] 用事件 DAS-68416-4 大豆和非转基因对照(品种 Maverick)的农艺学研究在 2008 年在位于爱荷华州(Iowa)、伊利诺斯州(Illinois)、印地安那州(Indiana)、内布拉斯加州(Nebraska)和加拿大安大略省(2 个位置)的 6 个位置进行。评估农艺学决定因素,包括群落地段(stand)/种群计数(population count)、幼苗/植物活力、植物高度、倒伏、发病率、昆虫损害、和开花前天数,以调查与对照系 Maverick 相比大豆事件 DAS-68416-4(具有

和没有除草剂处理)的等同。本研究称为实验 1。

[0330] 以每 25ft 行约 112 个种子的播种率种植测试和对照大豆种子,其中行间距为约 30 英寸 (75cm)。在每个位置,建立每个处理的三个重复样地,其中每个样地由 2-25ft 行组成。样品以随机化完全区组 (RCB) 设计排列,每个位置具有独特的随机化。每个大豆样地以两行类似成熟度的非转基因大豆为边界。整个试验位置以最小 10ft 的类似相对成熟度的非转基因大豆围绕。

[0331] 以每英亩 (187L/ha) 约 20 加仑的喷雾体积应用除草剂处理。这些应用设计为重复最大标签率 (label rate) 商业实践。以三次撒施过多应用方式应用 2,4-D,季节性总共为 3lb ae/A。在出土前和约 V4 和 R2 生长阶段时进行 1.0lb ae A(1,120g/ha) 的个别应用。以两次撒施过多应用方式应用草丁磷,季节性总共为 0.74lb ai/A(828g ai/ha)。在约 V6 和 R1 生长阶段时进行 0.33lb ai/A 和 0.41lb ai/A(374 和 454g ai/ha) 的个别应用。

[0332] 使用混合模型 (SAS 第 8 版;SAS 研究所 1999) 在田间位置间对农艺学数据进行方差分析。认为输入 (Entry) 是固定效果,而位置、位置内的区组、按输入的位置 (location-by-entry)、和按位置内区组的输入 (entry-by-block within location) 称为随机效果。使用 F- 检验来评估总体处理效果的显著性。使用 t- 检验在对照与未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4(未喷雾)、用草丁磷喷雾的大豆事件 DAS-68416-4(大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷)、用 2,4-D 喷雾的大豆事件 DAS-68416-4(大豆事件 DAS-68416-4+2,4D) 和用草丁磷和 2,4-D 两者喷雾的大豆事件 DAS-68416-4(大豆事件 DAS-68416-4+ 这两者) 转基因输入间进行配对对比。还使用假发现率 (False Discovery Rate, FDR) 来计算校正过的 P- 值以控制多重性 (Benjamini 和 Hochberg, 1995)。

[0333] 表 11:实验 1 中评估的农艺学参数。

[0334]

性状	评估时机	数据描述	量表(Scale)
早期群体	VC-V2	每块样地各行中出现的植物的数目	每块样地的实际计数
幼苗活力	VC-V2	每块样品出现的植物的平均活力的视觉评估	基于非转化大豆的生长定标的1-10 10 =与非转化的生长同等 9 = 与非转化相比,植

[0335]

植物活力/损伤	出土后除草剂应用后	来自除草剂应用的损伤	物健康为90%，等等 基于非转化大豆的生长 的1-10量表 10 = 与非转化的生长 等同 9 = 与非转化相比，植 物健康为90%，等等
植物高度	约R6	在用手延伸时从土壤表面到最高叶顶端的高度	以cm计的高度 (每块样品10个植物的 平均值)
倒伏	约R8	倒伏严重性的视觉评估	按基于倒伏植物的数 目的0-100%量表的视 觉评估
最终群体	约R8	每块样地各行中剩余的植物的数目	每块样品的实际计数， 包括在先前取样期间 除去的植物
群落地段计数	R2	1米行段中的植物数目	--
开花前天数		从种植到50%的植物为R1时的天数	天

[0336] 进行对自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂收集的农艺学数据的分析。对群落地段计数、早期群体、幼苗活力、应用后损伤、倒伏、最终的群落地段计数或开花前天数没有观察到统计学显著性差异（表 12）。对于高度，在对照与大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 喷雾之间观察到显著的配对 t- 检验。然而，没有观察到显著的总体处理效果，差异在大豆事件 DAS-68416-4 处理与对照之间非常小，并且差异在不同大豆事件 DAS-68416-4 处理间不是共享的。基于这些结果，大豆事件 DAS-68416-4 与近等基因非转基因对照是农艺学上等同的。

[0337] 表 12 :对来自实验 1 的农艺学特征的分析。

[0338]

分析物	总体处理效果 (Pr>F) ^a	未喷雾的 (P-值, ^b 对照校正过的P) ^c	喷雾的草丁 磷(P-值, 校正过的P)	喷雾的2,4-D (P-值, 校正过的P)	喷雾的这两 者(P-值, 校正过的P)
-----	-------------------------------	---	---------------------------	-----------------------------	---------------------------

[0339]

群落地段计数	0.774	170	172	175	173	175
(植物的数目)			(0.709,0.824)	(0.311,0.575)	(0.476,0.672)	(0.269,0.575)
早期群体	0.714	76.7	77.4	79.1	79.0	79.4
(%出土) ^d			(0.738,0.824)	(0.301,0.575)	(0.327,0.575)	(0.256,0.575)
幼苗活力 ^e	0.547	9.72	9.39	9.50	9.44	9.39
			(0.146,0.575)	(0.326,0.575)	(0.222,0.575)	(0.146,0.575)
活力/损伤	0.511	10.0	9.86	9.89	9.83	9.67
约2 ^e			(0.461,0.671)	(0.555,0.718)	(0.378,0.611)	(0.087,0.575)
活力/损伤	0.462	10.0	10.0	9.89	9.83	9.89
约3 ^e			(1.000,1.000)	(0.320,0.575)	(0.141,0.575)	(0.320,0.575)
活力/损伤	0.431	9.94	9.89	9.78	9.67	9.78
约5 ^e			(0.721,0.824)	(0.289,0.575)	(0.085,0.575)	(0.289,0.575)
高度(cm)	0.144	101	98.1	99.2	96.1	97.2
			(0.145,0.575)	(0.390,0.611)	(0.020,0.575)	(0.062,0.575)
倒伏(%)	0.948	17.2	18.2	21.3	20.7	21.7
			(0.885,0.904)	(0.551,0.718)	(0.606,0.746)	(0.511,0.700)
最终的地段计数	0.268	156	154	161	155	163
(植物的数目)			(0.770,0.840)	(0.335,0.575)	(0.817,0.853)	(0.127,0.575)
开花天数 ^f	0.452	49.0	49.5	49.4	48.7	49.2
			(0.261,0.575)	(0.395,0.611)	(0.568,0.718)	(0.668,0.801)

[0340] a 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0341] b 使用 t- 检验比较喷雾的和未喷雾的处理与对照。

[0342] c 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0343] d 0-100% 量表 ; (用群落地段计数除以种植的种子数目) * 100。

[0344] e 按 1-10 量表的视觉评估 ; 10 = 与非转化植物等同的生长。

[0345] f 按 0-100% 量表的视觉评估 ; 0% = 无损伤。

[0346] f 从种植时直到开花的天数。

[0347] 粗体的 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0348] 实施例 7.2 : 2009 农艺学数据的产生

[0349] 在 2009 年在位于阿肯色州 (Arkansas)、爱荷华州、伊利诺斯州、印地安那州、密苏里州 (Missouri)、和内布拉斯加州 (Nebraska) 的 8 个位置进行用大豆事件 DAS-68416-4 和非转基因对照 (品种 Maverick) 的农艺学研究。农艺学决定因素, 包括群落地段 / 种群计数、幼苗 / 植物活力、植物高度、发病率、昆虫损害、和开花前天数, 以调查大豆事件

DAS-68416-4 大豆（具有和没有除草剂处理）与对照的等同（表 13）。

[0350] 表 13：在农艺学和产率试验（2009）中收集的数据。

[0351]

特征	评估时机	描述	报告的单位	测试*
出土	VC - V2	用1米行段中的群落地段计数 除以每米种植的种子数目	%	B
幼苗活力	V1 - V3	一般的幼苗活力	1 (低)至10 (高)	B
视觉损伤	V3后应用	在V3阶段时在除草剂应用后1 天的视觉损伤	%	S
视觉损伤	V3后应用	在V3阶段时在除草剂应用后7 天的视觉损伤	%	S
视觉损伤	V3后应用	在V3阶段时在除草剂应用后 14天的视觉损伤	%	S
开花前天数		从种植到在50%的植物为R1时 的天数	天	B
群落地段计 数	R2	在1米行段中的植物数目		B
视觉损伤	R2后应用	在R2阶段时在除草剂应用后1 天的视觉损伤	%	S
视觉损伤	R2后应用	在R2阶段时在除草剂应用后7 天的视觉损伤	%	S
视觉损伤	R2后应用	在R2阶段时在除草剂应用后 14天的视觉损伤	%	S
发病率	约R6	对某个位置发生的任何疾病的 机会性记录	%	B
昆虫损害	约R6	对某个位置发生的任何昆虫损 害的机会性记录	%	B
植物高度	R8	在R8时的样地的最终高度	cm	B

[0352]

成熟度	R8	从种植到在样品中的95%的植物已经达到其成熟颜色时的天数	天	B
倒伏	R8	样地中的倒伏程度	1 (无) - 5(倒下)	B
产率	R8	由样地生产的种子重量	bu/英亩	B
100个种子重量	R8	来自收获样地的100个随机种子的重量	g	B

[0353] *B - 喷雾和未喷雾测试, S - 仅喷雾测试

[0354] 对试验使用随机化完全区组设计。输入是大豆事件 DAS-68416-4、Maverick 对照系、和商品化的非转基因大豆系。以每行约 112 个种子的播种率种植测试、对照和参照大豆种子, 其中行间距为约 30 英寸 (75cm)。在每个位置, 建立每个处理的 4 个重复样地, 其中每块样地由 2-25ft 行组成。每个大豆样地以 2 行非转基因大豆 (Maverick) 为边界。整个试验位置以最小 4 行 (或 10ft) 的非转基因大豆围绕。应用合适的昆虫、杂草、和疾病控制实践来生成农艺学可接受的作物。

[0355] 应用除草剂处理以重复最大标签率商业实践。处理由非喷雾对照和在规定的生长阶段应用的 2, 4-D、草丁磷、2, 4-D/ 草丁磷的除草剂应用组成。对于 2, 4-D 应用, 在 V4 和 R2 生长阶段以 1.01b ae/A (1, 120g ae/ha) 的比率应用除草剂。对于草丁磷处理, 在 V4 和 V6-R2 生长阶段对植物进行应用。对于这两种应用, 对于 V4 和 V6-R2 应用分别以 0.331b ai/A (374g ai/ha) 和 0.411b ai/A (454g ai/ha) 的比率应用草丁磷。这两种除草剂应用的输入是大豆事件 DAS-68416-4 和对照, 包括非转基因 Maverick。预期 Maverick 样地在除草剂应用后死亡。

[0356] 使用混合模型 (SAS 第 8 版 ;SAS 研究所 1999) 在田间位置间对农艺学数据进行方差分析。认为输入是固定效果, 而位置、位置内的区组、按输入的位置、和按位置内区组的输入称为随机效果。以类似的方式用输入作为固定效果及区组和按区组的输入作为随机效果来完成个别位置的分析。为了统计学分析, 数据没有四舍五入。在 95% 置信水平宣称显著性差异, 并且使用 F- 检验来评估总体处理效果的显著性。使用 T- 检验在未喷雾的 AAD-12 (未喷雾)、用草丁磷喷雾的 AAD-12 (AAD-12+ 草丁磷)、用 2, 4-D 喷雾的 AAD-12 (AAD-12+2, 4-D) 和用草丁磷和 2, 4-D 两者喷雾的 AAD-12 (AAD-12+2, 4-D+ 草丁磷) 转基因输入与对照输入间进行配对对比。

[0357] 由于此研究中进行的大量对比, 多重性是一个问题。在单一研究中进行大量比较以寻找意料不到的效果时, 多重性是一个问题。在这些条件下, 基于比较方式的 (comparison-wise) p- 值来错误宣称差异的可能性是非常高的 ($1-0.95^{\text{比较数目}}$)。在此研究中, 每个分析物 (16 种对农艺学分析的观察类型) 有 4 次比较, 导致在农艺学方面的 64 次比较。因此, 基于未校正的 p- 值来宣称一个或多个假差异的可能性为对于农艺学的 99% ($1-0.95^{64}$)。

[0358] 进行自对照、未喷雾的 AAD-12、AAD-12+ 草丁磷、AAD-12+2, 4-D、和 AAD-12+2, 4-D+ 草丁磷输入收集的农艺学数据的分析。对于位置间分析 (表 14), 对幼苗活力、最终群体、植物活力 / 损伤 (V4, R1)、倒伏、发病率、昆虫损害、开花前天数、成熟前天数、豆荚数目、种子数目、产率、和植物高度没有观察到统计学显著性差异。对于群落地段计数和早期群体, 在对照与 AAD-12+ 草丁磷输入间观察到显著的配对 t- 检验, 但是不伴随显著的总体处理效果或经 FDR 校正的 p- 值。对于植物活力 / 损伤 (R2), 在对照与 AAD-12+ 草丁磷和 AAD-12+2, 4-D+ 草丁磷输入两者间观察到显著的配对 t- 检验和显著的总体处理效果, 但是不伴随显著的经 FDR 校正的 p- 值。所有这些变量的均值结果也在对此研究中测试的参照系找到的范围内。

[0359] 表 14 : 位置间 2009 农艺学特征结果的汇总

[0360]

农艺学测量(单位)	总体 Trt 效果 (Pr > F) ^a	等值线 均值± S.E. [最小值- 最大值]	未喷雾的 AAD-12均 值± S.E. [最小值-最 大值] (P-值, 校正过的P) ^b	AAD-12 + 草丁磷均值 ± S.E. [最小 值-最大值] (P-值, 校正 过的P) ^b	AAD-12 + 2,4-D均值 ± S.E. [最小值 -最大值] (P- 值, 校正过 的P) ^b	AAD-12 + 2,4-D + 草丁 磷均值± S.E. [最小值-最大 值] (P-值, 校 正过的P) ^b	参照范 围[最小 值-最大 值]
群落地段 计数 - VC-V2 (出土的植 物数目)	0.099	187 ± 6 [141 - 215]	181 ± 6 [149 - 213] (0.130, 0.559)	177 ± 6 [134 - 208] (0.009, 0.322)	182 ± 6 [123 - 216] (0.226, 0.683)	184 ± 6 [148 - 220] (0.474, 0.905)	[102 - 211]
早期群体- VC-V2 (出土植物 的%)	0.107	82.3 ± 2.3 [63 - 93.3]	79.7 ± 2.3 [66.7 - 92.4] (0.127, 0.559)	77.7 ± 2.3 [59.8 - 93] (0.010, 0.322)	80.2 ± 2.3 [55 - 94.6] (0.221, 0.683)	81.1 ± 2.3 [66 - 94.6] (0.463, 0.905)	[46 - 94.2]
幼苗活力- VC-V2	0.931	10 ± 0.3 [7 - 10]	9 ± 0.3 [8 - 10]	10 ± 0.3 [8 - 10]	10 ± 0.3 [7 - 10]	9 ± 0.3 [7 - 10]	[8 - 10]

[0361]

(活力的视觉评估; 1-10量表, 10 = 等同于 非转化)		(0.623, 0.905)	(0.806, 0.919)	(1.000, 1.000)	(0.462, 0.905)	
最终群体 - R8	0.250	152 ± 19	150 ± 19	145 ± 19	149 ± 19	153 ± 19 [5 - 203]
(样地中剩余的植物 数目)		[15 - 198]	(0.659, 0.905)	(0.070, 0.559)	(0.432, 0.905)	(0.778, 0.905)
植物活力/损伤 - V4	0.255	10 ± 0.2	10 ± 0.2	9 ± 0.2	10 ± 0.2	9 ± 0.2 [8 - 10]
(活力的视觉评估; 1-10量表, 10 = 等同于 非转化)		[9 - 10]	[8 - 10]	[7 - 10]	[8 - 10]	[7 - 10]
			(1.000, 1.000)	(0.148, 0.559)	(0.952, 1.000)	(0.148, 0.559)
植物活力/损伤 - R1	0.201	10 ± 0.2	10 ± 0.2	10 ± 0.2	10 ± 0.2	10 ± 0.2 [8 - 10]
(活力的视觉评估; 1-10量表, 10 = 等同于 非转化)		[8 - 10]	[9 - 10]	[8 - 10]	[9 - 10]	[8 - 10]
			(0.725, 0.905)	(0.124, 0.559)	(0.725, 0.905)	(0.276, 0.769)
植物活力/损伤 - R2	0.036	10 ± 0.1	10 ± 0.1	10 ± 0.1	10 ± 0.1	10 ± 0.1 [8 - 10]
(活力的视觉评估; 1-10量表, 10 = 等同于 非转化)		[8 - 10]	[9 - 10]	[9 - 10]	[8 - 10]	[8 - 10]
			(0.762, 0.905)	(0.042, 0.559)	(0.763, 0.905)	(0.036, 0.559)
倒伏 - R8	0.514	6 ± 5	5 ± 5	7 ± 5	7 ± 5	7 ± 5 [0 - 20]
(0-100%量表, 基于倒 伏植物数 目的视觉 评估)		[0 - 50]	[0 - 50]	[0 - 50]	[0 - 60]	[0 - 60]
			(0.605, 0.905)	(0.354, 0.853)	(0.522, 0.905)	(0.348, 0.853)
发病率 - R6	0.078	9 ± 4	8 ± 4	9 ± 4	10 ± 4	7 ± 4 [0 - 25]
(0-100%量表-疾病的 视觉评估)		[0 - 40]	[0 - 40]	[0 - 40]	[0 - 40]	[0 - 30]
			(0.673, 0.905)	(0.833, 0.919)	(0.295, 0.787)	(0.061, 0.559)
昆虫损害 - R6	0.762	5 ± 3	5 ± 3	6 ± 3	6 ± 3	6 ± 3 [0 - 30]
(0-100%量表-昆虫损 害的视觉 评估)		[0 - 30]	[0 - 20]	[0 - 30]	[0 - 30]	[0 - 30]
			(0.718, 0.905)	(0.425, 0.905)	(0.360, 0.853)	(0.235, 0.683)

[0362]

评估)							
植物高度	0.518	90 ± 9	89 ± 9	88 ± 9	89 ± 9	90 ± 9	[32 -
(样地中10		[27 -	[30 - 142]	[21 - 142]	[46 - 140]	[48 - 155]	140]
个植物以		140]	(0.620,	(0.214,	(0.767,	(0.645, 0.905)	
cm计的植			0.905)	0.683)	0.905)		
物高度)							
开花前天	0.441	958.8 ±	946.3 ± 30.9	962.9 ± 30.9	958.7 ± 30.9	962 ± 30.9	[835.1 -
数		30.9	[835.1 -	[859.7 -	[835.1 -	[835.1 -	1074]
(在50%的		[835.1 -	1056]	1074]	1056]	1056]	
植物达到		1056]	(0.203,	(0.672,	(0.987,	(0.744, 0.905)	
开花时的			0.683)	0.905)	1.000)		
热单位)							
成熟前天	0.124	2063.3	2063.9 ±	2070.3 ±	2063.5 ±	2069.2 ± 69.1	[1696 -
数		± 69.1	69.1	69.1	69.1	[1696 -	2290.8]
(在50%的		[1696 -	[1696 -	[1696 -	[1696 -	2272.4]	
植物达到		2272.4]	2272.4]	2272.4]	2272.4]	(0.098, 0.559)	
生理学成			(0.869,	(0.052,	(0.969,		
熟时的热			0.943)	0.559)	1.000)		
单位)							
豆荚数目(5	0.356	254 ±	249 ± 41	273 ± 41	261 ± 41	258 ± 41	[107 -
个植物中		41	[159 - 460]	[155 - 490]	[144 - 461]	[154 - 440]	562]
的豆荚数		[137 -	(0.691,	(0.123,	(0.527,	(0.747, 0.905)	
目)		460]	0.905)	0.559)	0.905)		
种子数目(5	0.324	642 ±	698 ± 92	704 ± 92	693 ± 92	667 ± 92	[321 -
个植物中		92	[406 - 1256]	[420 - 1330]	[472 - 1114]	[443 - 1109]	1221]
的种子数		[254 -	(0.102,	(0.072,	(0.136,	(0.443, 0.905)	
目)		1289]	0.559)	0.559)	0.559)		
产率(来自	0.742	2730 ±	2800 ± 310	2680 ± 310	2700 ± 310	2800 ± 310	[1360 -
整个样地		310	[1700 -	[1860 -	[1750 -	[1950 - 4800]	4600]
的收获种		[1900 -	4400]	4300]	4700]	(0.527, 0.905)	
子的克数)		4500]	(0.503,	(0.696,	(0.829,		
			0.905)	0.905)	0.919)		

[0363] a 在分析前不转化测量单位。

[0364] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0365] c 使用 t- 检验 (P- 值) 来与对照比较;使用假发现率 (FDR) 规程来校正 P- 值 (校正过的 p);认为 P- 值 < 0.05 是显著的。

[0366] 实施例 7.3 :生态学评估

[0367] 大豆事件 DAS-68416-4 田间试验由熟悉大豆栽培实践的人员 (育种人员、野外站 (field station) 管理者、田间农学家、田间合作人 (associate)) 监测并观察。进行田间测试的人员视觉监测与相同试验中的常规大豆品种相比,大豆事件 DAS-68416-4 植物上的植物疾病和有害生物的发生率。作为实施例 7.1 中描述的实验 1 的一部分,按 0-100% 的数字量表评定疾病和昆虫损害,其中 0% 代表由于发病率或昆虫抗性而没有损伤。表 15 显示了实验 1 中所描述的 6 个位置间的结果。

[0368] 表 15 :对来自实验 1(实施例 7.1) 的发病率和昆虫损害的分析。

[0369]

分析物	总体处理 效果 (Pr>F) ^a	对照	未喷雾 (P-值 ^b , 校正过的P) ^c	喷雾的草丁 磷(P-值, 校 正过的P)	喷雾的2,4-D (P-值, 校正过 的P)	喷雾的这两者 (P-值, 校正过的 P)
疾病 发病率 (%) ^e	0.422	13.1	12.6 (0.803,0.853)	11.8 (0.456,0.671)	11.1 (0.251,0.575)	10.1 (0.091,0.575)
昆虫损害 ^e	0.332	24.1	21.8 (0.140,0.575)	22.1 (0.204,0.575)	22.3 (0.236,0.575)	20.9 (0.044,0.575)

[0370] a 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0371] b 使用 t- 检验来比较喷雾的和未喷雾的处理与对照。

[0372] c 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0373] e 按 0-100% 量表的视觉评估 ;0% = 无损伤。

[0374] 对发病率没有观察到统计学显著性差异。对于昆虫损害,在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间观察到显著的配对 t- 检验。然而,没有观察到显著的总体处理效果,大豆事件 DAS-68416-4 处理与对照间的差异较小,并且差异不是不同大豆事件 DAS-68416-4 处理间共享的。

[0375] 还从 2006-2008 年进行的所有 USDA APHIS 通报的田间试验进行生态学观察。记录大豆事件 DAS-68416-4 植物试验中的发病率和昆虫存在,并检查与常规的对照相比大豆事件 DAS-68416-4 植物的发病率或响应的差异。在所有情况中,与常规的对照相比,没有在任何大豆事件 DAS-68416-4 植物试验中看到差异。表 16 中描述了大豆事件 DAS-68416-4 和常规大豆试验中观察到的疾病和昆虫应激源。这些观察结果支持如下的结论,即大豆事件 DAS-68416-4 对生态学应激源的响应与常规大豆的响应没有差异。

[0376] 表 16 :在 DAS-68416-4 和常规大豆试验中观察到的疾病和昆虫应激源。

[0377]

年	USDA 通报号	状态	县(County)	疾病	昆虫
2007	06-292- 105n	IN	Benton		蚜虫豆叶甲虫 (aphids bean leaf beetles) 玉米根虫甲虫 (corn rootworm beetles)

[0378]

					日本甲虫 瓢虫 叶蝉
2007-2008	07-242-107n	PR	Santa Isabel	香石竹潜伏病毒 (Carla virus)	叶螨 粉虱
2008	08-071-107n	CA IL IN IN IA IA MN MS NE	Tulare Clinton Benton Parke Jefferson Story Dakota Washington York	褐斑病 (brown spot) 尾孢叶枯病 (Cercospora leaf blight) 锈病(rust) 壳针孢叶斑病 (Septoria leaf spot)	蚜虫 豆叶甲虫 叶蝉 日本甲虫 瓢虫 臭椿 蓟马(thrip) 黄带粘虫 (yellow-striped armyworm)

[0379] 实施例 7.4 :萌发性 (Germancy) 和休眠评估

[0380] 通过与温暖和寒冷条件下近等基因比较物相比查看大豆事件 DAS-68416-4 种子的萌发来评估种子休眠特征的变化。

[0381] 对于温暖萌发测试,将大豆事件 DAS-68416-4 和对照大豆种子以 25 个 / 板放入含有用水饱和的萌发垫的培养皿中,并排出过量的水。将板于 25℃ 放置,并在这些条件下保持 5 天。每个系制备 16 块板 (400 个种子)。在 5 天后,记录未萌发种子的数目。

[0382] 对于寒冷萌发测试,以装有盆栽土壤的每半浅苗床 (half-flat) 100 个种子种植种子。使浅苗床在水下,并于 10℃ 保持 7 天,接着暴露于 25℃ 达 5 天,之后记录非萌发种子的数目。

[0383] 使用完全随机化设计以每个重复 100 个种子的四个重复通过方差分析 (ANOVA) 分析来自每个测试的数据。为了统计学分析,使用萌发种子数目除以 100 的平方根的反正弦来转化数据。表 17 中汇总了百分比萌发。

[0384] 表 17 :在温暖和寒冷条件下的大豆事件 DAS-68416-4 种子的萌发。

[0385]

测试	系	重复				均值
		1	2	3	4	
温暖	DAS-68416-4	97	100	99	100	99.0
温暖	对照	100	100	99	97	99.0
寒冷	DAS-68416-4	92	92	92	89	91.3
寒冷	对照	98	88	98	96	95.0

[0386] 在温暖或寒冷萌发实验中在大豆事件 DAS-68416-4 与对照大豆种子间在萌发方面没有显著差异 (分别为 $Pr>F = 1.0$ 和 0.13)。这些结果提示了种子休眠特征在大豆事件

DAS-68416-4 中尚未改变。

[0387] 实施例 7.5 :农艺学、疾病、有害生物、和萌发性特征的汇总

[0388] 遍及整个生长季节评估植物生长特征的农艺学数据表明大豆事件 DAS-68416-4 与常规非转基因大豆的等同。植物生长和表型特征、如通过对疾病和昆虫压力的易感性指示的对生态学应激源的响应、以及萌发和休眠特征在多种多样环境间在大豆事件 DAS-68416-4 植物和常规大豆间没有变化。因此,这些数据支持如下的结论,即大豆事件 DAS-68416-4 的农艺学、疾病、和有害生物特征与常规大豆的农艺学、疾病、和有害生物特征没有显著差异,并且没有指示大豆事件 DAS-68416-4 大豆会显示 (post) 升高的植物有害生物风险。

[0389] Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. J. Royal Statistical Soc. B, 57: 289-300.

[0390] 实施例 8 :颗粒和饲料组成

[0391] 对大豆饲料和颗粒实施组成分析以调查大豆事件 DAS-68416-4 (用 2, 4-D、草丁磷、2, 4-D+ 草丁磷喷雾,或未用 2, 4-D 或草丁磷喷雾) 与常规大豆间的等同。使用具有和没有大豆事件 DAS-68416-4 的种子系在位于美国和加拿大的主要大豆生产区内的 6 个测试位置进行试验。测试位置代表多种多样的农艺学实践和环境条件的区域,并且是用于实施例 7.1 中所描述的蛋白质表达分析和农艺学实验 1 的相同位置。试验位于爱荷华州、伊利诺斯州、印地安那州、内布拉斯加州、和加拿大安大略省 (2 个位置)。

[0392] 用多种测试对大豆饲料和颗粒的样品分析营养物含量。对饲料实施的分析包括蛋白质、脂肪、灰分 (ash)、湿度 (moisture)、碳水化合物、酸性去污纤维 (ADF)、中性去污纤维 (NDF)、钙和磷。对颗粒实施的分析包括近似值 (proximate) (灰分、总脂肪、湿度、蛋白质、胆固醇、碳水化合物)、纤维、矿物质、氨基酸、脂肪酸、维生素、抗营养物。

[0393] 将对大豆饲料和颗粒的营养分析的结构与文献中报告的数值比较。还使用混合模型在田间位置间进行方差分析。认为输入是固定效果,而位置、位置内的区组、和按输入的位置称为随机效果。使用 F- 检验来评估总体处理效果的显著性。使用 t- 检验在大豆事件 DAS-68416-4 (未喷雾的 AAD-12 ;未用 2, 4-D 或草丁磷喷雾)、用草丁磷喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 (大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷)、用 2, 4-D 喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 (大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D) 和用草丁磷和 2, 4-D 两者喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 转基因输入 (大豆事件 DAS-68416-4+ 这两者) 与对照输入间进行配对对比。

[0394] 由于此研究中进行的大量对比,多重性是一个问题。在单一研究中进行大量比较以寻找意料不到的效果时,多重性是一个问题。在这些条件下,基于比较方式 p- 值来错误宣称差异的可能性是非常高的 ($1 - 0.95^{\text{比较数目}}$)。在此研究中,每个分析物 (75 种定量分析物) 有 4 次比较,导致在位置间组成分析上进行的 300 次比较。因此,基于未校正的 p- 值来宣称一个或多个假差异的可能性大于 99.99%。

[0395] 一种解决多重性的方法是校正 p- 值以控制实验方式的 (experiment-wise) 错误率 (所有宣称的差异是显著的可能性),但是当在研究中进行许多比较时,可显著降低用于检测特定效果的能力。一种具有大得多的能力的备选是校正 p- 值以控制每个宣称的差异是显著的可能性。这可以使用假发现率 (FDR) 规程 (Benjamini 和 Hochberg, 1995) 来完成。

因此,可以使用 FDR 来校正 p- 值以改善处理间的实际差异与随机效果(假阳性)的区分。

[0396] 实施例 8.1 :对大豆饲料的组成分析

[0397] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆饲料样品中的蛋白质、脂肪、灰分、湿度、碳水化合物、酸性去污纤维 (ADF)、中性去污纤维 (NDF)、钙和磷的分析。表 18 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0398] 在位置间分析中在对照与转基因输入间在蛋白质、脂肪、灰分、湿度、碳水化合物、ADF、NDF、钙或磷方面没有观察到统计学差异。大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷和大豆事件 DAS-68416-4+ 这两种除草剂的位置间均值灰分数值在文献范围外部,对于大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D, NDF 数值亦然。所有处理(包括非转基因对照)的 ADF 数值也在文献数值外部。均值数值在非转基因对照与任何转基因输入间在饲料中的任何近似值、纤维类型、或矿物方面没有显著差异。基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 大豆的饲料与近等基因非转基因对照的饲料基本上等同。

[0399] 表 18 :对大豆饲料的近似值、纤维和矿物分析的汇总(%干重)。

[0400]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾的 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草丁 磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的这两 者 (P-值, 校正的 P)
近似值							
蛋白质	11.2-24.7	0.805	19.1	19.0 (0.881,0.930)	19.4 (0.666,0.819)	18.9 (0.744,0.860)	18.6 (0.441,0.634)
脂肪	1.30-5.1	0.046	4.11	4.46 (0.216,0.403)	3.66 (0.107,0.254)	4.17 (0.844,0.908)	3.74 (0.186,0.360)
灰分	6.72-10.8	0.092	10.6	10.1 (0.567,0.767)	11.1 (0.546,0.741)	10.2 (0.672,0.819)	12.3 (0.051,0.151)
湿度 (%鲜重)	73.5-81.6	0.569	77.8	78.5 (0.255,0.444)	78.4 (0.330,0.539)	77.8 (0.960,0.970)	77.8 (0.976,0.979)
碳水化合物	59.8-74.7	0.675	66.2	66.5 (0.830,0.902)	65.9 (0.739,0.860)	66.7 (0.641,0.808)	65.3 (0.366,0.564)
纤维							
酸性去污 纤维(ADF)	32.0-38.0	0.967	30.2	30.4 (0.904,0.936)	30.6 (0.797,0.875)	29.7 (0.746,0.860)	30.7 (0.740,0.860)
中性去污 纤维(NDF)	34.0-40.0	0.375	34.4	34.7 (0.877,0.930)	33.1 (0.397,0.596)	32.0 (0.135,0.297)	34.5 (0.948,0.962)
矿物							
钙	NR	0.246	1.39	1.36 (0.361,0.560)	1.40 (0.664,0.819)	1.38 (0.842,0.908)	1.43 (0.178,0.352)
磷	NR	0.957	0.263	0.266 (0.671,0.819)	0.269 (0.442,0.634)	0.266 (0.696,0.831)	0.265 (0.754,0.860)

[0401] a 组合的范围。

[0402] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0403] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0404] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0405] NR = 未报告

[0406] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0407] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0408] 实施例 8.2 : 对大豆粒的组成分析

[0409] 实施例 8.2.1 : 近似值和纤维

[0410] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆粒样品中的蛋白质、脂肪、灰分、湿度、胆固醇、碳水化合物、ADF、NDF 和总膳食纤维的分析。表 19 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0411] 在位置间分析中在对照与转基因输入间在脂肪、ADF 或总膳食纤维方面没有观察到统计学差异。然而,对于大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 输入, ADF 比文献范围略高。

[0412] 基于未校正的 p 值,与对照相比,蛋白质水平对于未喷雾的、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂在位置间分析中显著不同。然而,在 FDR 校正后,仅大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 的 p- 值是显著的,并且所有处理的总体均值蛋白质数值在报告的文献数值内,指示差异没有生物学意义。

[0413] 在对照与 2, 4-D 喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 处理间在灰分的位置间分析中观察到显著的未校正 p- 值,但是没有观察到总体处理效果或校正的 p 值。灰分数值也在报告的文献数值内,指示差异没有生物学意义。

[0414] 基于未校正的 p 值,与对照相比,湿度水平对于未喷雾的、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂在位置间分析中显著不同。然而,总体处理效果对于湿度不是显著的,仅大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 处理具有显著的经 FDR- 校正的 p- 值,并且所有处理的均值湿度水平在文献范围内。这指示差异没有生物学意义。

[0415] 胆固醇数值均小于定量限度 ($<LOQ$),并且没有报告文献数值。

[0416] 基于未校正的 p 值,与对照相比,碳水化合物水平对于未喷雾的、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 在位置间分析中显著不同。然而,基于经 FDR 校正的 p- 值,仅大豆事件 DAS-68416-4+2, 4D 处理与对照显著不同,并且所有处理均值在报告的文献数值内,指示与非转基因大豆的等同。

[0417] 基于未校正的 p 值,与对照相比, NDF 水平对于大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷在位置间分析中显著不同,但是这没有伴随显著的经校正的 p- 值或总体处理效果。NDF 位置间数值比大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 输入的报告文献数值略高,但是与非转基因近等基因对照相比,差异为小于 9%。

[0418] 基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 的颗粒基本上等同非转基因大豆的。

[0419] 表 19 : 大豆粒的近似值和纤维分析 (%干重) 的汇总。

[0420]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草丁 磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两者 (P-值, 校正的 P)
近似值							
蛋白质	32.0-45.5	0.004	39.2	38.3 (0.009,0.051)	38.8 (0.186,0.360)	37.8 (0.0003,0.009)	38.5 (0.035,0.122)
脂肪	8.10-24.7	0.105	17.1	17.1 (0.877,0.930)	16.6 (0.059,0.169)	16.7 (0.142,0.305)	17.2 (0.674,0.819)
灰分	3.89-6.99	0.315	4.92	5.04 (0.176,0.351)	5.04 (0.175,0.351)	5.10 (0.048,0.145)	5.07 (0.099,0.240)
湿度 %鲜重	4.70-34.4	0.066	14.9	14.1 (0.047,0.143)	14.3 (0.122,0.276)	13.7 (0.006,0.043)	14.0 (0.037,0.124)
胆固醇	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
碳水化合物	29.6-50.2	0.010	38.8	39.6 (0.046,0.143)	39.6 (0.044,0.138)	40.3 (0.001,0.011)	39.3 (0.241,0.432)
纤维							
酸性去污 纤维(ADF)	7.81-18.6	0.561	17.8	17.6 (0.772,0.868)	18.0 (0.772,0.868)	18.8 (0.190,0.362)	18.1 (0.685,0.825)
中性去污 纤维(NDF)	8.53-21.3	0.184	20.1	20.8 (0.386,0.585)	21.9 (0.042,0.134)	21.6 (0.090,0.225)	20.3 (0.754,0.860)
总体膳食 纤维	NR	0.770	31.6	31.7 (0.899,0.936)	31.7 (0.897,0.936)	32.1 (0.466,0.653)	32.5 (0.286,0.482)

[0421] a 组合的范围。

[0422] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0423] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0424] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0425] NA = 未显示统计学分析, 因为大部分数据小于 LOQ。

[0426] NR = 未报告

[0427] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0428] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0429] 实施例 8.2.2: 矿物

[0430] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 这两种除草剂的大豆粒样品中的钙、铬、铜、碘、铁、镁、锰、钼、磷、钾、硒、钠和锌的分析。表 20 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0431] 基于未校正的 p- 值, 在对照与转基因输入间在铬、铜、碘、铁、锰、钼、磷、硒和钠 (未检出) 方面没有观察到统计学差异。

[0432] 基于未校正的 p- 值, 对于大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D, 钙在位置间分析中具有显著差异, 但是这与显著的经 FDR 校正的 p- 值或总体处理效果无关, 并且所有处理均值落入文献范围内, 指示差异没有生物学意义。

[0433] 分别基于未校正的和校正的 p- 值,与对照相比,镁水平对于大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂和大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷在位置间分析中显著不同,但是总体处理效果不是显著的。镁位置间均值数值比报告的文献数值略低,但是与对照相比,差异较小 (<3%),并且与对照相比,所有大豆事件 DAS-68416-4 输入更接近文献数值。

[0434] 所有大豆事件 DAS-68416-4 输入在位置间分析中比对照具有显著更高的钾数值。然而,与对照相比,差异较小 (<5%),并且与对照相比,所有大豆事件 DAS-68416-4 输入更接近文献数值。

[0435] 基于未校正的 p- 值,锌水平的差异对于大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂在位置间分析中是显著的,然而,这没有伴随显著的经 FDR- 校正的 p- 值或总体处理效果,并且差异较小 (<4%)。

[0436] 基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 的颗粒基本上等同非转基因大豆的。

[0437] 表 20 :大豆粒的矿物分析 (mg/100g 干重) 的汇总。

[0438]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾(P- 值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草 丁磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两 者 (P-值, 校正的 P)
钙	117-307	0.102	256	265 (0.174,0.351)	264 (0.237,0.432)	274 (0.010,0.057)	269 (0.050,0.148)
铬 (ppb)	NR	0.775	145	149 (0.912,0.941)	175 (0.468,0.653)	126 (0.613,0.796)	137 (0.855,0.916)
铜	NR	0.887	1.31	1.28 (0.534,0.728)	1.30 (0.788,0.873)	1.27 (0.367,0.564)	1.28 (0.461,0.649)
碘	NR	0.285	0.027	0.023 (0.430,0.632)	0.021 (0.182,0.358)	0.032 (0.348,0.551)	0.023 (0.348,0.551)

[0439]

铁	5.54-11.0	0.917	8.15	8.46 (0.719,0.853)	8.95 (0.353,0.552)	8.53 (0.656,0.819)	8.59 (0.608,0.796)
镁	219-313	0.082	210	212 (0.437,0.634)	215 (0.020,0.087)	213 (0.143,0.305)	215 (0.021,0.088)
锰	NR	0.984	2.56	2.60 (0.608,0.796)	2.60 (0.618,0.799)	2.58 (0.781,0.873)	2.59 (0.698,0.831)
钼 (ppb)	NR	0.845	2165	2557 (0.353,0.552)	2462 (0.479,0.665)	2563 (0.346,0.551)	2284 (0.722,0.853)
磷	507-935	0.675	583	589 (0.630,0.804)	599 (0.191,0.363)	596 (0.272,0.469)	594 (0.349,0.551)
钾	1868-2316	0.0005	1801	1876 (0.0003,0.009)	1882 (0.0001,0.006)	1883 (0.0001,0.006)	1864 (0.001,0.019)
硒 (ppb)	NR	0.490	490	523 (0.626,0.802)	520 (0.659,0.819)	511 (0.758,0.861)	418 (0.280,0.475)
钠	NR	NA	20.9	< LOQ	17.3	19.7	14.1
锌	NR	0.096	5.06	5.07 (0.868,0.926)	5.19 (0.117,0.268)	5.21 (0.074,0.197)	5.25 (0.027,0.105)

[0440] a 组合的范围。

[0441] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0442] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0443] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0444] NR = 未报告

[0445] NA = 未显示统计学分析, 因为大部分数据小于 LOQ。

[0446] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0447] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0448] 实施例 8.2.3 : 氨基酸

[0449] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆粒样品中的下列氨基酸的分析 : 丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、和缬氨酸。表 21 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0450] 在对照与转基因输入间在胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、酪氨酸或色氨酸方面没有观察到统计学差异。基于未校正的 p- 值, 大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 的异亮氨酸水平与对照显著不同, 但是这没有伴随显著的经 FDR- 校正的 p- 值或显著的总体处理效果。与对照相比, 剩余的 12 种氨基酸的水平对于两个或更多个大豆事件 DAS-68416-4 输入略低 ($<7\%$), 但是均落入非转基因大豆的文献范围内。所有输入的所有氨基酸均在文献范围内, 指示差异没有生物学意义。基于这些组成成分, 来自大豆事件 DAS-68416-4 的颗粒基本上等同非转基因大豆的。

[0451] 表 21 : 大豆粒的氨基酸分析 (% 干重) 的汇总。

[0452]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾的 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草 丁磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两 者 (P-值, 校正的 P)
丙氨酸	1.51-2.10	0.003	1.74	1.70 (0.001,0.017)	1.70 (0.004,0.033)	1.69 (0.0003,0.009)	1.71 (0.014,0.067)
精氨酸	2.29-3.40	0.007	3.15	2.97 (0.004,0.033)	3.00 (0.012,0.066)	2.94 (0.001,0.015)	2.96 (0.003,0.026)
天冬氨酸	3.81-5.12	0.007	4.52	4.41 (0.004,0.033)	4.44 (0.037,0.124)	4.38 (0.0005,0.010)	4.43 (0.014,0.067)
胱氨酸	0.37-0.81	0.254	0.60	0.60 (0.637,0.808)	0.60 (0.787,0.873)	0.61 (0.900,0.936)	0.61 (0.110,0.260)
谷氨酸	5.84-8.20	0.002	6.98	6.76 (0.001,0.015)	6.83 (0.019,0.086)	6.70 (0.0001,0.006)	6.80 (0.006,0.043)
甘氨酸	1.46-2.00	0.001	1.74	1.69 (0.0004,0.009)	1.70 (0.002,0.023)	1.69 (0.0001,0.006)	1.70 (0.001,0.017)
组氨酸	0.88-1.22	0.003	1.09	1.06 (0.002,0.023)	1.07 (0.014,0.067)	1.05 (0.0002,0.007)	1.07 (0.013,0.067)
异亮氨酸	1.54-2.08	0.232	1.87	1.83 (0.100,0.241)	1.85 (0.450,0.642)	1.82 (0.042,0.134)	1.85 (0.514,0.708)
亮氨酸	2.20-4.00	0.010	3.06	3.00 (0.007,0.046)	3.02 (0.068,0.186)	2.98 (0.001,0.011)	3.01 (0.037,0.124)
赖氨酸	2.29-2.84	0.005	2.56	2.51 (0.004,0.034)	2.52 (0.028,0.105)	2.49 (0.0003,0.009)	2.52 (0.022,0.093)
甲硫氨酸	0.43-0.68	0.433	0.56	0.55 (0.377,0.575)	0.55 (0.245,0.438)	0.55 (0.089,0.225)	0.55 (0.742,0.860)
苯丙氨酸	1.60-2.35	0.008	2.02	1.97 (0.014,0.067)	1.98 (0.044,0.138)	1.94 (0.0004,0.009)	1.97 (0.027,0.105)
脯氨酸	1.69-2.28	0.374	1.91	1.85 (0.059,0.169)	1.88 (0.400,0.597)	1.87 (0.155,0.324)	1.87 (0.240,0.432)
丝氨酸	1.11-2.48	0.063	1.99	1.95 (0.082,0.210)	1.95 (0.115,0.268)	1.91 (0.006,0.043)	1.93 (0.021,0.088)
苏氨酸	1.14-1.89	0.001	1.62	1.57 (0.002,0.020)	1.58 (0.008,0.048)	1.55 (0.0001,0.006)	1.57 (0.002,0.022)
色氨酸	0.36-0.67	0.330	0.43	0.43 (0.593,0.787)	0.43 (0.981,0.981)	0.43 (0.904,0.936)	0.42 (0.095,0.235)
酪氨酸	1.02-1.61	0.449	1.36	1.34 (0.275,0.471)	1.35 (0.517,0.708)	1.33 (0.096,0.235)	1.33 (0.153,0.321)
缬氨酸	1.50-2.44	0.159	1.97	1.92 (0.032,0.116)	1.94 (0.279,0.475)	1.92 (0.038,0.124)	1.95 (0.346,0.551)

[0453] a 组合的范围。

[0454] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0455] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0456] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0457] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0458] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0459] 实施例 8.2.4 :脂肪酸

[0460] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 这两种除草剂的大豆粒样品中的 22 种脂肪酸。表 22 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0461] 分析脂肪酸 10:0 癸酸、15:0 十五烷酸、15:1 十五碳烯酸、20:3 二十碳三烯酸、20:4 花生四烯酸、8:0 辛酸、12:0 月桂酸、14:0 豆蔻酸、14:1 肉豆蔻烯酸、17:1 十七烯酸、18:3 γ 亚麻酸、和 20:2 二十碳二烯酸, 并且结果小于 LOQ。脂肪酸 16:0 棕榈酸、17:0 十七烷酸、和 20:1 二十烯酸在对照与 AAD-12 输入间没有显著不同, 尽管 20:1 二十烯酸数值低于 AAD-12+ 草丁磷和 AAD-12+ 两种除草剂的报告文献数值。然而, 与对照相比, 差异较低 (<5%)。

[0462] 基于未校正的 p- 值, 16:1 棕榈油酸的水平在对照与未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同。然而, 仅未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 输入具有对于 16:1 棕榈油酸显著的经 FDR- 校正的 p- 值。与报告的文献数值相比, 16:1 棕榈油酸位置间数值对于此处理更低, 但是与近等基因对照相比, 差异较小 (<13%)。

[0463] 基于未校正的 p- 值, 18:0 硬脂酸的水平在对照与未喷雾的和大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷间显著不同。然而, 基于经校正的 p- 值或总体处理效果, 没有观察到显著差异, 并且所有输入在报告的文献范围内, 指示与非转基因大豆的等同。

[0464] 18:1 油酸的水平在对照与未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同。然而, 18:1 油酸水平对于所有处理在报告的文献数值内, 指示与非转基因大豆的等同。

[0465] 基于未校正的 p- 值, 18:2 亚油酸的水平在对照与未喷雾的和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 间显著不同。然而, 在经校正的 p- 值或总体处理效果中没有观察到显著差异, 并且 18:2 亚油酸水平对于所有处理在报告的文献数值内, 指示与非转基因大豆的等同。

[0466] 基于未校正的 p- 值, 18:3 亚麻酸的水平在每个大豆事件 DAS-68416-4 输入与对照间显著不同, 并且与对照相比, 经校正的 p- 值在未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4 与大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂处理间也是显著的。对于 18:3 亚麻酸不可获得文献数值, 然而, 大豆事件 DAS-68416-4 与对照处理间的差异较小 (<6%)。

[0467] 基于未校正的 p- 值, 20:0 花生酸的水平在对照与未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同, 并且 20:0 花生酸对于未喷雾的和大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷处理在经校正的 p- 值中在位置间分析中也具有显著的差异。然而, 20:0 花生酸水平对于所有处理在报告的文献数值内, 指示与非转基因大豆的等同。

[0468] 基于未校正的 p- 值, 22:0 山酸的水平在对照与未喷雾的、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D、和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同, 并且 22:0 山酸的水平对于大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷在经校正的 p- 值中在位置间分析中也具有显著的差异。然而, 没有显著的总体处理效果, 并且 22:0 山酸水平对于所有处理在报告的文献数值内, 指示与非转基因大豆的等同。

[0469] 在调查的 22 种脂肪酸中,所有四种大豆事件 DAS-68416-4 输入或是与对照在统计学上不能区别或是在 21 种脂肪酸的文献数值内。在一种情况(未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4;16:1 棕榈油酸)中,数值略低于最小文献数值,并且与对照显著不同(低小于 13%),然而,所有三种喷雾的处理在文献范围内。基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 的颗粒基本上等同于非转基因大豆的。

[0470] 表 22:大豆粒的脂肪酸分析(%总脂肪酸)的汇总。

[0471]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾的 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草 丁磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两者 (P-值, 校正的 P)
8:0 辛酸	0.15	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
10:0 癸酸	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
12:0 月桂酸	0.08-0.13	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
14:0 豆蔻酸	0.07-0.24	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
14:1 肉豆蔻烯酸	0.12-0.13	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
15:0 十五酸	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
15:1 十五烯酸	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
16:0 棕榈酸	9.55-15.77	0.607	10.1	10.0 (0.625,0.802)	9.78 (0.148,0.313)	9.94 (0.455,0.644)	9.85 (0.249,0.441)
16:1 棕榈油酸	0.09-0.19	0.029	0.097	0.085 (0.003,0.028)	0.088 (0.038,0.124)	0.087 (0.027,0.105)	0.089 (0.029,0.109)
17:0 十七酸	0.09-0.15	0.640	0.111	0.114 (0.162,0.336)	0.113 (0.331,0.539)	0.114 (0.239,0.432)	0.113 (0.296,0.493)
17:1 十七烯酸	0.07-0.09	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
18:0 硬脂酸	2.70-5.88	0.136	4.28	4.03 (0.048,0.145)	3.98 (0.018,0.081)	4.05 (0.060,0.169)	4.06 (0.073,0.196)
18:1 油酸	14.3-32.2	0.010	21.8	19.8 (0.004,0.033)	19.5 (0.001,0.017)	19.9 (0.006,0.043)	19.9 (0.006,0.043)
18:2 亚油酸	42.3-58.8	0.145	50.3	52.5 (0.030,0.109)	51.9 (0.116,0.268)	52.6 (0.024,0.095)	52.0 (0.087,0.222)
18:3 γ-亚麻酸	3.00-12.52	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
18:3 亚麻酸	NR	0.022	7.83	8.23 (0.003,0.031)	8.15 (0.016,0.073)	8.10 (0.034,0.119)	8.21 (0.004,0.034)
20:0 花生酸	0.16-0.48	0.023	0.307	0.284 (0.007,0.045)	0.282 (0.004,0.033)	0.285 (0.009,0.052)	0.287 (0.014,0.067)
20:1 二十烯酸	0.14-0.35	0.683	0.143	0.140 (0.582,0.779)	0.136 (0.201,0.380)	0.141 (0.794,0.875)	0.138 (0.327,0.538)
20:2 二十碳二烯酸	0.08-0.25	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
20:3 二十碳三烯酸	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
20:4 花生四烯酸	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
22:0 山酸	0.28-0.60	0.053	0.305	0.288 (0.023,0.095)	0.285 (0.008,0.048)	0.288 (0.020,0.087)	0.288 (0.020,0.087)

[0473] a 组合的范围。

[0474] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0475] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0476] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0477] NA = 未显示统计学分析, 因为大部分数据小于 LOQ。

[0478] NR = 未报告

[0479] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0480] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0481] 实施例 8.2.5 : 维生素

[0482] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆粒样品中的维生素的分析。表 23 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0483] 在大豆粒中没有在 beta- 生育酚、delta- 生育酚、gamma- 生育酚、维生素 A、维生素 B5、维生素 B6、维生素 B12、维生素 C、维生素 D 和尼克酸 (niacin) 方面找到文献数值。beta 生育酚、维生素 A、维生素 B12 和维生素 D 均小于 LOQ。在对照、未喷雾的 AAD-12 和经处理的 AAD-12 间在维生素 B1、维生素 B2、维生素 B6、维生素 C、维生素 E 或尼克酸方面没有观察到差异。在那些具有可获得的文献范围的维生素中, 除了维生素 B2 (其中数值对于包括近等基因对照的所有处理超过所述范围) 外, 所有处理均落入这些范围内。

[0484] 基于未校正的 p- 值, delta- 生育酚水平在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 输入间显著不同。然而, 这没有伴随显著的经校正的 p- 值或总体处理效果。基于未校正的和经校正的 p- 值, gamma- 生育酚在对照与未喷雾的和大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 输入间显著不同。然而, 与近等基因对照相比, gamma 生育酚对于大豆事件 DAS-68416-4 处理高小于 11%。

[0485] 基于经校正的 p- 值, 维生素 B5 水平在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷输入间显著不同。然而, 这没有伴随显著的总体处理效果。

[0486] 基于未校正的 p- 值, 叶酸在对照与未喷雾的、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同。与对照相比, 叶酸对于两个大豆事件 DAS-68416-4 输入在经校正的 p- 值中也具有显著的差异。然而, 叶酸水平对于所有处理在报告的文献数值内, 并且大豆事件 DAS-68416-4 输入与近等基因对照相差 $<9\%$, 指示与非转基因大豆的等同。

[0487] 基于这些组成成分, 来自大豆事件 DAS-68416-4 的颗粒基本上等同于非转基因大豆的。

[0488] 表 23 : 大豆粒的维生素分析 (mg/kg 干重) 的汇总

[0489]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾的 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草 丁磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两 者 (P-值, 校正的 P)
Beta 胡萝卜素 (维生素 A)	NR	NA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
维生素 B1	1.01-2.54	0.560	2.10	2.14	1.94	1.97	2.14

[0490]

(硫胺素)				(0.809,0.886)	(0.312,0.517)	(0.414,0.615)	(0.787,0.873)
维生素 B2	1.90-3.21	0.994	4.49	4.52	4.60	4.52	4.55
(核黄素)				(0.933,0.952)	(0.677,0.819)	(0.922,0.948)	(0.817,0.891)
维生素 B3	NR	0.211	27.4	25.3	25.4	26.9	26.7
(尼克酸)				(0.060,0.169)	(0.076,0.201)	(0.698,0.831)	(0.513,0.708)
维生素 B5	NR	0.183	15.1	14.9	14.2	14.5	14.3
(泛酸)				(0.601,0.794)	(0.041,0.134)	(0.170,0.350)	(0.065,0.178)
维生素 B6	NR	0.788	5.50	5.51	5.40	5.40	5.39
(吡哆醇)				(0.929,0.951)	(0.439,0.634)	(0.451,0.642)	(0.420,0.620)
维生素 B12	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
维生素 C	NR	0.338	84.1	79.6	85.4	82.5	83.5
				(0.126,0.281)	(0.639,0.808)	(0.580,0.779)	(0.838,0.907)
维生素 D	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
维生素 E	1.90-61.7	0.182	14.8	15.1	14.5	15.9	14.3
(alpha-生育酚)				(0.762,0.863)	(0.611,0.796)	(0.137,0.301)	(0.439,0.634)
Beta-生育酚	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Delta-生育酚	NR	0.095	92.6	95.1	96.5	97.1	94.5
				(0.142,0.305)	(0.030,0.109)	(0.013,0.067)	(0.257,0.446)
Gamma-生育酚	NR	0.0004	153	164	158	169	157
				(0.002,0.021)	(0.117,0.268)	(0.0005,0.006)	(0.174,0.351)
叶酸	2.39-4.71	0.006	3.70	3.49	3.56	3.38	3.48
				(0.011,0.060)	(0.078,0.203)	(0.0004,0.009)	(0.008,0.048)

[0491] a 组合的范围。

[0492] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0493] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0494] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0495] NR = 未报告

[0496] NA = 未显示统计学分析, 因为大部分数据小于 LOQ。

[0497] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0498] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0499] 实施例 8.2.5 : 异黄酮

[0500] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆粒样品中的异黄酮的分析。表 24 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0501] 染料木黄酮和黄豆黄素结果低于测试样品的 LOQ。基于未校正的和经校正的 p- 值, 大豆苷水平在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂输入间显著不同。然而, 总体处理效果不是显著的。虽然没有报告的文献数值, 但是大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂处理与近等基因对照相差 <9%。基于未校正的和经校正的 p- 值, 染料木苷水平在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂输入间显著不同。然而, 总体处理效果不是显著的。所有处理的染料木苷数值高于报告的文献数值, 但是与近等基因对照相比, 大豆事件 DAS-68416-4 处理是小于 9% 不同的。基于未校正的和经校正的 p- 值, 黄豆黄素数值在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂间显著不同。虽然没有黄豆黄苷的报告文献数值,

但是与近等基因输入相比,所有大豆事件 DAS-68416-4 输入是小于 13%不同的。

[0502] 基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 大豆的颗粒基本上等同于非转基因大豆的。

[0503] 表 24 :大豆粒的异黄酮分析 ($\mu\text{g/g}$) 的汇总。

[0504]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 (Pr>F) ^b	对照	未喷雾的 (P-值, ^c 校正的 P) ^d	喷雾的草丁 磷 (P-值, 校正的 P)	喷雾的 2,4-D (P-值, 校正的 P)	喷雾的两 者 (P-值, 校正的 P)
大豆黄素	60.0-2454	NA	19.2	31.2	14.8	13.0	< LOQ
大豆苷	NR	0.068	1085	1103 (0.584,0.779)	1112 (0.391,0.589)	1128 (0.187,0.360)	1179 (0.007,0.045)
染料木黄酮	144-2837	NA	22.9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
染料木苷	NR	0.069	1282	1321 (0.292,0.490)	1327 (0.220,0.408)	1357 (0.052,0.152)	1389 (0.007,0.044)
黄豆黄素	15.3-1070	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
大豆黄苷	NR	0.032	253	267 (0.142,0.305)	270 (0.076,0.201)	268 (0.121,0.274)	285 (0.002,0.021)

[0505] a 组合的范围。

[0506] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0507] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0508] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0509] NA = 未显示统计学分析,因为大部分数据小于 LOQ。

[0510] NR = 未报告

[0511] 粗体指数 (mean) 值在报告的文献范围外部。

[0512] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0513] 实施例 8.2.5 :抗营养物

[0514] 实施对来自对照、未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 两种除草剂的大豆粒样品中的抗营养物的分析。表 25 中显示了所有位置间的结果的汇总。

[0515] 在对照与转基因输入间在凝集素、肌醇六磷酸、或胰蛋白酶抑制剂方面没有观察到统计学差异。这三种抗营养物也都在文献范围内,指示与非转基因大豆的等同。

[0516] 基于未校正的 p- 值,与对照相比,棉子糖对于大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷处理显著更低 (<10%)。基于经校正的 p- 值或总体处理效果,棉子糖在位置间分析中不是显著差异的。棉子糖水平对于所有处理也在报告的文献数值内,指示与非转基因大豆的等同。

[0517] 基于未校正的 p- 值,水苏糖在对照与大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷输入间显著不同。基于经校正的 p- 值或总体处理效果,水苏糖水平在位置间分析中不是显著差异的。水苏糖水平对于所有处理也在报告的文献数值内,指示与非转基因大豆的等同。

[0518] 对凝集素、肌醇六磷酸、棉子糖、水苏糖和胰蛋白酶抑制剂的抗营养物分析均在报告的文献数值内,并且与对照相比,基于未校正的 p- 值的两个显著差异对于大豆事件 DAS-68416-4 处理具有更低的抗营养物水平。

[0519] 基于这些组成成分,来自大豆事件 DAS-68416-4 大豆的颗粒基本上等同于非转基因大豆的。

[0520] 表 25 :大豆粒的抗营养物分析(%干重)的汇总。

[0521]

分析物	文献数值 ^a	总体处理效果 果(Pr>F) ^b	对照	喷雾的草丁 未喷雾的 磷 喷雾的 2,4-D 喷雾的两者 (P-值, ^c (P-值, 校正 (P-值, 校正 (P-值, 校正 校正的 P) ^d 的 P) 的 P) 的 P)			
凝集素 (H.U./mg)	0.11-9.04	0.552	2.18	2.74 (0.333,0.540)	2.84 (0.254,0.444)	2.98 (0.176,0.351)	3.09 (0.124,0.277)
肌醇六磷酸	0.63-1.96	0.725	1.20	1.20 (0.949,0.962)	1.22 (0.673,0.819)	1.21 (0.896,0.936)	1.25 (0.253,0.444)
棉子糖	0.1-0.9	0.111	0.344	0.339 (0.753,0.860)	0.310 (0.033,0.118)	0.317 (0.082,0.210)	0.315 (0.062,0.173)
水苏糖	1.2-4.1	0.217	2.42	2.34 (0.378,0.575)	2.23 (0.027,0.105)	2.28 (0.105,0.253)	2.32 (0.231,0.425)
胰蛋白酶抑制剂 (TIU/mg)	19.6-184	0.435	25.3	27.2 (0.204,0.383)	24.7 (0.657,0.819)	24.9 (0.748,0.860)	25.3 (0.973,0.979)

[0522] a 组合的范围。

[0523] b 使用 F- 检验评估的总体处理效果。

[0524] c 使用 t- 检验比较转基因处理与对照。

[0525] d 使用假发现率 (FDR) 规程校正的 P- 值。

[0526] 粗体指数值在报告的文献范围外部。

[0527] 粗体 P- 值是显著的 (<0.05)。

[0528] 实施例 8.3 :颗粒和饲料组成的汇总

[0529] 大豆事件 DAS-68416-4 的组成与近等基因系统计学不能区别,与近等基因系相差小于 13%,或在非转基因大豆的文献范围内。如此,发现大豆事件 DAS-68416-4 基本上等同于非转基因大豆。组成结果的样品在未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 大豆和对照大豆系两者间没有指示任何生物学上有意义的处理相关组成差异。总之,未喷雾的大豆事件 DAS-68416-4、大豆事件 DAS-68416-4+ 草丁磷、大豆事件 DAS-68416-4+2, 4-D 和大豆事件 DAS-68416-4+ 这两个组成结构确认大豆事件 DAS-68416-4 和常规大豆的等同。

[0530] 实施例 9 :种植前烧毁应用和出土前试验

[0531] 此实施例描述了本发明使之成为可能的种植大豆作物和使用除草剂的新方法。

[0532] 种植前烧毁除草剂应用意图杀死已经在种植给定作物前在冬季或早春里出现的杂草。通常,这些应用在不整地种植 (no-till) 或减少耕作管理系统 (其中在种植前未完成对杂草的物理除去) 中应用。因此,与不整地种植或减少耕作大豆结合使用的除草剂项目必须控制一大批种植时间前存在的阔叶和禾本科杂草。

[0533] 草甘膦、对草快 (gramoxone)、和草丁磷是广泛用于种植前烧毁除草剂应用的非选择性、非残留除草剂的例子。然而,一些杂草由于下列一项或多项因素而难以用此类除草剂控制:杂草物种或生物型对除草剂的固有不敏感性、冬性一年生杂草相对较大的尺寸、和限制除草剂吸收和活性的冷气候条件。对于具有这些除草剂的罐混合物可用几个除草

剂选项,以提高对杂草(其中非选择性除草剂是不充分的)的谱和活性。一个例子是使用 2,4-D+ 草甘膦罐混合物应用以帮助控制小白酒草(*Conyza Canadensis*)(加拿大飞蓬(horseweed))。对于种植前烧毁控制大多数存在的杂草,可以使用 420 至 1680g ae/ha,更典型地,560 至 840g ae/ha 的草甘膦;然而,可以应用 280-1120g ae/ha²,4-D 以帮助控制许多阔叶杂草物种(例如加拿大飞蓬)。

[0534] 2,4-D 是一种选择的种植前除草剂,因为它对于一大批阔叶杂草是有效的(甚至于相对较低的温度),并且极其便宜。然而,若烧毁应用后种植的作物对 2,4-D 敏感(例如,大多数双子叶作物),则土壤中的 2,4-D 残留(尽管短暂)可以使植物损伤。对于与大豆一起使用,许多 2,4-D 酯除草剂标签限制新植物的种植,直至在 1lb ai/acre 的烧毁应用后至少 15 天。在 2,4-D 低挥发性酯配制剂的情况中,用于烧毁的多至 0.5lb ai/ 英亩的比率通常需要在应用后 7 天种植,而 1.0lb ai/ 英亩的比率通常需要应用后 30 天种植。在 2,4-D 胺产品(其是水溶性的)的情况中的一项额外的忧虑是除草剂可以浸入种子区中。然而,含有 aad-12 基因的作物耐受 2,4-D,并且不受土壤中 2,4-D 残留负影响。由于此耐受性,可以在没有持续损伤的烧毁后比不含 aad-12 基因的植物更早种植含有 aad-12 基因的植物。此外,2,4-D 除草剂及罐混合物(或商业预混合物)配偶物的灵活性升高和成本降低会改善杂草控制选项,并且在重要的不整地种植和减少耕作情况中提高烧毁应用的稳健性。

[0535] 在种植前 7 天、15 天或 30 天对含有 aad-12 基因的大豆(事件 DAS-68416-4)和对照大豆以 1120、2240、4480g ae/ha 的比率应用 2,4-D 胺的出土前应用。使用本领域公认的规程对位于地理上独特地点的田间样地应用出土前应用。将经除草剂处理的样地与未处理的样地配对以提供出土和早期季节生长的精确评估。在种植和种植前 7、15 或 30 天的 2,4-D 应用后;测量含有 aad-12 基因的大豆(事件 DAS-68416-4)和对照大豆的损伤。田间测试的结果指示含有 aad-12 基因的大豆(事件 DAS-68416-4)对种植前 7、15 或 30 天的 2,4-D 除草剂的出土前处理提供稳健的耐受性。

[0536] 这些例子是可用的许多选项中的几个。杂草控制领域的技术人员会注意到例如通过利用联邦除草剂标签(CPR, 2003)中所描述的产品和 Agrilience 作物保护指南(Crop Protection Guide)(2003)中所描述的用途实现的许多其它应用,包括但不限于对草快+2,4-D 或草丁磷+2,4-D。本领域技术人员还会认可,上述例子可以适用于任何 2,4-D- 敏感性(或其它苯氧基生长素除草剂)作物,其会受到 AAD-12 基因保护(若稳定转化的话)。

[0537] DAS-68416-4 大豆耐受除草剂 2,4-D。本实施例报告了在田间条件下表征 DAS-68416-4 大豆的除草剂耐受性。在美国进行的田间试验中对 DAS-68416-4 大豆评估对除草剂 2,4-D 的耐受性。对于 DAS-68416-4 大豆,提出的最大应用比率对于 2,4-D 会是 1120g ae/ha。下文讨论的数据指示 DAS-68416-4 大豆提供了为这些提出的最大使用比率至少 4 倍的比率的可接受耐受性。

[0538] 在田间研究中表征 DAS-68416-4 大豆解毒 2,4-D 及随后提供保护免于由此化合物引起的损伤的功效。将试验设计为评估对 2,4-D 的出土前耐受性。以随机化完全区组设计进行出土前试验。实验单元由用于出土前试验的两行样地(长度为约 3m)组成,并且所有试验含有三个重复。用投递约 140 - 190l/ha 喷雾体积的气体加压小样地喷雾设备进行所有除草剂应用。所使用的 2,4-D 配制剂是 456g ae/ 升二甲基铵盐。在植物出现后约 7 天采取视觉损伤评级。按 0 至 100 量表采取评级,其反映在样地中的所有植物间观察到的所

有损伤症状的视觉合成 (visual composite), 其中 0 = 与未处理的样地相比没有损伤, 且 100 = 所有植物死亡。

[0539] 出土前试验由种植后但在作物出现前应用的 1120、2240、和 4480 g ae/ha 组成。表 26 中呈现了关于出土前试验的信息。

[0540] 表 26 : 关于 2, 4-D 出土前耐受性试验的位置和处理信息。

[0541]

DAS 试验No.	城市	州	土壤类 型	pH	% OM	种植日期	应用 日期	第1次 降水 (应用后 的天数)	量 (cm)
DCR0823	Rose-mount	MN	壤土 砂	6.9	4.3	05/20/2008	05/23/ 2008	5.0	0.3
DMS0828	Fowler	IN	Y C. L.	5.8	1.4	05/29/2008	05/29/ 2008	1.0	5.6
JSR0803	Green-ville	MS	粉土	7.8	2.0	05/09/2008	05/09/ 2008	1.0	0.6

[0542] 总之, 进行 2, 4-D 耐受性的田间评估。在密西西比、印地安那州、和明尼苏达州的位置进行检查 DAS-68416-4 大豆和未转化的 Maverick 大豆对 2, 4-D 胺出土前应用的响应的研究。在三个位置间取平均值, 2, 4-D 胺对 DAS-68416-4 的出土前应用导致 ≤ 2% 损伤, 而不管应用比率 (表 27)。相同处理对未转化的 Maverick 引起 34 至 60% 损伤。来自出土前应用 2, 4-D 的损伤由群落地段损失和生长降低组成。

[0543] 表 27 : DAS-68416-4 大豆对出土前应用 2, 4-D 的耐受性。

[0544]

除草剂	比率 ^a	应用阶段 ^b	百分比植物损伤 ^c	
			DAS- 68416-4	Maverick

[0545]

2,4-D胺	1120 g ae/ha	出土前	2 ns	34 b
2,4-D胺	2240 g ae/ha	出土前	2 ns	58 a
2,4-D胺	4480 g ae/ha	出土前	0 ns	63 a

[0546] a ae/ha = 酸性等同物 / 公顷

[0547] b 就大豆植物生长发育而言的应用阶段。

[0548] c 后面有相同字母的每栏内的均值不是显著不同的, 如通过用于混合模型和图基 (Tukey) 的限制性最大似然法 (restricted maximum likelihood method) 或对于未平衡的数据, Tukey-Kramer HSD 检验 (0.05) 测定的。ns 标示没有显著差异。

[0549] 实施例 10 : 组合使用草甘膦耐受性基因 + 大豆事件 DAS-68416-4 来控制草甘膦抗性杂草的方法

[0550] 广泛使用草甘膦, 因为它控制一大批阔叶和禾本科杂草物种。然而, 草甘膦在 GTC 中及在非作物应用中的重复使用已经, 并且将继续选择向天然地更耐受的物种或草甘膦抗

性生物型的杂草转变。以提供对相同物种的控制的有效率使用但具有不同作物模式的罐混合物除草剂配偶物被大多数除草剂抗性管理策略规定为一种延迟抗性杂草出现的方法。叠加 416AAD-12 事件与草甘膦耐受性性状（和 / 或与其它除草剂耐受性性状）可以提供容许控制 GTC 中的草甘膦抗性双子叶杂草物种的机制，其通过使草甘膦、苯氧基生长素（例如，2, 4-D）和吡啶基氧基乙酸酯生长素除草剂（例如定草酯）能够在相同作物中选择性使用来进行。这些除草剂的应用可以同时包含两种或更多种不同作用模式的除草剂的罐混合物中；在序贯应用中以种植前、出土前、或出土后和分开的应用时机（范围为约 2 小时至约 3 个月）单独应用单一除草剂组分；或者，备选地，可以在种植作物的约 7 个月直到收获作物（或个别除草剂的收获前时间间隔，以最短者为准）内的任何时机应用代表每种化学类别的大量除草剂的任何组合。

[0551] 重要的是，就应用时机、个别除草剂的比率、和控制困难的或抗性的杂草的能力而言在控制广谱的禾本科和阔叶杂草中具有灵活性。在具有草甘膦抗性基因 /AAD-12416 事件叠加的作物中的草甘膦应用的范围可以为约 250-2500g ae/ha；苯氧基生长素除草剂（一种或多种）可以应用约 25-4000g ae/ha；且吡啶基氧基乙酸酯生长素除草剂（一种或多种）可以应用 25-2000g ae/ha。这些应用的最佳组合和时机会取决于特定的情况、物种、和环境，并且杂草控制领域中的且具有本公开内容益处的技术人员会最好地确定。

[0552] 北美洲种植的大多数棉、芸苔、玉米、和大豆耕地含有草甘膦耐受性 (GT) 性状，并且 GT 玉米的采用在增加。其它 GT 作物（例如，小麦、稻、甜菜、和草地）已经在开发中，但是至今尚未商业推广。许多其它草甘膦抗性物种处于实验到开发阶段（例如，苜蓿、甘蔗、向日葵、甜菜、豌豆、胡萝卜、黄瓜、莴苣、洋葱、草莓、番茄、和烟草；林业物种，如杨树和香枫；和园艺物种，如金盏花、矮牵牛、和秋海棠；isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 年于万维网）。GTC 是用于由此系统控制的杂草的绝对宽度和由此系统提供的便利和成本有效性的有价值的工具。然而，草甘膦作为新标准基本处理的效用选出草甘膦抗性杂草。此外，草甘膦本质上对之不太有效的杂草转变成正实施仅有草甘膦的化学项目的田间的主要物种。通过叠加 AAD-12 事件 416 与 GT 性状（或是经由常规的育种或共同地作为新的转化事件进行），可以改善杂草控制功效、灵活性和管理杂草转变和除草剂抗性形成的能力。通过用 AAD-12 事件 416 转化作物，单子叶作物会具有更高的苯氧基或吡啶基氧基生长素安全性限度，并且可以在双子叶作物中选择性应用苯氧基生长素。可以设想用于改善的杂草控制选项的几种情况，其中将 AAD-12 事件 416 和 GT 性状在任何单子叶或双子叶作物物种中叠加：

[0553] a) 可以以标准的出土后应用率 (420 至 2160g ae/ha, 优选地 560 至 840g ae/ha) 应用草甘膦以控制大多数禾本科和阔叶杂草物种。为了控制草甘膦抗性阔叶杂草，如小白酒草或本质上难以用草甘膦控制的杂草（例如，距草 (*Commelina* spp)、番薯 (*Ipomoea* spp) 等)，可以与草甘膦序贯、罐混合地、或作为预混合物应用 280-2240g ae/ha (优选地，560-1120g ae/ha) 2, 4-D 以提供有效控制。对于定草酯，应用率的范围通常会为 70-1120g ae/ha，更通常为 140-420g ae/ha。对于氟草烟，应用率的范围通常为 35-560g ae/ha，更通常为 70-280ae/ha。

[0554] b) 目前，GTC 中应用的草甘膦比率的范围一般为每个应用时机 560 至 2240g ae/ha。草甘膦对禾本科物种远比对阔叶杂草物种更有效。AAD-12 事件 416+GT 叠加的性状会

容许草甘膦的禾本科有效率 (105-840g ae/ha, 更优选地, 210-420g ae/ha)。然后, 可以与禾本科有效率的草甘膦序贯、罐混合地、或作为预混合物应用 2, 4-D (为 280-2240g ae/ha, 更优选地 560-1120g ae/ha) 以提供必要的阔叶杂草控制。上文提及比率的定草酯和氟草烟在处理方案中会是可接受的组分。低比率的草甘膦还会对阔叶杂草控制提供一些优点; 然而, 主要的控制会来自 2, 4-D、定草酯、或氟草烟。

[0555] 杂草控制领域中的技术人员会认可, 通过对作物的 AAD-12 事件 416 转化实现单独或组合 (连续或独立地) 使用一种或多种商业芳氧基生长素除草剂。代表这些化学品的其它除草剂的比率 (Specific rate) 可以由在 CPR (作物保护参考 (Crop Protection Reference)) 书籍或类似的汇编物中汇编的除草剂标签、在线汇编的标签 (例如 cdms.net/manuf/manuf.asp), 或任何商业或学术作物保护指南诸如来自 Agrilience 的植物保护指南 (2005) 确定。认为通过 AAD-12 事件 416 对在 HTC 中使用实现的每种备选的除草剂 (无论是单独、罐混合、或序贯使用) 在本发明的范围内。

[0556] 参考文献

[0557] Severson, David W (Genomic Mapping Techniques, chapter 26th, RFLP analysis of insect genomes)

[0558] Stam M., Mol. J. N. M. and Kooter J. M., (1997) The Silence of Genes in Transgenic Plants Annals of Botany 79:3±12, 1997

[0559] Hood, E. E. ; Helmer, G. L. ; Fraley, R. T. ; Chilton, M. -D. The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA, Journal of Bacteriology, 1986 168 (3): 1291-1301.

[0560] Zeng, P. ; Vadnais, D. A. ; Zhang, Z. ; Polacco, J. C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], Plant Cell Reports 2004 22: 478 - 482

[0001]

序列表

<110> 陶氏益农公司 (Dow AgroSciences, LLC)

<120> AAD-12 事件 416, 相关的转基因大豆系及其事件特异性鉴定

<130> DAS-P0170-W0

<150> US 61/263,950

<151> 2009-11-24

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10212

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 1

```

cgtcgttgg attcacagaa catgacgcc agtttcaact tegttaicct tgaattcatt      60
aaaatcgaat ctctacaceta tccccccca tttttctaat ccatcataat caaaattcat      120
aaatgaatca gttaccatta ccataatacc tttttgaaaa tgagtttgaa taatcagtat      180
ctttagaaaa ctaaitaaga aattaataa aaaataitta tcaigaagat gagtgaaga      240
aaaattatga aaagtataac ttatacatt tctataaaat tatittttct titaatttct      300
taattaatat cctaagtaaa tgagttaata ttatctttc aaaaattctt atagtcgcca      360
attaatitct ccattgcaatg acaacttgc cgtattctac gttgtaggtt aggtacctg      420
ccgagacaaa ttgccttgag acaaatitca tagagaacc ttccaaggga ccattataa      480
tagagaactt tcattaacgg ataagccaca cctttcaat caaacacaaa cacttgaagt      540
actaagttag tgtgtttgag caaattaact atggtctctg ttgtttctag attgacaatt      600
tgtttggctc tgtttgtcct catatggggg agtgccaatg cacaacttcc tacaacttt      660
tactaccatt caigtccaaa cctcttctcc ttgtgaaat ccacagtga atctgccata      720
tctaaggaga ccgcattggg tctctctc ctctcctgt tcttccacga tigtttgtc      780
aatgtaaatt atttgacct tctccactt acatacaaat atgctaagct tacatatagc      840
tctcttttct accacttga tgcattctt aattttgttt gaaacaacac ttgttcttt      900
tattatcac atcatctttg ataaaatttt gtctgttga acttttttt agtgtgttaa      960
tcagttctat gatgatacta ttagttaaga aattttaatg cacttaataa accattttaa      1020
gtactttaac cgttcaatga tattatata taaagataa taaataattc tctttttgt      1080
tctatattag tgtagttaag aaccttcta ctctttagct agctaaatat taatgagraa      1140
acattaacaa atgcagggat gtgatgttc aattctattg gatgacacat caagcttcac      1200
cggagagaag aacgcaacc ccaacaggaa ctctgctcgt ggattcgagg ttattgacaa      1260
cattaaatca gccgttgaga aagtgtgtcc aggatttgtt tcttgcgcag atatccttgc      1320
catcgtgcc agagactctg ticagattgt aagtggicac acaaccaaca aaaacacatt      1380
aaactaaatc attaaattgt acatatcaaa attaatfacc aatttagtac cacacatgca      1440
attaaagaga acattttgtt gattttgatc aatatagctt ggaggcccta catggaatgt      1500
taaacttga agaagagacg ctgaactgc tagccaatct gctgctaaca atggcatccc      1560
tgcacccact tcaaacctta accaactcat ctcaagattt agcgtctttg gactttccac      1620
caaggacttg gtgccttgt ccggtacaaa acatatatca cataatttcc caattaatta      1680

```

[0002]

catttcaatc atatagtaaa atttctcaat taattaggaa catgagaac ttatagtcac	1740
acgttctttt gttaggaat attgcatggt ttaattttgc ttccattagg tggtcacaca	1800
attggacaag caaggigcac aaacttcaga gcccgcatct acaacgagac caacatagaa	1860
accgcatttg caaggactag gcagcaaagc tgccttagaa catcagggtc aggggacaaac	1920
aatctggcac cacttgaict tcaaaactcca accagctttg acaactacta ctccaagaac	1980
ctcgttcaga agaagggtct cctccactct gaicagcaac tgttcaacgg tgggtccaac	2040
gactecattg tgcgtggcta cagcaccac ccgggcacct tctctcttga ttctgcgcgc	2100
gccatgatca agatgggaga cattagtctt ctcactggct ccaatggaga aatcaggaag	2160
aattgtagaa ggattaaacia atttgattca gtcttgaata ttaagggtcc taccatacag	2220
caagcaattt aattgtgttt aataagtgtt taaaacatgt ttgtgttgta ttltggattc	2280
ctagtgtagt ttccgtgata aatgcgtctt actttagtgt gtctacttcc cctttatttt	2340
tgtttctttt ttacttttcc cttaactata ttgtaggaaa aaaaaatcc ttatcaagc	2400
atttatcaag aacggagitt gctttttaat ttcccttca taacattcca tcagaattca	2460
gttttgcitt tgccttcaaa ttacgttcaa atcagggaag ataactgggt aggtataata	2520
tacagtacc cttgcatagt cactttgaa aaataataac atacttagtt cggtaacaat	2580
ttaaatlata attctcglaa tcatlagcta ctatgcact catatccgta tccgtacttt	2640
gtcttgtctg taagtcasia aattaalala aaaaaatct taaaacttgi tacaactaaa	2700
ttaaaaattt atttttaaat catlcaagca ccagtcagca tcatcacacc aaaagttagg	2760
cccgaaatgt ttgaaattag aaagctcgca attgaggtct acaggccaaa ttgcctctta	2820
gccgtacaat attactacc ggatcctaac cgggtgtagc atgggccgcg attaaaaatc	2880
tcaattatai ttggictaat itagtittgt attgagtaaa acaaatcga accaaacca	2940
aatataaata tatagtffff atataiatgc cttaaagact tttaatagaa tticttttaa	3000
aaaatactta gaaatatttg cgaactctct ggcattgtaat atttcgttaa atatgaagtg	3060
ctccattttt attaacctta aataattgtt tctacgatca ctctcttacc aagtgttact	3120
aaaatgcgtc aatctcttgg ttcttccata ttcatatgic aaaacctatc aaaattctta	3180
tatatctttt tcgaatttga agtgaatttt cgataattta aaattaaata gaacatatca	3240
ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa atttggttaa ctttgaaagt	3300
gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaaataata aataatcgtt gttattaaga	3360
aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg taaaaaaaat taatttttac	3420
taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag attaaaataa taticatcta	3480
acaaaaaaaa aaccagaaaa tgcgtgaaac ccggcaaaac cgaaccaatc caaaccgata	3540
tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact cgggtccattt gcacccctaa	3600
tcataatagc tttaataatt cagatattta ttaagttaac gtgtcaata tccgtgaaat	3660
tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taataatgaat ttaaaagcag ctcatgttgg	3720
tggtaataat taatttactt gattctaaaa aaatatccca agtatataa attcttgcct	3780
ggaagaaggi tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac aatgaacctt aaagtattg	3840
aagctcgaaa tatatgaagg aacaaaattt tttaaaaaaa tacgcaatga cttggaacaa	3900
aagaaagtga tatatttttt gtctttaaac aagcatcccc tctaaagaat ggcagttttc	3960
ctttgcattt aactattatg ctccctctgt tacaaaaatt ttggactact attgggaact	4020
tcttctgaaa atagtggcca ccgtttaatt aaggcgcgcc atgcccgggc aagcggcgcg	4080

[0003]

acaagtittgt	acaaaaaagc	aggctccgcg	gtgactgact	gaaaagcttg	tcgacctgca	4140
ggtaacagga	tcaggatatt	cttgtttaag	atgttgaact	ctatggaggt	tgtatgaac	4200
tgatgaicfa	ggaccggata	agttcccttc	ttcatagcga	acttatcca	agaaigtitt	4260
gtgtatcatt	cttgttiacat	tgttattaat	gaaaaaata	tattggtcac	tggactgaac	4320
acgagtgtaa	aatatggacc	aggccccaac	taagatccat	tgaatatga	attaaaaaac	4380
aagaataaai	cgagtcacca	aaccacitgc	cttttttaac	gagacttggt	caccaacttg	4440
atacaaaagt	cattatccta	tgcataatca	taatacata	aaaatatcca	ataacactaa	4500
aaaattaaaa	gaaatggata	atttcacaat	atgttatagc	ataaagaagt	tacttttcca	4560
agaaatcac	tgtttttata	agccacitgc	cattagataa	atggcaaaaa	aaaacaaaaa	4620
ggaaaagaaa	taaagcacga	agaattctag	aaaatcacga	atacgttcca	atgcagtggg	4680
acccacgggt	caattattgc	caattttcag	ctccaccgta	tatttaaaaa	ataaacgat	4740
aatgctaaaa	aaataaaat	cgtaacgaic	gttaaatctc	aacggctgga	tcctatgacg	4800
accgttagaa	attgtgggtg	tcgacgagtc	agtaataaac	ggcgtaaac	tgtttgcagc	4860
cggcacacac	gagtcgtgtt	taicaactca	aagcacaaat	acttttccct	aacctaaaaa	4920
taaggcaatt	agccaaaaac	aacttttgcg	gtaaacaacg	ctcaatacac	gtgtcatttt	4980
attattagct	attgtttcac	cgccttagct	ttctcgtgac	ctagtcgtcc	tcgtcttttc	5040
ttcttcttct	ttctataaac	aalacccaaa	gtttcttctt	cacaattcag	atttcaattt	5100
ctcaaaaatc	taaaaacttt	ctctcaattc	ttcttaccgt	gatcaaggta	aatttctgtg	5160
ttccttattc	ttcctaaaa	ttcgattttg	ttttcgttcg	atcccaattt	cgtaatgttt	5220
ctttgtttta	gattctgtta	atcttagatc	gaagacgaat	ttctgggttt	gacgtttaga	5280
taicacttta	attctcgatt	agggtttcat	aaatatcaic	cgaattgttc	aaataatttg	5340
agttttgtcg	aaataaffac	cttcgatttg	tgaattctat	ctagaatcgg	tgttagtttc	5400
tagttttgtc	gatcgaattt	gtcgattaat	ctgagttttt	ctgatiaaca	gagatctcca	5460
tggctcagac	cactctccaa	atcacacca	ctggtgccac	cttgggtgcc	acagtcactg	5520
gtgttcacct	tgcacacatt	gacgatgtcg	gtttcgtctc	ctctcatgca	gccgtgcttc	5580
aaatgcactc	cttgatcttc	cttgggcaac	acctcagcaa	tgaaccaacg	attacccttt	5640
ctaaacgctt	tggagcaatt	gagaggattg	gcggaggtga	caattgttgc	atatccaatg	5700
tcaaggcaga	tggcacagtg	cgcacagact	ctcttcttga	gtgggatgac	atgatgaagg	5760
tcatttgagg	caacatggcc	tggcacgcgc	actcaacctc	catgccagtc	atggctcaag	5820
gagcttgigt	cagcgcagaa	gttgccagc	cagttggggg	cagaacctgc	tttcttgaca	5880
tgagggcagc	ctacgatgcc	cttgatgagg	caacctgtgc	tcttggtcac	caaaggctcg	5940
ctcgtcactc	ctttgtgtat	ttctcagaca	agttgggaca	tgtccaacag	gccgggtcag	6000
cctacatagg	ttatggcaig	gacaccactg	caactcctct	cagaccattg	gtcaaggctc	6060
atcctgagac	tggagggccc	agcctcttga	tcggccgccca	tgcctatgcc	atccttgcca	6120
tggatgcagc	tgaatcagag	cgttctcttg	aaggacttgt	tgaactggcc	tgcaggcttc	6180
ccagagtcac	tgttcaccaa	tgggtctctg	gagatgttgt	tgttggggac	aacgcgtgtt	6240
tgtctccacc	tgttgagccc	tgggatitca	agttgccacg	tgtgatgttg	cactccagac	6300
tcgttggacg	cccagaaaat	gaggggtctg	ccttgggttg	agtagttagc	ttatcacctt	6360
agagctcggg	caccagcata	atttttatta	atgtactaaa	ttactgtttt	gttaaatgca	6420
attttgcttt	ctcgggaatt	taataatcaa	atctattttg	aaatacaca	tattttgttg	6480

[0004]

caggcttgcg	ggagaatcga	tcgtctatca	taaaaattac	aaaaaaattt	tatttgcctc	6540
aattatltta	ggatttgfat	taaggacgct	taaattattt	gtcgggtcac	tacgcataat	6600
tgtgatigag	aagatcageg	atacgaanta	ttcgtagtac	tatcgataat	ttatttgaag	6660
attcataaga	aaagcaaacg	ttacatgaat	tgaigaaaca	atacaagac	agataaagcc	6720
acgcacattt	aggatatigg	ccgagattac	tgaatattga	gtaaatcac	ggaatttctg	6780
acaggagcat	gtcttcaatt	cagcccaaat	ggcagtigaa	atactcaaac	cgcgccatat	6840
gcaggagcgg	atcattcatt	gtttgtttgg	ttgcctttgc	caacatggga	gtccaagggt	6900
gcggccgcgc	gcgcaccag	ctttcttgtt	caaagtgggt	gcggccgcct	aattaaattt	6960
aaatgcccg	gcgttttaac	gcggccgcct	aattaaagcc	ggcctgcagc	aaaccagaa	7020
ggtaattatc	caagatgtag	catcaagaat	ccaatgttta	cgggaaaaac	tatggaagta	7080
ttatgtaagc	tcagcaagaa	gcagatcaat	atgcggcaca	tatgcaacct	atgticaaaa	7140
atgaagaatg	tacagatata	agatcctata	ctgccagaat	acgaagaaga	atacgtagaa	7200
atigaaaaag	aagaaccagg	cgaagaaaag	aatcttgaag	acgttaagcac	tgaagcacaac	7260
aatgaaaaga	agaagataag	gtcgggtatt	gtgaaagaga	catagaggac	acaigttaag	7320
tggaaaatgt	augggcggaa	agtaacctta	tcacaaagga	atcttatccc	ccactactta	7380
tccttttata	tttttccgig	tcatttttgc	ctttgagttt	tcctataaaa	ggaaccaagt	7440
tcggcatttg	tgaatacaag	aaaaaatitg	gtgtaagcta	ttttcttga	agtaactgag	7500
atacaacttc	agagaaattt	gtaagtittg	agatctccat	gtctccggag	aggagaccag	7560
ttgagattag	gccagctata	gcagctgata	tggccgcggt	ttgtgataac	gttaaccatt	7620
acattgagac	gtctacagtg	aacttttaga	cagagccaca	aacaccacaa	gagtgatttg	7680
atgatctaga	gaggttgcaa	gatagatacc	cttggtttgt	tgtctagggt	gaggtgtttg	7740
tggctgggtat	tgtttacgtt	gggccctgga	aggctaggaa	cgtttacgat	tggacagtig	7800
agagtaactgt	ttactgttca	cataggeatc	aaaggttggg	cctaggatcc	acattgtaca	7860
cacatttgct	taagtctatg	gaggcgcaag	gttttaagtc	tgtgtttgtt	gtttaaggcc	7920
ttccaaacga	ttcatctgtt	aggttgcatg	aggctttggg	atacacagcc	cgggtgtacat	7980
tgcgcgcagc	tggatataag	catggttgat	ggcatgatgt	tgttttttgg	caaagggtatt	8040
ttgagtigcc	agctcctcca	aggccagtta	ggccagtta	ccagatctga	ggtacctga	8100
gcttgagcct	atgagcttat	gagcttagag	ctcggatcca	ctagtacgg	cgcacagtgt	8160
gcctgaattc	gcccttgact	agataggcgc	ccagatcgcc	ggcaatagct	tcctagcgcc	8220
atcccgggtt	gactctatct	gtgttgaaat	agttgcgggt	ggcaaggctc	tccttcagaa	8280
agacaggcgg	ccaaggaac	ccaaggtag	gtgggtatg	gctctcagti	ccttgttgaa	8340
gcgcttggtc	taaggtagc	agggttagc	gggatgaagc	aaaagtgtcc	gattgttaaa	8400
agatatgttg	atcctacgtt	aggatattaa	agtatgtatt	catcactaat	ataatcagtg	8460
tattccaata	tgtactacga	tttccaatgt	ctttattgtc	gccgtatgta	atcggcgta	8520
caaaataatc	cccgttgact	ttcttttaat	ccaggatgaa	ataatgtgtt	attataattt	8580
ttgcgatttg	gtccgttata	ggaattgaag	tgtgtttgcg	gtcgcaccca	ctccatttc	8640
ataattttac	atgtatttga	aaaataaaaa	tttatgggtat	tcaattttaaa	cacgtatact	8700
tgtaaagaat	gatacttga	aagaaatata	gtttaaatatt	ttattgtata	aataacaagt	8760
caggtatttat	agtecaagca	aaaacataaa	tttatgtatg	caagtttaaa	ttcagaaata	8820
tttcaataac	tgattataac	agcttggtaca	ttgccgtaga	tgaagactg	agtcgatat	8880

[0005]

```

tatggigttaa tacatagcgg ccgggtttct agtcaccggt taggateggt ttaaactcga      8940
ggctagcgca igcacataga cacacacatc atctcatiga tgcctggtaa taattgtcat      9000
tagattgitt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa ttttagacaa gtaicaaacg      9060
gaigtgacit cagtacatta aaaacgtccg caatgtgita ttaagtgtc taagcgtcaa      9120
tatitttaatt cttacaatc aatattttaa ttcttaaaact ttattaaatc taacaataaa      9180
ctgtaagaac taattcttaa acitcaataa acaatacigc gtitttagtaa ttaaattaat      9240
aataataga tatagatata taattgtca acataattct accatatitc ccattgaaat      9300
aigttagcaa gltcaaaaa aglttgaca aaaaacicta ctacttttg tticattac      9360
tttaigtgag ggaataata gtaataaac atttagttta tttaagaaa ataaaaaagt      9420
taatttctct ttctgccact gactctctat ggtagagaga tccgatgcag tggtagagcc      9480
tggccctcag acataaggtt gacgacgcag ctgttgaaga gatctgatic gacggtgggg      9540
taatgcattg tggtagacag gttagtggtt ggagaagacg taattgtac cgcgcgaac      9600
ggaggaagga gcaaaagtgt ctctgatgtg aaaaattatc ggttagatg ccgtttcatt      9660
cccittaaaa aaatcccttg atggttgcaa tgcataataa aaatigaaa aataattaat      9720
tgttcaaatt aaagatttag catgaaaaaa aaaacactta atttgccca tgactccatg      9780
acctgcgtaa ctgggaagg aaaggaatit ttgtctaaa ggaaggcatg ggaagttag      9840
agaggagaga gaatcagtg aagtagaga aatlaacit ttgttttta aaaactaaa      9900
attatattac tattatatat atatatatat atatatataa gattttttag ctggattctt      9960
gatataaaaa attctcacc atatttatta ttatatatt ttgtgggat ctcaaaaaag      10020
gaagtggat ttctctcaa taactctaaa aaattattcc tattcaaaa aataattttt      10080
atgtctttct ctatattgat aataatact atttaagiat attttattg gaaaccaca      10140
aaagtgactg ataaatctaa tttaggatct accattagag aaaaataaat aaattcttat      10200
atttatgtg at.      10212

```

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物 (Primer)

```

<400> 2
tggaagaaca aagagatiga cgca      24

```

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物 (Primer)

```

<400> 3
gtaatagac tcactagg gc      22

```

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物 (Primer)

[0006]

<400> 4 acgaantatt acatgccaga agagtcgc	28
<210> 5 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 5 actatagggc acgcgtggt	19
<210> 6 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 6 ccgtagatga aagactgagt gcga	24
<210> 7 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 7 ccgtagatga aagactgagt gcgatatatt	30
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 8 cccttgcata gtcacgtttg	20
<210> 9 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 9 gtgttgccca gggaaaga	17
<210> 10 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物 (Primer)	
<400> 10 gtacttgct ctgttcgtaa gtea	24
<210> 11 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	

[0007]

<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	11	
	atgttgaagc caggctgc	18
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	12	
	gggcctaact ttgggtgta tg	22
<210>	13	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	13	
	tacttgcctt tgcgtgaagt caataaatt	29
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	14	
	gaacttgcta acatattica aigga	25
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	15	
	ccagttaggc cagttacca	20
<210>	16	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	16	
	gagtatcagt ggcagaaaga gaaat	25
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (Primer)	
<400>	17	
	cagggatgtg atggttcaat	20

[0008]

<210>	18	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	18	
	ttagatttat cagtcacttt tgggat	27
<210>	19	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	19	
	ttctgcittt gttctatat tagttagtt aa	32
<210>	20	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	20	
	tggtagatcc taaattagat ttatcagica	30
<210>	21	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	21	
	cttatgcact cataccgta tccg	24
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	22	
	atggaccgag ttggttcggt ttat	24
<210>	23	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	
<400>	23	
	ataaaccgaa ccaactcggt ccat	24
<210>	24	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物(Primer)	

[0009]

<400> 24	
tcccaacttg ctcctgagaat acac	24
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (Primer)	
<400> 25	
gtgtattctc agagcaagti ggga	24
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (Primer)	
<400> 26	
caatcgtaag cgttcctagc ctic	24
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 引物 (Primer)	
<400> 27	
gaaggctagg aacgcttacg atig	24
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (Primer)	
<400> 28	
ccaactgcatc ggatctctcc acca	24
<210> 29	
<211> 710	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 侧接 SNP 标记 (Flanking SNP Marker)	
<220>	
<221> misc-feature	
<222> (59).. (59)	
<223> n 是 c 或 g	
<400> 29	
tcacgcgaagt tgagggcccc cgcggaaaat tggfgcgaga ctccaagcac tgaatctng	60
attttcagct catcactgac gaaaacggta aaaggaagct gaaggtaggag gcctgggttcg	120
gtttctggaa aacatccgcc gccattcgca ccgccctgag ccacgtggag aatctgatca	180
cggcgctcac caagggttac cgtacaaaa tgaggttcgt ttatgcccat ttcccacatca	240
acgcaagcat cggcaacgac aacaagtcct ttgagatcag aaatttcctt ggcgaaaaga	300
aggtaacttta ctctcttcac ctctatttct tttaattart ttattttatt tcttaactct	360
tigtacttag gaaataaatt gtgtatttag gtttagtgat tgatttgsit aatcagtgta	420

[0010]

tcattagggtg agaaaagttg accctcttaa cgggtgttcc gttgttcgat ctgaaaaagt	480
taaagatgaa ttgatttttg atgggaacga cattgaactt gttcttaggt cctgtgctct	540
catiaaccag gtttaattct tctmcatgcr caigtitcca tacaattttt tctcaatttt	600
ggtattgggt tagggtttaa ttaattgttt atttattgtt ttgttacaga aatgccatgt	660
taaaaagaag gatatcagga aatttctcga tggcatttat gttagtgaga	710

<210> 30
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 侧接 SNP 标记(Flanking SNP Marker)

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (116)..(116)
 <223> n 是 a 或 c

<400> 30	
acagaatttc tgaacacact agccttgatt ttacattatct aaaacacatt tctttgtcct	60
acattcttct ctttcttcta ctctctatct tgggtactca aactctcttc cctaanaagg	120
attacaaaaa caaaagiata tctgatttgt agaaaaagca agaaatagaa actccacctc	180
tacaacgttt tcttaattgc gtccatgagc atcacttctt gcagttttgc ggttcaggta	240
acgaatgaca gcatcctcaa ccttgaagat attacaaaaa agaacacaaa caaattagaa	300
aattatttga caaaaaatat tatataatat tgtttgccct acatgacaca tatatcaatt	360
aaggattggg atgaaggggg ggcatacagc ctacagggtt tccaigtcat aacttataat	420
tctctgttat gataaataat ctatccaaca atttcatagt gaagccctat ggtattgtat	480
tacaattcct accagtfgcc acttaagaat ggacacgcct gacacacaa aatctgaaat	540
gaaatgtctt ggttttttct tgagtcacgt tgtgtctaac acaagtgtct ggtatagatg	600
cagcttcttt ttatgtigia tgattgtcaa catattaaac tccaacttt agcaagttaa	660
tactcacatt caggtcacaa ccgtactaaa caaacaagtg tattatggat atatatacct	720
aacaacaaaa agagaaaagg tcaagtgtca tcataatget taccatggtt gatgaagaat	780
cagaac	786

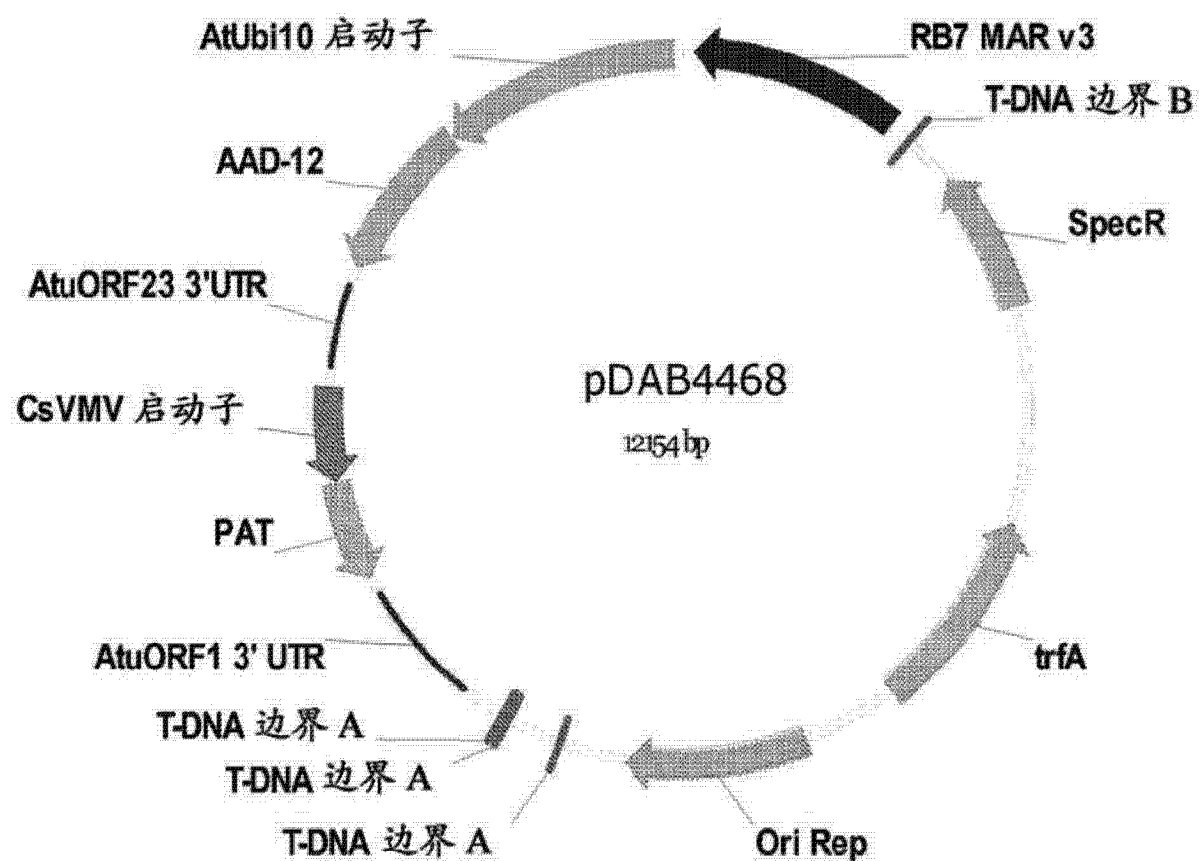


图 1

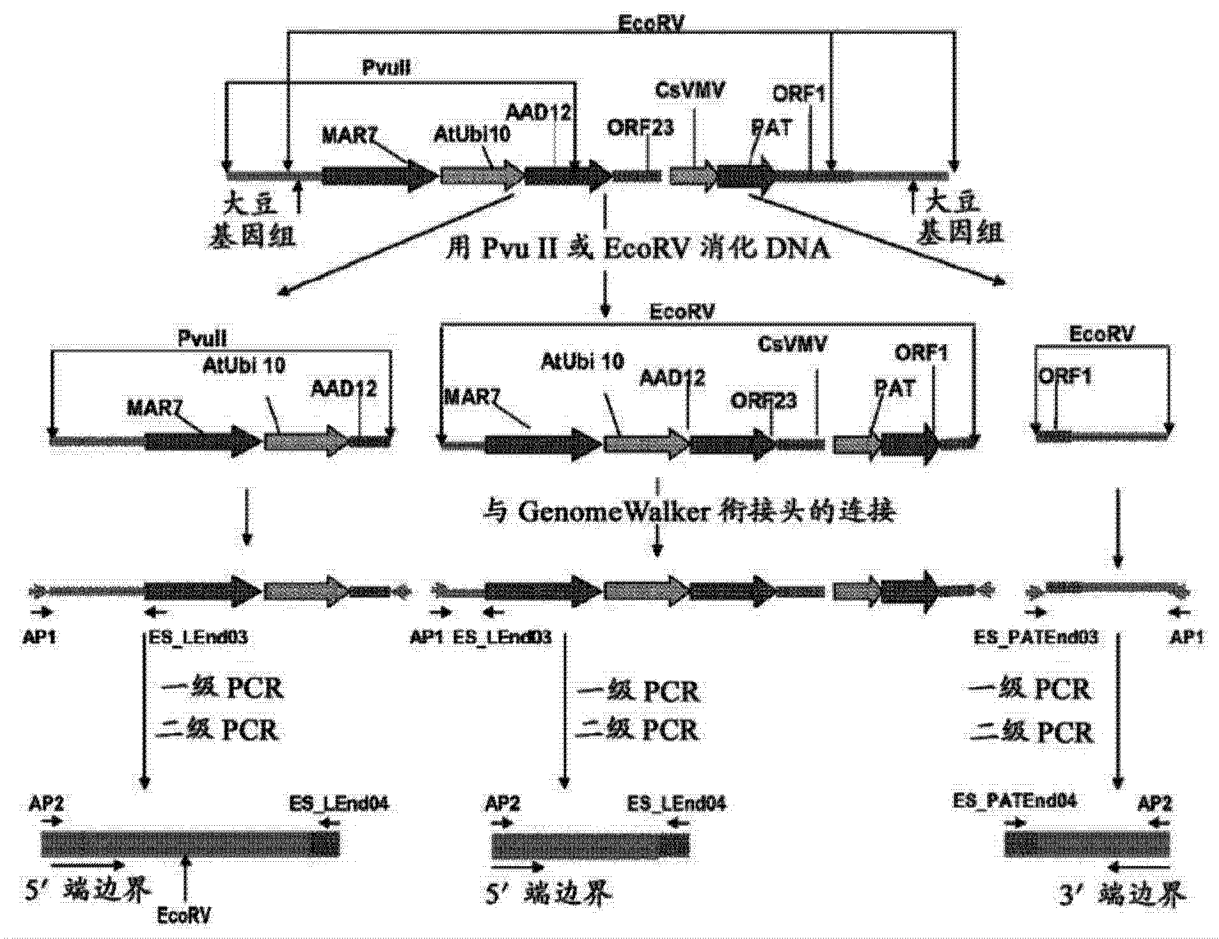


图 2

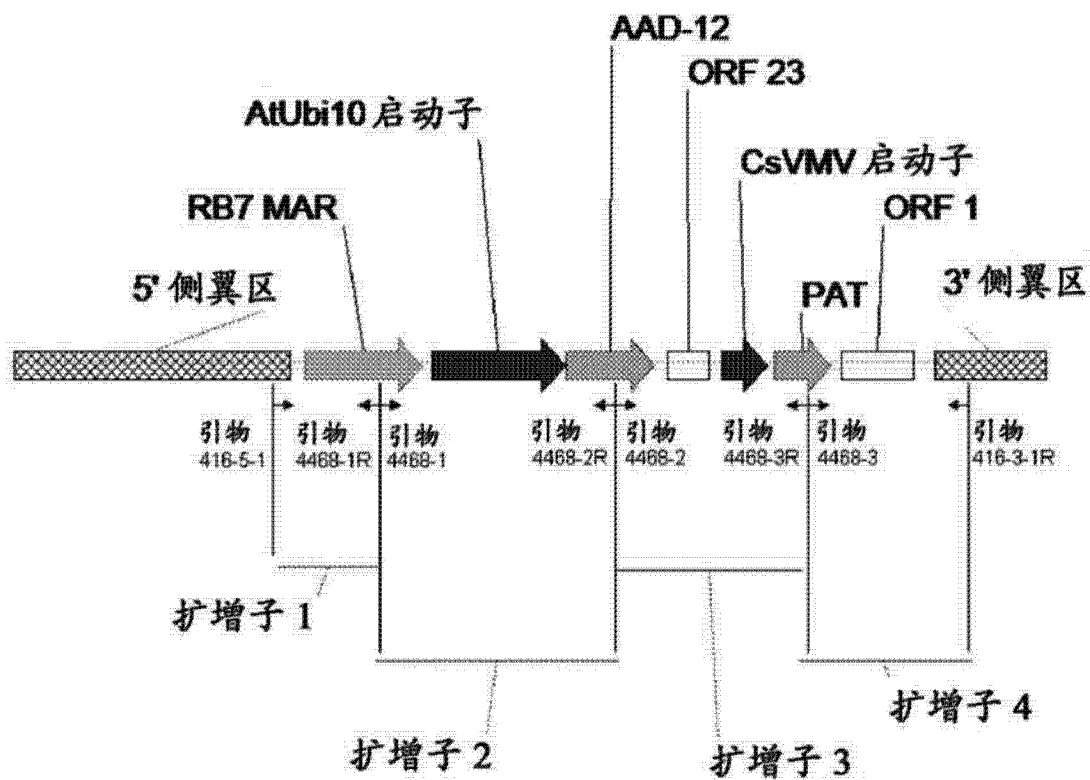


图 3

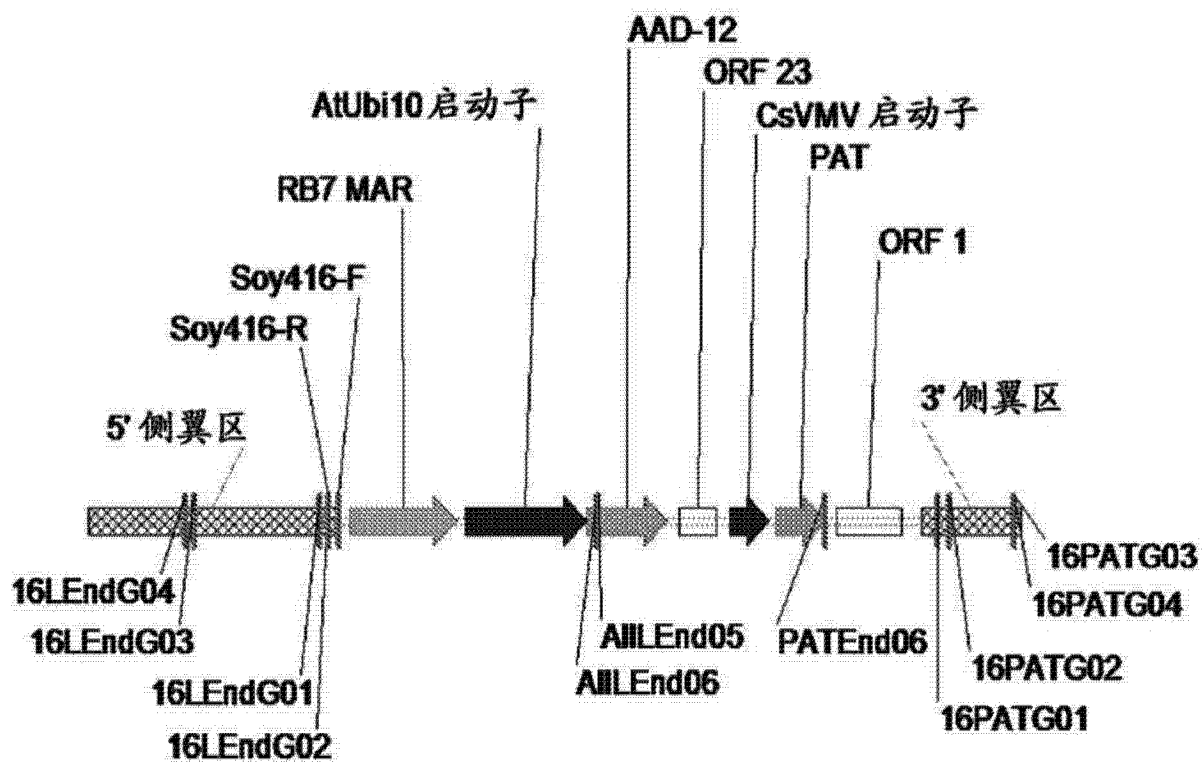


图 4

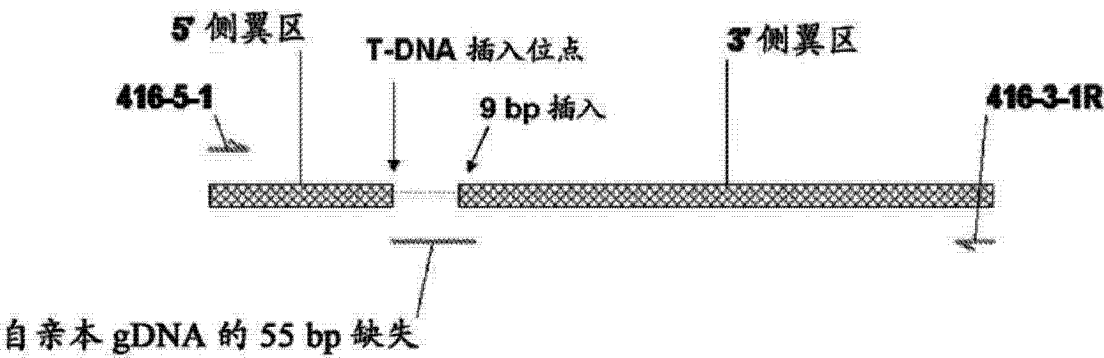


图 5

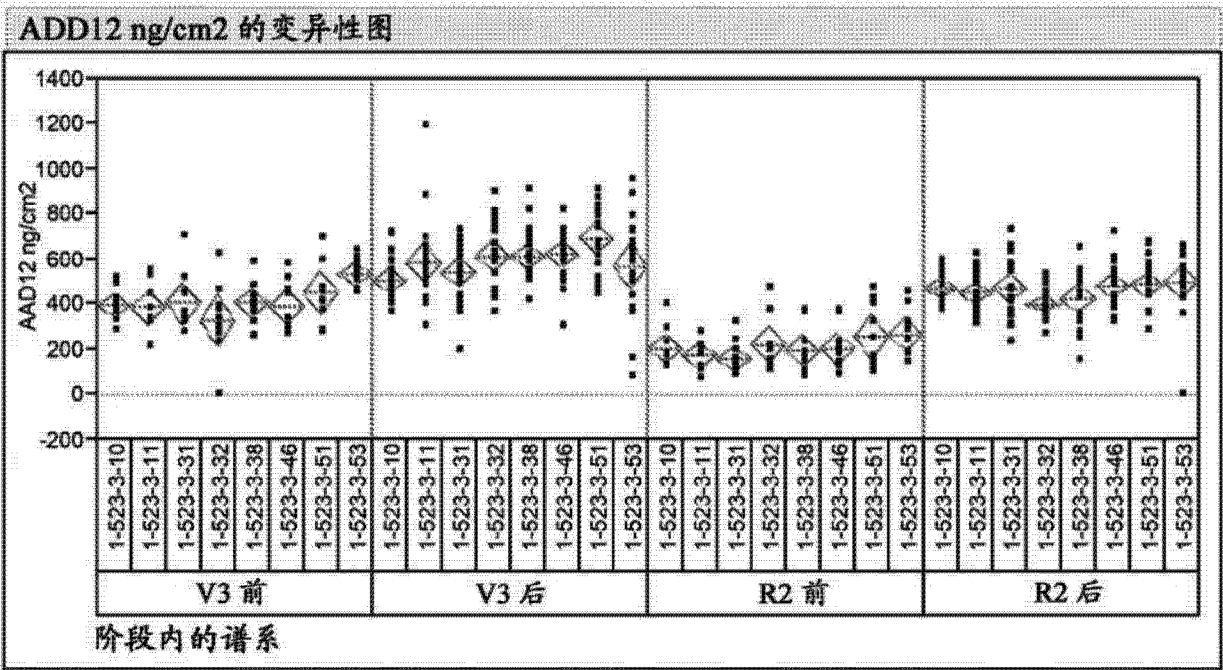


图 6