

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织

国际局

(43) 国际公布日

2017 年 12 月 21 日 (2017.12.21)



(10) 国际公布号

W O 2017/2153 28 A 1

(51) 国际专利分类号：

C12N 15/11 (2006.01) A01H 1/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) A01N 57/20 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) A01N 25/32 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) A01P 13/00 (2006.01)

(21) 国际申请号：PCT/CN20 17/079658

(22) 国际申请日：2017 年 4 月 7 日 (07.04.2017)

(25) 申请语言：中文

(26) 公布语言：中文

(30) 优先权：2016104403 10.4 2016 年 6 月 18 日 (18.06.2016) CN

(71) 申请人：北京大北农科技集团股份有限公司 (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.) [CN/CN]；中国北京市海淀区中关村大街 27 号 14 层, Beijing 100080 (CN)。北京大北农生物技术有限公司 (BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号院中国农业科学院原子能利用研究所 49 号楼, Beijing 100193 (CN)。

(72) 发明人：王登元 (WANG, Dengyuan)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。于彩虹 (YU, Caihong)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。张成伟 (ZHANG, Chengwei)；中国北京市海淀区圆明园

西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。韩超 (HAN, Chao)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。李晓娇 (LI, Xiaojiao)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。姜自芹 (JIANG, Ziqin)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。张良君 (ZHANG, Liangjun)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。吴竹筠 (WU, Zhujun)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。田康乐 (TIAN, Kangle)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。鲍晓明 (BAO, Xiaoming)；中国北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院原子能所 2 号楼, Beijing 100193 (CN)。

(74) 代理人：北京北翔知识产权代理有限公司 (BEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.)；中国北京市海淀区学院路 35 号世宁大厦 908 室, Beijing 100191 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE FOR DETECTING EXISTENCE OF TRANSGENIC SOYBEAN EVENT DBN9004 IN BIOLOGICAL SAMPLE, KIT CONTAINING SAME AND DETECTION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称：用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法

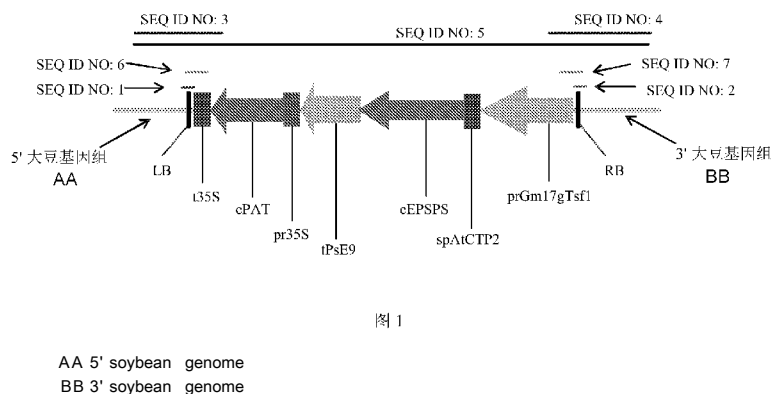


图 1

(57) Abstract: Provided are a nucleic acid sequence for detecting the existence of a transgenic soybean event DBN9004 in a biological sample, a kit containing the same and a detection method therefor.

(57) 摘要：提供了用于检测生物样品中是否存在转基因大豆事件 DBN9004 的核酸序列，包含该核酸序列的试剂盒及其检测方法。

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, , MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明 (细则13之二.4(d)(i) 和48.2(a)(vi))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法

技术领域

- 5 本发明涉及一种用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法，特别是涉及一种耐受草甘膦和草铵膦的大豆植物 DBN9004 和检测生物样品中是否包含特定转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 分子的方法。

背景技术

- 10 N-膦酰甲基甘氨酸，也称为草甘膦，是一种内吸传导型慢性广谱灭生性除草剂。草甘膦是 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 的合成底物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的竞争性抑制剂，可抑制 PEP 和 3-磷酸莽草酸这两种底物在 EPSPS 催化下向 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸莽草酸的转化，从而阻断芳香族氨基酸合成前体-莽草酸的合成途径，使蛋白质的合成受到干扰导致植物和细菌死亡。

- 15 草甘膦耐受性可以通过表达修饰的 EPSPS 来实现。修饰的 EPSPS 对草甘膦具有更低的亲和性，因而在草甘膦存在的情况下，EPSPS 保持了它们的催化活性，即获得了草甘膦耐受性。

- 大豆 (Glycine max) 是世界五大主栽作物之一。在大豆生产中除草剂耐受性是一项重要的农艺性状，特别是对草甘膦除草剂的耐受性。大豆对草甘膦除草剂的耐受性可以通过转基因的方法使草甘膦除草剂耐受型基因 (EPSPS, CP4) 在大豆植物中表达而获得，
20 例如大豆事件 GTS40-3-2、大豆事件 MON89788 等。

- 草甘膦耐受性耕种系统的普遍采用和草甘膦使用的日益增加已经导致近年来草甘膦抗性杂草的流行。在种植者面对草甘膦抗性杂草或向更难以控制的杂草物种转变的地区，种植者可以通过与能够控制遗漏杂草的其他除草剂混合或交替使用来补偿草甘膦的弱点。
25 点。

- 草铵膦是膦丝菌素类除草剂中的一种非系统性、非选择性除草剂。主要用于一年生或多年生阔叶杂草的出土后控制，是通过 L-膦丝菌素 (草铵膦中的活性成分) 对谷氨酰胺合酶 (一种对于植物中的氨解毒必需的酶) 的不可逆抑制来控制杂草的。与草甘膦杀根不同，草铵膦先杀叶，通过植物蒸腾作用可以在植物木质部进行传导，其速效性介于百草枯和草甘膦之间。
30 枯和草甘膦之间。

从链霉菌分离的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (PAT) 通过乙酰化催化 L-膦丝菌素转化为其无活性形式。表达 PAT 的植物优化形式的基因已经在大豆中使用以赋予大豆对草铵膦除草剂的耐受性，例如大豆事件 A5547-127。因此与草铵膦耐受性性状组合使用草铵膦除草剂可以作为一种有效管理草甘膦抗性杂草的非选择性手段。

在未来，随着转基因抗虫大豆的推广以及大面积种植，少量存活下来的昆虫/害虫经过几代繁殖后，可能产生抗性。转基因除草剂耐受性大豆作为非抗虫转基因大豆，与转基因抗虫大豆以一定比例一并种植，可以延缓昆虫/害虫产生抗性。

5 已知外源基因在植物体内的表达受到它们的染色体位置的影响，可能是由于染色质结构（如异染色质）或转录调节元件（如增强子）接近整合位点。为此，通常需要筛选大量的事件才有可能鉴定出可以商业化的事件（即导入的目标基因得到最优表达的事件）。例如，在植物和其他生物体中已经观察到导入基因的表达量在事件间可能有很大差异；在表达的空间或时间模式上可能也存在差异，如在不同植物组织之间转基因的相对表达存在差异，这种差异表现在实际的表达模式可能与根据导入的基因构建体中的转录调节元件所预期的表达模式不一致。因此，通常需要产生成百上千个不同的事件并从这些事件中筛选出具有以商业化为目的所预期的转基因表达量和表达模式的单一事件。具有预期的转基因表达量和表达模式的事件可用于采用常规育种方法通过有性异型杂交将转基因渗入到其他遗传背景中。通过这种杂交方式产生的后代保持了原始转化体的转基因表达特征。应用这种策略模式可以确保在许多品种中具有可靠的基因表达，而这些品种能很好的适应当地的生长条件。

能够检测特定事件的存在以确定有性杂交的后代是否包含目的基因将是有益的。此外，检测特定事件的方法还将有助于遵守相关法规，例如来源于重组农作物的食物在投入市场前需要获得正式批准和进行标记。通过任何熟知的多核苷酸检测方法检测转基因的存在都是可能的，例如聚合酶链式反应（PCR）或利用多核苷酸探针的DNA杂交。这些检测方法通常集中于常用的遗传元件，例如启动子、终止子、标记基因等。因此，除非与插入的转基因DNA相邻的染色体DNA（“侧翼DNA”）的序列是已知的，上述这种方法就不能够用于区别不同的事件，特别是那些用相同的DNA构建体产生的事件。所以，目前常利用跨越了插入的转基因和侧翼DNA的接合部位的一对引物通过PCR来鉴定转基因特定事件，具体地说是包含侧翼序列的第一引物和包含插入序列的第二引物。

发明内容

本发明的目的是提供一种用于检测除草剂耐受性大豆植物DBN9004的核酸序列及其检测方法，转基因大豆事件DBN9004对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有较好的耐受性，且检测方法可以准确快速的鉴定生物样品中是否包含特定转基因大豆事件DBN9004的DNA分子。

为实现上述目的，本发明提供了一种具有以下核酸序列的核酸分子，所述核酸序列包括SEQ ID NO:3或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、和/或SEQ ID NO:4或其互补序列中至少11个连续的核苷酸。

优选地，所述核酸序列包括SEQ ID NO:1或其互补序列、和/或SEQ ID NO:2或其互

补序列。

进一步地,所述核酸序列包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列。

更进一步地,所述核酸序列包括 SEQ ID NO:5 或其互补序列。

- 5 所述 SEQ ID NO:1 或其互补序列为转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 5' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列,所述 SEQ ID NO:1 或其互补序列跨越了大豆插入位点的侧翼基因组 DNA 序列和插入序列的 5' 末端的 DNA 序列,包含所述 SEQ ID NO:1 或其互补序列即可鉴定为转基因大豆事件 DBN9004 的存在。所述 SEQ ID NO:2 或其互补序列为转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 3' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列,所述 SEQ ID NO:2 或其互补序列跨越了插入序列的 3' 末端的 DNA 序列和大豆插入位点的侧翼基因组 DNA 序列,包含所述 SEQ ID NO:2 或其互补序列即可鉴定为转基因大豆事件 DBN9004 的存在。
- 10

- 本发明中,所述核酸序列可以为所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列中转基因插入序列的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸(第一核酸序列),或者为所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列中 5' 侧翼大豆基因组 DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸(第二核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或互补于包含完整的所述 SEQ ID NO:1 的所述 SEQ ID NO:3 的一部分。当第一核酸序列和第二核酸序列一起使用时,这些核酸序列可作为 DNA 引物对用于产生扩增产物的 DNA 扩增方法中。使用 DNA 引物对在 DNA 扩增方法中产生的扩增产物是包括 SEQ ID NO:1 的扩增产物时,可以诊断
- 15 转基因大豆事件 DBN9004 或其后代的存在。本领域技术人员熟知的,第一和第二核酸序列不必仅仅由 DNA 组成,也可包括 RNA、DNA 和 RNA 的混合物,或者 DNA、RNA 或其他不作为一种或多种聚合酶模板的核苷酸或其类似物的组合。此外,本发明中所述探针或引物应该是至少大约 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个连续核苷酸的长度,其可以选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中所述的核苷酸。当选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸时,所述探针和引物可以为长度是至少大约 21 个到大约 50 个或更多的连续核苷酸。所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列为转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 5' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 1207 个核苷酸的序列,所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列由 740 个核苷酸的大豆侧翼基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1-740)、74 个 pDBN4003 构建体 DNA 序列中的核苷酸 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 741-814)、195 个核苷酸的 t35S 终止子序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 815-1009)、21 个核苷酸的载体间隔序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1010-1030) 和 177 个核苷酸的腓丝菌素 N-乙酰基转移酶 cPAT (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1031-1207) 的 5' 末端 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 815-1207) 组成,包含所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列即可鉴定为转基因大豆事件
- 20
- 25
- 30

DBN9004 的存在。

所述核酸序列可以为所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列中转基因插入序列的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸 (第三核酸序列), 或者为所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列中 3'侧翼大豆基因组 DNA 区域的任何部分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸 (第四核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或互补于包含完整的所述 SEQ ID NO:2 的所述 SEQ ID NO:4 的一部分。当第三核酸序列和第四核酸序列一起使用时, 这些核酸序列可作为 DNA 引物对用于产生扩增产物的 DNA 扩增方法中。使用 DNA 引物对在 DNA 扩增方法中产生的扩增产物是包括 SEQ ID NO:2 的扩增产物时, 可以诊断转基因大豆事件 DBN9004 或其后代的存在。所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列为转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 3' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 631 个核苷酸的序列, 所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列由 226 个核苷酸的 prGml7gTsfl 启动子序列 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 1-226)、61 个 pDBN4003 构建体 DNA 序列中的核苷酸 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 227-287)、6 个核苷酸的接合序列 (SEQ ID NO:4 的 288-293) 和 338 个核苷酸的大豆侧翼基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO:4 的 294-631) 组成, 包含所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列即可鉴定为转基因大豆事件 DBN9004 的存在。

所述 SEQ ID NO:5 或其互补序列为表征转基因大豆事件 DBN9004 的长度为 7059 个核苷酸的序列, 其具体包含的基因组和遗传元件如表 1 所示。包含所述 SEQ ID NO:5 或其互补序列即可鉴定为转基因大豆事件 DBN9004 的存在。

表 1、SEQ ID NO:5 包含的基因组及遗传元件

遗传元件/基因组	长度 (bp)	位于 SEQ ID NO:5 上的位置
5'基因组	1268	1-1268
LB	74	1269-1342
t35S	195	1343-1537
cPAT	552	1559-2110
pr35s	530	2130-2659
tPse9	643	2708-3350
cEPSPS	1368	3393-4760
spAtCTP2	228	4761-4988
prGml7gTsfl	1012	4989-6000
RB	61	6001-6061
3'基因组	992	6068-7059

所述核酸序列或其互补序列可用于 DNA 扩增法中以产生扩增子, 所述扩增子的检测诊断生物样品中转基因大豆事件 DBN9004 或其后代的存在; 所述核酸序列或其互补序列可用于核苷酸检测法中, 以检测生物样品中转基因大豆事件 DBN9004 或其后代的存在。

为实现上述目的,本发明还提供了一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法,包括:

使待检测样品与用于扩增目标扩增产物的至少两种引物在核酸扩增反应中接触;
进行核酸扩增反应;和

5 检测所述目标扩增产物的存在;

所述目标扩增产物包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸。

进一步地,所述目标扩增产物包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

10 更进一步地,所述目标扩增产物包括选自以下的至少一种:SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

在上述技术方案中,至少一种所述引物包括所述核酸序列或其片段或者与之互补的序列。

15 具体地,所述引物包括第一引物和第二引物,所述第一引物选自 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10;所述第二引物选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11。

为实现上述目的,本发明还提供了一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法,包括:

20 使待检测样品与探针接触,所述探针包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸;

使所述待检测样品和所述探针在严格杂交条件下杂交;和
检测所述待检测样品和所述探针的杂交情况。

所述严格条件可为在 6X SSC (柠檬酸钠)、0.5%SDS (十二烷基硫酸钠)溶液中,在 65°C 下杂交,然后用 2X SSC、0.1%SDS 和 1X SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

25 进一步地,所述探针包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

更进一步地,所述探针包含选自以下的至少一种:SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

可选择地,至少一个所述探针用至少一种荧光基团标记。

30 为实现上述目的,本发明还提供了一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法,包括:

使待检测样品与标记物核酸分子接触,所述标记物核酸分子包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸;

使所述待检测样品和所述标记物核酸分子在严格杂交条件下杂交；和

检测所述待检测样品和所述标记物核酸分子的杂交情况，进而通过标记物辅助育种分析以确定草甘膦耐受性和/或草铵膦耐受性与标记物核酸分子在遗传学上是连锁的。

进一步地，所述标记物核酸分子包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

更进一步地，所述标记物核酸分子包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种 DNA 检测试剂盒，包括至少一个 DNA 分子，所述 DNA 分子包括 SEQ ID NO:3 的同源序列或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 的同源序列或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸，其可以作为对于转基因大豆事件 DBN9004 或其后代具有特异性的 DNA 引物或探针。

进一步地，所述 DNA 分子包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

更进一步地，所述 DNA 分子包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:2 的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:6 的同源序列或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 的同源序列或其互补序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种植物细胞或部分，包含编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列、编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列和特定区域的核酸序列，所述特定区域的核酸序列包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示的序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种产生对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植株的方法，包括向所述大豆植株的基因组中引入编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、以及特定区域的核酸序列，所述特定区域的核酸序列选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列。

具体地，所述产生对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植株的方法包括：

将对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的转基因大豆事件 DBN9004 第一亲本大豆植株与缺少草甘膦和/或草铵膦耐受性的第二亲本大豆植株有性杂交，从而产生大量子代植株；

用草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂处理所述子代植株；和

选择耐受草甘膦和/或草铵膦的所述子代植株。

为实现上述目的，本发明还提供了一种培养对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植物的方法，包括：

种植至少一粒大豆种子，所述大豆种子的基因组中包括编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、以及特定区域的核酸序列；

5 使所述大豆种子长成大豆植株；和

用有效剂量草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂喷洒所述大豆植株，收获与其他不具有特定区域的核酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤的植株；

所述特定区域的核酸序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列。

10 为实现上述目的，本发明还提供了一种保护植物免受由除草剂引起的损伤的方法，包括将含有有效剂量草甘膦和/或草铵膦的除草剂施加到种植至少一种转基因大豆植物的大田中，所述转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列，所述转基因大豆植物具有对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

15 为实现上述目的，本发明还提供了一种控制田间杂草的方法，包括将含有有效剂量草甘膦和/或草铵膦的除草剂施加到种植至少一种转基因大豆植物的大田中，所述转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列，所述转基因大豆植物具有对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

20 为实现上述目的，本发明还提供了一种控制草甘膦耐受性植物的大田中草甘膦抗性杂草的方法，包括将含有有效剂量草铵膦的除草剂施加到种植至少一种草甘膦耐受性的转基因大豆植物的大田中，所述草甘膦耐受性的转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列，所述草甘膦耐受性的转基因大豆植物同时具有对草铵膦除草剂的耐受性。

25 为实现上述目的，本发明还提供了一种延缓昆虫抗性的方法，包括在种植抗虫大豆植物的大田中种植至少一种具有草甘膦和/或草铵膦耐受性的转基因大豆植物，所述具有草甘膦和/或草铵膦耐受性的转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列。

30 为实现上述目的，本发明还提供了一种包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的多核苷酸的农产品或商品，所述农产品或商品为卵磷脂、脂肪酸、甘油、固醇、大豆片、大豆粉、大豆蛋白或其浓缩物、大豆油、大豆蛋白纤维、豆浆凝块或豆腐。

在本发明用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法中，以

下定义和方法可以更好地定义本发明和指导本领域的普通技术人员实施本发明,除非另作说明,根据本领域普通技术人员的常规的用法来理解术语。

所述"大豆"是指黄豆(*Glycine max*),并且包括可以与大豆交配的所有植物品种,包括野生大豆种。

5 术语"包含"、"包括"是指"包括但不限于"。

术语"植物"包括整株植物、植物细胞、植物器官、植物原生质体、植物可以从中再生的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物丛(*plant clumps*)和植物或植物部分中完整的植物细胞,所述植物部分例如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、茎秆、根、根尖、花药等。应理解为本发明范围内的转基因植物的部分包括但不限于植物细胞、原生质体、组织、愈伤组织、胚以及花、茎、果实、叶和根,以上植物部分源自事先用本发
10 明的DNA分子转化的并因此至少部分地由转基因细胞组成的转基因植物或其子代。

术语"基因"是指表达特定蛋白的核酸片段,包括编码序列前的调节序列(5'非编码序列)和编码序列后的调节序列(3'非编码序列)。
"天然基因"是指天然发现具有其自身调节序列的基因。
"嵌合基因"是指不是天然基因的任何基因,其包含非天然发现的调节和编码序列。
15 "内源基因"是指天然基因,所述天然基因位于生物体基因组中它的天然位置。
"外源基因"是现存在于生物的基因组中且原来不存在的外来基因,也指经转基因步骤导入受体细胞的基因。外源基因可以包含插入非天然生物体的天然基因或嵌合基因。
"转基因"是通过转化程序已经被引入基因组的基因。植物基因组中重组DNA已被插入的位点可以称为"插入位点"或"靶位点"。

20 "侧翼DNA"可以包含天然存在于例如植物的生物体中的基因组或通过转化过程引入的外源(异源)DNA,例如与转化事件相关的片段。因此,侧翼DNA可以包括天然和外源DNA的组合。在本发明中,"侧翼区"或"侧翼序列"或"基因组边界区"或"基因组边界序列"是指至少3、5、10、11、15、20、50、100、200、300、400、1000、1500、2000、2500或5000碱基对或更长的序列,其位于最初外源插入DNA分子的直接上游或下游并且与最初外源插入DNA分子相邻。当该侧翼区位于下游时,其也可以称为"左边界侧翼"或"3'侧翼"或"3'基因组边界区"或"基因组3'边界序列"等。当该侧翼区位于上游时,其也可以称为"右边界侧翼"或"5'侧翼"或"5'基因组边界区"或"基因组5'边界序列"等。
25

引起外源DNA的随机整合的转化程序会导致含有不同侧翼区的转化体,所述不同侧翼区是每个转化体所特异性含有的。当重组DNA通过传统杂交被引入植物时,其侧翼区通常不会改变。转化体也会含有异源插入物DNA和基因组DNA的段之间或两段基因组DNA之间或两段异源DNA之间的独特的接合。
30 "接合"是两个具体的DNA片段连接的点。例如,接合存在于插入物DNA连接侧翼DNA的位置。接合点还存在于转化的生物体中,其中两个DNA片段以修饰自天然生物体中发现的方式的连接在一起。"接合DNA"、

"接合区域"是指包含接合点的DNA。

本发明提供了称为DBN9004的转基因大豆事件及其后代,所述转基因大豆事件DBN9004即为大豆植物DBN9004,其包括转基因大豆事件DBN9004的植物和种子及其植物细胞或其可再生部分,所述转基因大豆事件DBN9004的植物部分,包括但不限于细胞、花粉、胚珠、花、芽、根、茎、叶、荚和来自大豆植物DBN9004的产物,例如大豆饼、粉和油,具体可以为卵磷脂、脂肪酸、甘油、固醇、食用油、脱脂大豆片、包括脱脂的和烘烤的大豆粉、豆浆凝块、豆腐、大豆蛋白浓缩物、分离的大豆蛋白、水解植物蛋白、组织化大豆蛋白和大豆蛋白纤维。

本发明转基因大豆事件DBN9004包含了一个DNA构建体,当其在植物细胞内表达时,所述转基因大豆事件DBN9004获得对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂的耐受性。所述DNA构建体包含两个串联的表达盒,第一个表达盒包含用于在植物中表达的适合的启动子和适合的多聚腺苷酸化信号序列,所述启动子可操作地连接编码5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的基因,所述EPSPS对草甘膦除草剂具有耐受性。第二个表达盒包含用于在植物中表达的适合的启动子和适合的多聚腺苷酸化信号序列,所述启动子可操作地连接编码膦丝菌素N-乙酰基转移酶(PAT)的基因,所述PAT蛋白的核酸序列对草铵膦除草剂具有耐受性。进一步地,所述启动子可以为从植物分离的适合启动子,包括组成型、诱导型和/或组织特异性启动子,所述适合启动子包括但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子、玄参花叶病毒(FMV)35S启动子、Tsf1启动子、泛素蛋白(Ubiquitin)启动子、肌动蛋白(Actin)启动子、土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂碱合成酶(NOS)启动子、章鱼碱合成酶(OCS)启动子、夜香树属(*Cestrum*)黄叶卷曲病毒启动子、马铃薯块茎储藏蛋白(Patatin)启动子、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCO)启动子、谷胱甘肽硫转移酶(GST)启动子、E9启动子、GOS启动子、alcA/alcR启动子、毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)RolD启动子和拟南芥属(*Arabidopsis*)Suc2启动子。所述多聚腺苷酸化信号序列可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列,所述适合多聚腺苷酸化信号序列包括但不限于,来源于土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂碱合成酶(NOS)基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于花椰菜花叶病毒(CaMV)35S终止子、来源于豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶E9终止子、来源于蛋白酶抑制剂II(PIN II)基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白(α -tubulin)基因的多聚腺苷酸化信号序列。

此外,所述表达盒还可以包括其他的遗传元件,所述遗传元件包括但不限于,增强子和信号肽/转运肽。所述增强子可以增强基因的表达水平,所述增强子包括但不限于,烟草蚀刻病毒(TEV)翻译激活因子、CaMV35S增强子和FMV35S增强子。所述信号肽/转运肽可以引导EPSPS蛋白和/或PAT蛋白转运到细胞外或者细胞内特定的细胞器或区室,例如,利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体,或者利用'KDEL'保留序列靶向内

质网。

所述 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 基因可以是从小肠农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* sp.) CP4 菌株中分离得到的,且可以通过优化密码子或者以其他方式改变编码 EPSPS 的多核苷酸,以达到增加转化细胞中转录物的稳定性和可利用性的目的。所述 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 基因也可以作为选择性标记基因。

所述“草甘膦”是指 N-膦酰甲基甘氨酸和它的盐,用“草甘膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草甘膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草甘膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草甘膦的除草剂制剂处理包含了来源于除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的植物材料的田地,将控制所述田地中的杂草生长,并且不影响来源于除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的植物材料的生长或产量。

从链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 分离的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT) 基因通过乙酰化催化 L-膦丝菌素转化为其无活性形式,以赋予植物对草铵膦除草剂的耐受性。Phosphinothricin (PTC, 2-氨基-4-甲膦酰丁酸) 是谷氨酰胺合成酶的抑制剂。PTC 是抗生素 2-氨基-4-甲膦酰-丙氨酰-丙氨酸的结构单位,此三肽 (PTT) 具有抗革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌以及抗真菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的活性。膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (PAT) 基因也可以作为选择性标记基因。

所述“草铵膦”又名草丁膦,是指 2-氨基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸铵,用“草铵膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草铵膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂处理包含了来源于除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的植物材料的田地,将控制所述田地中的杂草生长,并且不影响来源于除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的植物材料的生长或产量。

所述 DNA 构建体采用转化方法被引入到植物中,所述转化方法包括但不限于,农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导转化法、基因枪转化法和花粉管通道转化法。

所述农杆菌介导转化法是植物转化的常用方法。将要引入到植物中的外源 DNA 克隆到载体的左和右边界共有序列之间,即 T-DNA 区。所述载体被转化到农杆菌细胞中,随后,所述农杆菌细胞用于感染植物组织,包含外源 DNA 的载体的所述 T-DNA 区被插入到植物基因组中。

所述基因枪转化法即为用包含外源 DNA 的载体轰击植物细胞(粒子介导的生物弹击转化)。

所述花粉管通道转化法是利用植物授粉后所形成的天然的花粉管通道(又名花粉管引导组织),经珠心通道,将外源 DNA 携带入胚囊。

转化后，必须从转化的植物组织再生转基因植物，并且利用适合的标记选择具有外源 DNA 的后代。

DNA 构建体是 DNA 分子互相连接起来的组合，该组合提供了一个或多个表达盒。DNA 构建体优选地是能够在细菌细胞内自我复制，而且含有不同的限制性内切酶位点的质粒，所含的限制性内切酶位点用于导入提供功能性基因元件，即启动子、内含子、前导序列、编码序列、3' 终止子区域和其他序列的 DNA 分子。DNA 构建体中所含有的表达盒包括提供信使 RNA 的转录所必需的基因元件，所述表达盒可以设计为在原核细胞或真核细胞中表达。本发明的表达盒被设计为最优选地在植物细胞内表达。

转基因“事件”是通过用异源 DNA 构建体转化植物细胞而得到的，即包括一个含有目标基因的核酸表达盒，通过转基因的方法插入到植物基因组中以产生的植物群体，再生所述植物群体，和选择具有插入特定基因组位点特征的特定植株。术语“事件”包括异源 DNA 的原始转化体和该转化体的后代。术语“事件”还包括转化体和含有异源 DNA 的其他品种个体之间进行有性杂交而得到的后代，即使在与回交亲本进行反复回交后，来自于转化体亲本的插入 DNA 和侧翼基因组 DNA 也存在于杂交后代中的同一染色体位置。术语“事件”还指来自原始转化体的 DNA 序列，该 DNA 序列包含插入 DNA 和与插入 DNA 紧密相邻的侧翼基因组序列，该 DNA 序列被预期转移到子代中，该子代由含有插入 DNA 的亲本系（例如原始转化体和其自交产生的子代）与不含有插入 DNA 的亲本系进行有性杂交而产生，且该子代接受了包含目标基因的插入 DNA。

本发明中“重组”是指通常不能在自然界中发现并且因此通过人工干预产生的 DNA 和/或蛋白和/或生物体的形式。这种人工干预可产生重组 DNA 分子和/或重组植物。所述“重组 DNA 分子”是通过人工组合两种在其他情况下是分离的序列区段而获得的，例如通过化学合成或通过遗传工程技术操作分离的核酸区段。进行核酸操作的技术是众所周知的。

术语“转基因”包括任何细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植物部分或植物，以上的基因型由于异源核酸的存在而改变，所述“转基因”包括最初被这样改变的转基因体以及由最初的转基因体通过有性杂交或无性繁殖生成的子代个体。在本发明中，术语“转基因”不包括通过常规植物育种方法或天然发生事件的基因组的（染色体的或染色体外的）改变，所述天然发生事件例如随机异体受精、非重组病毒感染、非重组细菌转化、非重组转座或自发突变。

本发明中“异源的”是指自然界中第一分子通常不被发现与第二分子组合。例如，分子可以源自第一物种并插入到第二物种的基因组中。因此这种分子对于宿主是异源的并被人工引入宿主细胞的基因组中。

培养对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的转基因大豆事件 DBN9004，通过以下步骤：首先使第一亲本大豆植物与第二亲本大豆植物有性杂交，从而产生了多样的第

一代子代植株，所述第一亲本大豆植物由培育自转基因大豆事件 DBN9004 及其后代的大豆植物组成，该转基因大豆事件 DBN9004 及其后代是通过利用本发明的对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的表达盒进行转化而得到的，第二亲本大豆植物缺乏对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性；然后选择对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的施用具有耐受性的子代植株，可以培育出对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植物。这些步骤可以进一步包括使对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的施用具有耐受性的子代植株与第二亲本大豆植物或第三亲本大豆植物进行回交，然后通过施用草甘膦除草剂、草铵膦除草剂或通过性状相关的分子标记物（如包含转基因大豆事件 DBN9004 中插入序列的 5' 端和 3' 端鉴定出的接合位点的 DNA 分子）的鉴定来选择子代，从而产生对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植物。

还应理解的是，两种不同的转基因植物也可以杂交以产生含有两个独立的、分离式添加的外源基因的后代。适当后代的自交可以得到对两个添加的外源基因来说都是纯合子的后代植株。如前所述的对亲本植株的回交和与非转基因植物的异型杂交也是可以预期的，无性繁殖也是同样的。

转 Bt 基因的大豆能杀死例如鳞翅目的昆虫/害虫，但也存在少量存活下来的昆虫/害虫，经过几代繁殖后，可能产生抗 Bt 蛋白的抗性昆虫/害虫。为了解决昆虫/害虫产生抗性这个问题，美国环境保护局针对转基因作物的使用给出了如下指导，需提供一定比例的庇护所大豆（可以是非抗虫转基因大豆（如除草剂耐受性转基因大豆，或抗非目标害虫的转基因大豆，或非转基因大豆）。当绝大部分的昆虫/害虫在相应的转基因抗虫大豆上被杀死后，还有一部分昆虫/害虫在庇护所大豆上没有死，保证了没有抗性的昆虫/害虫群体占统治数量。这样即使有少量存活的抗性昆虫/害虫，与占统治数量的非抗性昆虫/害虫交配后抗性基因也被显著的稀释了。

术语“探针”是一段分离的核酸分子，其上面结合有常规的可检测标记或报告分子，例如，放射性同位素、配体、化学发光剂或酶类。这种探针与目标核酸的一条链是互补的，在本发明中，探针与来自转基因大豆事件 DBN9004 基因组的一条 DNA 链互补，不论该基因组 DNA 是来自转基因大豆事件 DBN9004 或种子还是来源于转基因大豆事件 DBN9004 的植物或种子或提取物。本发明的探针不仅包括脱氧核糖核酸或核糖核酸，还包括特异性地与目标 DNA 序列结合并可用于检测该目标 DNA 序列的存在的聚酰胺及其他探针材料。

术语“引物”是一段分离的核酸分子，其通过核酸杂交，退火结合到互补的目标 DNA 链上，在引物和目标 DNA 链之间形成杂合体，然后在聚合酶（例如 DNA 聚合酶）的作用下，沿目标 DNA 链延伸。本发明的引物对涉及其在目标核酸序列扩增中的应用，例如，通过聚合酶链式反应（PCR）或其他常规的核酸扩增方法。

探针和引物的长度一般是 11 个多核苷酸或更多，优选的是 18 个多核苷酸或更多，

更优选的是 24 个多核苷酸或更多,最优选的是 30 个多核苷酸或更多。这种探针和引物在高度严格杂交条件下与目标序列特异性地杂交。尽管不同于目标 DNA 序列且对目标 DNA 序列保持杂交能力的探针是可以通过常规方法设计出来的,但是,优选的,本发明中的探针和引物与目标序列的连续核酸具有完全的 DNA 序列同一性。

5 基于本发明的侧翼基因组 DNA 和插入序列的引物和探针可以通过常规方法确定,例如,通过从来源于转基因大豆事件 DBN9004 的植物材料中分离相应的 DNA 分子,并确定该 DNA 分子的核酸序列。所述 DNA 分子包含转基因插入序列和大豆基因组侧翼序列,所述 DNA 分子的片段可以用作引物或探针。

本发明的核酸探针和引物在严格条件下与目标 DNA 序列杂交。任何常规的核酸杂交
10 或扩增方法都可以用于鉴定样品中来源于转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。如本发明使用的,如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构,就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性,则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的"互补物"。如本发明使用的,当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸
15 分子的对应核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示出"完全互补性"。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的"低度严格"条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子为"最低程度互补"。类似地,如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的"高度严格"条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子具有"互补性"。从完全互补性中偏离是可以允许的,只要这种偏离不完全阻止
20 两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针,仅需保证其在序列上具有充分的互补性,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

如本发明使用的,基本同源的序列是一段核酸分子,该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进 DNA 杂交的适合的严格条件,例如,大约在 45°C 条件下用 6.0 $\times$ 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 处理,然后在 50°C 条件
25 下用 2.0XSSC 洗涤,这些条件对本领域技术人员是公知的。例如,在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 2.0xSSC、50°C 到高度严格条件的约 0.2xSSC、50°C。此外,洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约 22°C,升高到高度严格条件的约 65°C。温度条件和盐浓度可以都发生改变,也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地,本发明的一个核酸分子可以在中度严格条件下,例如在约 2.0XSSC 和约
30 65°C 与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 中一个或多个核酸分子或其互补序列,或者上述序列的任一片段发生特异性杂交。更优选地,本发明的一个核酸分子在高度严格条件下与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 中一个或多个核酸分子或其互补序列,或者上述序列的任一片段发生特异性杂交。本发明

中，优选的标记物核酸分子具有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 或其互补序列，或者上述序列的任一片段。本发明另一优选的标记物核酸分子与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 或其互补序列，或者上述序列的任一片段具有 80% 到 100% 或 90% 到 100% 的序列同一性。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 可以用作植物育种方法中的标记物以鉴定遗传杂交的后代。探针与目标 DNA 分子的杂交可以通过任何一种为本领域技术人员所熟知的方法进行检测，这些方法包括但不限于，荧光标记、放射性标记、抗体类标记和化学发光标记。

关于使用特定的扩增引物对目标核酸序列进行的扩增（例如，通过 PCR），“严格条件”指的是在 DNA 热扩增反应中仅允许引物对目标核酸序列发生杂交的条件，具有与目标核酸序列相应的野生型序列（或其互补序列）的引物，能够与所述目标核酸序列结合，并且优选产生唯一的扩增产物，扩增产物即扩增子。

术语“特异性结合（目标序列）”是指在严格杂交条件下探针或引物仅与包含目标序列的样品中的目标序列发生杂交。

如本发明使用的，“经过扩增的 DNA”或“扩增子”是指作为核酸模板一部分的目标核酸序列的核酸扩增产物。例如，为了确定大豆植物是否由含有本发明转基因大豆事件 DBN9004 通过有性杂交方式产生，或采集自田地的大豆样品是否包含转基因大豆事件 DBN9004，或大豆提取物，例如粗粉、粉或油是否包含转基因大豆事件 DBN9004，从大豆植物组织样品或提取物提取的 DNA 可以通过使用引物对的核酸扩增方法以产生对于转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 的存在是诊断性的扩增子。所述引物对包括一个来源于植物基因组中与插入的外源 DNA 插入位点相邻的侧翼序列的第一引物，和来源于插入的外源 DNA 的第二引物。扩增子具有一定长度和序列，所述序列对所述转基因大豆事件 DBN9004 也是诊断性的。扩增子的长度范围可以是引物对的结合长度加上一个核苷酸碱基对，优选加上约五十个核苷酸碱基对，更优选加上约两百五十个核苷酸碱基对，最优选加上约四百五十个核苷酸碱基对或更多。

可选的，引物对可以来源于插入 DNA 两侧的侧翼基因组序列，以产生包括整个插入核苷酸序列的扩增子。来源于植物基因组序列的引物对中的一个可以位于距插入 DNA 序列一定距离处，该距离的范围可以是一个核苷酸碱基对到约两万个核苷酸碱基对。术语“扩增子”的使用特别排除了在 DNA 热扩增反应中形成的引物二聚体。

核酸扩增反应可以通过本领域已知的任何一种核酸扩增反应方法实现，包括聚合酶链式反应（PCR）。各种核酸扩增方法已是本领域技术人员所熟知的。PCR 扩增方法已经发展到可扩增多达 22 kb 的基因组 DNA 和多达 42 kb 的噬菌体 DNA。这些方法以及本领域的其他 DNA 扩增方法可以用于本发明。插入的外源 DNA 序列和来自转基因大豆事件 DBN9004 的侧翼 DNA 序列可以通过利用所提供的引物序列对转基因大豆事件 DBN9004 的基因组进行扩增，扩增后对 PCR 扩增子或克隆的 DNA 进行标准的 DNA 测

序。

基于 DNA 扩增方法的 DNA 检测试剂盒含有 DNA 引物分子，它们在适当的反应条件下特异性杂交到目标 DNA 上并扩增诊断性扩增子。试剂盒可提供基于琼脂糖凝胶的检测方法或者现有技术已知的检测诊断性扩增子的许多方法。含有与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的大豆基因组区的任何部分同源或互补的、以及与 SEQ ID NO:5 的转基因插入区的任何部分同源或互补的 DNA 引物的试剂盒是本发明所提供的。特别地鉴别在 DNA 扩增方法中有用的引物对是 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9，其扩增与转基因大豆事件 DBN9004 的 5'转基因/基因组区的一部分同源的诊断性扩增子，其中扩增子包括 SEQ ID NO:1。用作 DNA 引物的其他 DNA 分子可选自 SEQ ID NO:5。

这些方法所产生的扩增子可以通过多种技术进行检测。其中一个方法是遗传位分析 (Genetic Bit Analysis)，该方法设计了一个跨越插入 DNA 序列和相邻的侧翼基因组 DNA 序列的 DNA 寡核苷酸链。将该寡核苷酸链固定在一个微孔板的微孔内，在对目标区域进行 PCR 扩增后（在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物），单链 PCR 产物可与固定的寡核苷酸链进行杂交，并且作为单碱基延伸反应的模板，该延伸反应使用了 DNA 聚合酶和为下一个预期的碱基特定标记的 ddNTPs。可以通过荧光或 ELISA 类方法得到结果。信号代表了插入/侧翼序列的存在，其说明扩增、杂交和单碱基延伸反应是成功的。

另一种方法是焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 技术。该方法设计了一个跨越插入 DNA 序列和相邻的基因组 DNA 结合部位的寡核苷酸链。将该寡核苷酸链和目标区域的单链 PCR 产物（在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物）进行杂交，然后和 DNA 聚合酶、ATP、硫酰基酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、腺苷-5'-磷硫酸盐和萤光素一起进行温育。分别加入 dNTPs，测量产生的光信号。光信号代表了插入/侧翼序列的存在，其说明扩增、杂交、和单碱基或多碱基延伸反应是成功的。

Chen 等 (基因组研究 (Genome Res.) 9:492-498, 1999) 描述的荧光偏振现象也是可以用于检测本发明扩增子的一种方法。使用这种方法需要设计一个跨越插入 DNA 序列和相邻的基因组 DNA 结合部位的寡核苷酸链。将该寡核苷酸链和目标区域的单链 PCR 产物（在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物）进行杂交，然后和 DNA 聚合酶以及一种荧光标记的 ddNTP 一起进行温育。单碱基延伸会导致插入 ddNTP。这种插入可以利用荧光仪测量其偏振的改变。偏振的改变代表了插入/侧翼序列的存在，其说明扩增、杂交和单碱基延伸反应是成功的。

Taqman 被描述为一种检测和定量分析 DNA 序列存在的方法，该方法在制造商所提供的使用说明中有详细介绍。现简要举例说明如下，设计一个跨越插入 DNA 序列和相邻的基因组侧翼结合部位的 FRET 寡核苷酸探针。该 FRET 探针和 PCR 引物（在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物）在热稳定聚合酶和 dNTPs 存在下进行循

环反应。FRET 探针的杂交导致 FRET 探针上荧光部分和淬灭部分的分裂以及荧光部分的释放。荧光信号的产生代表了插入/侧翼序列的存在，其说明扩增和杂交是成功的。

基于杂交原理，用于检测来源于除草剂耐受性转基因大豆事件 DBN9004 的植物材料的适合技术还可以包括 Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交和原位杂交。特别地，所述
5 适合技术包括温育探针和样品，洗涤以移除未结合的探针和检测探针是否已经杂交。所述的检测方法取决于探针所附标记的类型，例如，通过 X 光片曝光和显影可以检测放射性标记的探针，或通过底物转化实现颜色变化可以检测酶标记的探针。

Tyangi 等（自然生物技术 (Nat. Biotech.) 14: 303-308, 1996）介绍了分子标记在序列检测中的应用。简要说明如下，设计一个跨越插入 DNA 序列和相邻的基因组侧翼结合
10 部位的 FRET 寡核苷酸探针。该 FRET 探针的独特结构导致其含有二级结构，该二级结构能够在近距离内保持荧光部分和淬灭部分。该 FRET 探针和 PCR 引物（在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物）在热稳定聚合酶和 dNTPs 存在下进行循环反应。经过成功的 PCR 扩增，FRET 探针和目标序列的杂交导致探针二级结构的丧失，从而使荧光部分和淬灭部分在空间上发生分离，产生荧光信号。荧光信号的产生代表了插入
15 /侧翼序列的存在，其说明扩增和杂交是成功的。

其他描述的方法，例如微流体（microfluidics）提供了分离和扩增 DNA 样品的方法和
设备。光染料用于检测和测定特定的 DNA 分子。包含用于检测 DNA 分子的电子传感器或结合特定 DNA 分子的纳珠并因而可被检测的纳试管（nanotube）设备对于检测本发
明的 DNA 分子是有用的。

可以使用本发明所述的组合物和 DNA 检测领域描述的或已知的方法来开发 DNA 检测
20 试剂盒。所述试剂盒有利于鉴定样品中是否存在转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA，还可以用于培育含有转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 的大豆植物。所述试剂盒可以含有 DNA 引物或探针，其同源于或互补于 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 5 的至少一部分，或含有其他 DNA 引物或探针，其同源于或互补于 DNA 的转基因遗传元件中所含的 DNA，
25 这些 DNA 序列可以用于 DNA 扩增反应，或作为 DNA 杂交方法中的探针。在大豆基因组中含有的以及在图 1 和表 1 中说明的转基因插入序列与大豆基因组结合部位的 DNA 结构包含：位于转基因插入序列 5' 末端的大豆植物 DBN9004 侧翼基因组区域，来自农杆菌的左侧边界区域（LB）的一部分插入序列，第一个表达盒由含有增强子区域的串联重复的花椰菜花叶病毒 35S 启动子（pr35S），可操作地连接到链霉菌的草铵膦耐受性的膦丝
30 菌素 N-乙酰基转移酶（cPAT）上，并可操作地连接到花椰菜花叶病毒 35S 终止子（t35S）上而组成，第二个表达盒由大豆 Tsfl 基因（编码延伸因子 EF-1a）启动子（prGm17gTsfl），可操作连接到拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽的编码序列（spAtCTP2）上，可操作连接到土壤杆菌属 CP4 菌株的草甘膦耐受性的 5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶（cEPSPS）上，可操作连接到来自豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的 3' 非翻译序列（tPse9）上而组成，来

自农杆菌的右侧边界区域 (RB) 的一部分插入序列, 以及位于转基因插入序列 3' 末端的大豆植物 DBN9004 侧翼基因组区域 (SEQ ID NO 5)。在 DNA 扩增方法中, 作为引物的 DNA 分子可以是来源于大豆植物 DBN9004 中转基因插入序列的任何部分, 也可以是来源于转基因大豆事件 DBN9004 中侧翼大豆基因组的 DNA 区域的任何部分。

5 转基因大豆事件 DBN9004 可以与其他转基因大豆品种组合, 例如除草剂耐受性 (如 2,4-D、麦草畏等) 的大豆, 或携带其他抗虫基因 (如 CryIAc、Cry2Ab 等) 的转基因大豆品种。所有这些不同转基因事件的各种组合, 与本发明的转基因大豆事件 DBN9004 一起育种, 可以提供抗多种虫害并耐受多种除草剂的改良杂种转基因大豆品种。这些品种相比于非转基因品种和单性状的转基因品种可以表现出产量提升等更优异的特征。

10 本发明提供了一种用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法, 转基因大豆事件 DBN9004 耐受含草甘膦和/或草铵膦的农业除草剂的植物毒性作用。该双重性状的大豆植株表达土壤杆菌属菌株 CP4 的草甘膦抗性的 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 蛋白, 其赋予植物对草甘膦的耐受性, 并表达链霉菌的草铵膦抗性的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (PAT) 蛋白, 其赋予植物对草铵膦的耐受性。双重性状
15 大豆具有如下优点: 1) 施加含草甘膦的农业除草剂给大豆作物用于广谱杂草控制的能力; 2) 草铵膦耐受性性状组合使用草铵膦除草剂 (与草甘膦除草剂混合或交替使用) 可以作为一种有效管理草甘膦抗性杂草的非选择性手段; 3) 除草剂耐受性转基因大豆作为非抗虫转基因大豆, 与转基因抗虫大豆以一定比例一并种植, 可以延缓昆虫/害虫产生抗性; 4) 大豆产量没有降低。此外, 编码草甘膦耐受性和草铵膦耐受性性状的基因连锁在同一 DNA
20 区段上, 并且存在于转基因大豆事件 DBN9004 基因组的单一基因座上, 这一点提供了增强的育种效率并使得能够用分子标记来追踪繁殖群体及其子代中的转基因插入片段。同时本发明检测方法中 SEQ ID NO: 1 或其互补序列、SEQ ID NO: 2 或其互补序列、SEQ ID NO: 6 或其互补序列、或者 SEQ ID NO: 7 或其互补序列可以作为 DNA 引物或探针以产生诊断为转基因大豆事件 DBN9004 或其后代的扩增产物, 且可以快速、准确、稳定的鉴定出来源于转基因大豆事件 DBN9004 的植物材料的存在。
25

序列简述

SEQ ID NO: 1 转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 5' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列, 其中第 1-11 位核苷酸和第 12-22 位核苷酸分别位于大豆基因组上插入位点的两侧;

30 SEQ ID NO: 2 转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 3' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列, 其中第 1-11 位核苷酸和第 12-22 位核苷酸分别位于大豆基因组上插入位点的两侧;

SEQ ID NO: 3 转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 5' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 1207 个核苷酸的序列;

SEQ ID NO:4 转基因大豆事件 DBN9004 中在插入序列的 3' 末端位于插入接合部位附近的一个长度为 631 个核苷酸的序列；

SEQ ID NO:5 整个 T-DNA 序列、5' 和 3' 的侧翼大豆基因组序列；

SEQ ID NO:6 位于 SEQ ID NO:3 内部的序列，跨越了 pDBN4003 构建体 DNA 序列中的核苷酸序列和 t35S 转录终止序列；

SEQ ID NO:7 位于 SEQ ID NO:4 内部的序列，跨越了 prGml7gTsfI 启动子序列和 pDBN4003 构建体 DNA 序列中的核苷酸序列；

SEQ ID NO:8 扩增 SEQ ID NO:3 的第一引物；

SEQ ID NO:9 扩增 SEQ ID NO:3 的第二引物；

10 SEQ ID NO: 10 扩增 SEQ ID NO:4 的第一引物；

SEQ ID NO: 11 扩增 SEQ ID NO:4 的第二引物；

SEQ ID NO: 12 5' 侧翼基因组序列上的引物；

SEQ ID NO: 13 与 SEQ ID NO: 12 配对的位于 T-DNA 上的引物；

15 SEQ ID NO: 14 3'侧翼基因组序列上的引物，其与 SEQ ID NO: 12 配对可以检测转基因是纯合子或是杂合子；

SEQ ID NO:15 与 SEQ ID NO:14 配对的位于 T-DNA 上的引物；

SEQ ID NO:16 Taqman 检测 EPSPS 的引物 1；

SEQ ID NO: 17 Taqman 检测 EPSPS 的引物 2；

SEQ ID NO: 18 Taqman 检测 EPSPS 的探针 1；

20 SEQ ID NO: 19 Taqman 检测 PAT 的引物 3；

SEQ ID NO:20 Taqman 检测 PAT 的引物 4；

SEQ ID NO:21 Taqman 检测 PAT 的探针 2；

SEQ ID NO:22 大豆内源基因泛素蛋白 (Ubiquitin) 的第一引物；

SEQ ID NO:23 大豆内源基因泛素蛋白 (Ubiquitin) 的第二引物；

25 SEQ ID NO:24 Southern 印迹杂交检测中 EPSPS 的探针；

SEQ ID NO:25 Southern 印迹杂交检测中 PAT 的探针；

SEQ ID NO:26 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO:13 方向一致；

SEQ ID NO:27 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO:13 方向相反，用作获得侧翼序列；

30 SEQ ID NO:28 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO: 13 方向相反，用作获得侧翼序列；

SEQ ID NO:29 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO: 15 方向一致；

SEQ ID NO:30 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO:15 方向相反，用作获得侧翼序列；

SEQ ID NO:31 位于 T-DNA 上的引物，与 SEQ ID NO:15 方向相反，用作获得侧翼序列。

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

5 附图说明

图 1 为本发明用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法的转基因插入序列与大豆基因组接合部位的结构示意图；

图 2 为本发明用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法的重组表达载体 PDBN4003 的结构示意图。

10

具体实施方式

下面通过具体实施例进一步说明本发明用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9004 的核酸序列及其检测方法的技术方案。

第一实施例、克隆与转化

15

1.1、载体克隆

使用标准的基因克隆技术构建重组表达载体 PDBN4003（如图 2 所示）。所述载体 PDBN4003 包含两个串联的转基因表达盒，第一个表达盒由大豆 Tsfl 基因（编码延伸因子 EF-1a）启动子（prGml7gTsfl），可操作连接到拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽的编码序列（spAtCTP2）上，可操作连接到土壤杆菌属 CP4 菌株的草甘膦耐受性的 5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶（cEPSPS）上，可操作连接到来自豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的 3' 非翻译序列（tPse9）上而组成；第二个表达盒由含有增强子区域的串联重复的花椰菜花叶病毒 35S 启动子（pr35S），可操作地连接到链霉菌的草铵膦耐受性的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶（cPAT）上，并可操作地连接到花椰菜花叶病毒 35S 终止子（t35S）上而组成。

20

25

将所述载体 PDBN4003 用液氮法转化到农杆菌 LBA4404（Invitrogen, Chicago, USA; Cat.No : 18313-015）中，并且以 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶（EPSPS）为选择性标记对转化细胞进行筛选。

1.2、植物转化

30

采用常规的农杆菌侵染法进行转化，将无菌培养的大豆子叶节组织与本实施例 1.1 中所述的农杆菌共培养，以将构建的重组表达载体 pDBN4003 中的 T-DNA 转入到大豆染色体组中，以产生转基因大豆事件 DBN9004。

对于农杆菌介导的大豆转化，简要地，将成熟的大豆种子在大豆萌发培养基（B5 盐 3.1 g/L，B5 维他命，蔗糖 20 g/L，琼脂 8 g/L，pH5.6）中进行萌发，将种子接种于萌发培养基上，按以下条件培养：温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ；光周期（光/暗）为 16/8h。萌发 4-6 天后取鲜绿的子叶节处膨大的大豆无菌苗，在子叶节下 3-4 毫米处切去下胚轴，纵向切开子叶，

去顶芽、侧芽和种子根。用解剖刀的刀背在子叶节处进行创伤，用农杆菌悬浮液接触创伤过的子叶节组织，其中农杆菌能够将 EPSPS 基因的核苷酸序列和 PAT 基因的核苷酸序列传递至创伤过的子叶节组织（步骤 1：侵染步骤）。在此步骤中，子叶节组织优选地浸入农杆菌悬浮液（OD₆₆₀=0.5-0.8，侵染培养基（MS 盐 2.15 g/L、B5 维他命、蔗糖 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、乙酰丁香酮（AS）40 mg/L、2-吗啉乙磺酸（MES）4 g/L、玉米素（ZT）2 mg/L，pH5.3）中以启动侵染。子叶节组织与农杆菌共培养一段时期（3 天）（步骤 2：共培养步骤）。优选地，子叶节组织在侵染步骤后在固体培养基（MS 盐 4.3 g/L、B5 维他命、蔗糖 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、2-吗啉乙磺酸（MES）4 g/L、玉米素 2 mg/L、琼脂 8 g/L，pH5.6）上培养。在此共培养阶段后，有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中，恢复培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸（MES）1 g/L、蔗糖 30 g/L、玉米素（ZT）2 mg/L，琼脂 8 g/L，头孢霉素 150 mg/L，谷氨酸 100 mg/L，天冬氨酸 100 mg/L，pH5.6）中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素（头孢霉素 150-250 mg/L），不添加植物转化体的选择剂（步骤 3：恢复步骤）。优选地，子叶节再生的组织块在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养，以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着，子叶节再生的组织块在含选择剂（草甘膦）的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织（步骤 4：选择步骤）。优选地，子叶节再生的组织块在有选择剂的筛选固体培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸（MES）1 g/L、蔗糖 30 g/L、6-苄基腺嘌呤（6-BAP）1 mg/L，琼脂 8 g/L，头孢霉素 150 mg/L，谷氨酸 100 mg/L，天冬氨酸 100 mg/L，草甘膦异丙胺盐 10 mg/L，pH5.6）上培养，导致转化的细胞可以继续生长。然后，转化的细胞再生成植物（步骤 5：再生步骤），优选地，在含选择剂的培养基上生长的子叶节再生的组织块在固体培养基（B5 分化培养基和 B5 生根培养基）上培养以再生植物。

筛选得到的抗性组织块转移到所述 B5 分化培养基（B5 盐 3.1 g/L，B5 维他命、2-吗啉乙磺酸（MES）1 g/L、蔗糖 30 g/L、玉米素（ZT）1 mg/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L，谷氨酸 50 mg/L，天冬氨酸 50 mg/L，赤霉素 1 mg/L、生长素 1 mg/L、草甘膦异丙胺盐 10 mg/L，pH5.6）上，25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述 B5 生根培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、2-吗啉乙磺酸（MES）1 g/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L、吲哚-3-丁酸（IBA）1 mg/L），在生根培养上，25℃下培养至约 10 cm 高，移至温室培养至结实。在温室中，每天于 26℃下培养 16 小时，再于 20℃下培养 8 小时。

1.3、转基因事件的鉴定和筛选

一共产生了 288 个独立转基因 TO 植株。

通过 TaqManTM 分析（参见第二实施例）检测再生的转基因大豆植株是否存在 EPSPS 和 PAT 基因，并表征耐受草甘膦和草铵膦品系的拷贝数。通过筛选，选定了事件 DBN9004 是优异的，其具有单拷贝转基因、良好的草甘膦除草剂耐受性、草铵膦除草剂耐受性和农

艺性状的表现 (参见第六实施例)。

第二实施例、用 TaqMan 进行转基因大豆事件 DBN9004 检测

取转基因大豆事件 DBN9004 的叶片约 100 mg 作为样品, 用植物 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen) 提取其基因组 DNA, 通过 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法检测 EPSPS 基因和 PAT 基因的拷贝数。同时以野生型大豆植株作为对照, 按照上述方法进行检测分析。实验设 3 次重复, 取平均值。

具体方法如下:

步骤 11、取转基因大豆事件 DBN9004 的叶片 100 mg, 在研钵中用液氮研成匀浆, 每个样品取 3 个重复;

10 步骤 12、使用 Qiagen 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取上述样品的基因组 DNA, 具体方法参考其产品说明书;

步骤 13、用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度;

步骤 14、调整上述样品的基因组 DNA 浓度至同一浓度值, 所述浓度值的范围为 80-100 ng/ μ i;

15 步骤 15、采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法鉴定样品的拷贝数, 以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品, 以野生型大豆植株的样品作为对照, 每个样品 3 个重复, 取其平均值; 荧光定量 PCR 引物和探针序列分别是:

以下引物和探针用来检测 EPSPS 基因序列:

引物 1: TTGGTGCTAACCTTACCGTTGAG 如序列表中 SEQ ID NO: 16 所示;

20 引物 2: GCTTACCACGACCTTCAAGACG 如序列表中 SEQ ID NO: 17 所示;

探针 1: CTGATGCTGACGGTGTGCGTACCATC 如序列表中 SEQ ID NO: 18 所示;

以下引物和探针用来检测 PAT 基因序列:

引物 3: CAGTTGAGATTAGGCCAGCTACAG 如序列表中 SEQ ID NO: 19 所示;

引物 4: TTCCTGTAGACGTCTCAATGTAATGG 如序列表中 SEQ ID NO: 20 所示;

25 探针 2: CAGCTGATATGGCCGCGGTTTGTG 如序列表中 SEQ ID NO: 21 所示;

PCR 反应体系为:

Jump Start™ Taq ReadyMix™ (Sigma) 10 μ L

50x 引物/探针混合物 1 μ L

基因组 DNA 3 μ L

30 水 (dd H₂O) 6 μ L

所述 50x 引物/探针混合物包含 1 mM 浓度的每种引物各 45 μ L, 100 μ M 浓度的探针 50 μ L 和 860 μ L I $\times$ TE 缓冲液, 并且在 4°C, 贮藏在琥珀色试管中。

PCR 反应条件为:

步骤	温度	时间
----	----	----

21	95°C	5 分钟
22	95V	30 秒
23	60°C	1 分钟
24	回到步骤 22，重复 40 次	

5 利用 SDS2.3 软件 (Applied Biosystems) 分析数据，获得单拷贝的转基因大豆事件 DBN9004。

第三实施例、转基因大豆事件 DBN9004 检测

3.1、基因组 DNA 提取

10 DNA 提取按照常规采用的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法：取 2 克幼嫩的转基因大豆事件 DBN9004 的叶片在液氮中研磨成粉后，加入 0.5 mL 于温度 65°C 预热的 DNA 提取 CTAB 缓冲液 (20 g/L CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA (乙二胺四乙酸)，用 NaOH 调 pH 至 8.0)，充分混匀后，于温度 65°C 抽提 90 分钟；加入 0.5 倍体积苯酚，0.5 倍体积氯仿，颠倒混匀；12000 rpm (每分钟转数) 转速下离心 10 分钟；吸取上清液，加入 2 倍体积无水乙醇，轻柔晃动离心管，于温度 4°C 静置 30 分钟；12000 rpm 转速下再离心 10 分钟；收集 DNA 到管底；弃上清液，用 1 mL 质量浓度为 70% 的乙醇，洗涤沉淀；12000 rpm 转速下离心 5 分钟；真空抽干或在超净台吹干；DNA 沉淀溶解于适量的 TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中，保存在温度 -20°C 条件下。

3.2、侧翼 DNA 序列的分析

20 对上述提取的 DNA 样品进行浓度测定，使待测样品的浓度位于 80-100 ng/μL 之间。用选择出的限制性内切酶 PstI、DraI 和 TaqI (5' 端分析) 和 AflIII、TaqI 和 PstI (3' 端分析) 分别酶切基因组 DNA。每个酶切体系中加入 26.5 μL 基因组 DNA、0.5 μL 上述选择出的限制性内切酶、以及 3 μL 酶切缓冲液，酶切 1 小时。待酶切结束后，向酶切体系中加入 70 μL 无水乙醇，冰浴 30 分钟，转速 12000 rpm 离心 7 分钟，弃上清，吹干，之后加入 8.5 μL 双蒸水 (dd H₂O)、1 μL 10X T4-DNA 连接酶缓冲液 (NEB T4 DNA Ligase Reaction Buffer，其具体配方可访问 NEB 网站或参考 <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases>、<https://www.neb.com/products/b0202-t4-dna-ligase-reaction-buffer>) 以及 0.5 μL T4-DNA 连接酶在温度 4°C 连接过夜。用一系列嵌套引物进行 PCR 扩增分离 5' 和 3' 转基因/基因组 DNA。具体的，分离 5' 转基因/基因组 DNA 引物组合包括 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 26 作为第一引物，SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28 作为第二引物，SEQ ID NO: 13 作为测序引物。分离 3' 转基因/基因组 DNA 引物组合包括 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 29 作为第一引物，SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31 作为第二引物，SEQ ID NO: 15 作为测序引物，PCR 反应条件如表 3 所示。

所获得的扩增子在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳以分离 PCR 反应物，随后使用胶回收试剂盒（QIAquick Gel Extraction Kit, 目录#_ 28704, Qiagen Inc., Valencia, CA）从琼脂糖基质分离目的片段。然后对纯化的 PCR 产物测序（例如 ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA）并分析（例如，DNASTAR 序列分析软件，DNASTAR Inc., Madison, WI）。

使用标准 PCR 方法确认 5' 和 3' 侧翼序列和接点序列。5' 侧翼序列和接点序列可使用 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO: 12, 组合 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO:26 来确认。3' 侧翼序列和接点序列可使用 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:14, 组合 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO:29 来确认。PCR 反应体系和扩增条件如表 2 和表 3 所示。本领域技术人员将理解，其他引物序列也可用于确认侧翼序列和接点序列。

PCR 产物的 DNA 测序提供了可以用于设计其他 DNA 分子的 DNA，所述其他 DNA 分子作为引物和探针用于来源于转基因大豆事件 DBN9004 的大豆植物或种子的鉴定。

发现在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 1-1268 位显示的为大豆基因组序列在转基因大豆事件 DBN9004 插入序列的右边界侧翼（5' 侧翼序列），在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 6068-7059 位显示的为大豆基因组序列在转基因大豆事件 DBN9004 插入序列的左边界侧翼（3' 侧翼序列）。5' 接合序列在 SEQ ID NO: 1 中列出，3' 接合序列在 SEQ ID NO:2 中列出。

3.3、PCR 接合性测定

接合序列是相对短的多核苷酸分子，其是新的 DNA 序列，当在多核酸检测分析中检测到时对于转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 是诊断性的。SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中的接合序列为转基因大豆事件 DBN9004 中转基因片段的插入位点和大豆基因组 DNA 的每一侧的 11 个多核苷酸。更长或更短的多核苷酸接合序列可以从 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 中选择。接合序列（5' 连接区域 SEQ ID NO:1, 和 3' 连接区域 SEQ ID NO:2）作为 DNA 探针或作为 DNA 引物分子在 DNA 检测方法中是有用的。接合序列 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 也是转基因大豆事件 DBN9004 中新的 DNA 序列，其也可以作为 DNA 探针或作为 DNA 引物分子检测转基因大豆事件 DBN9004 DNA 的存在。所述 SEQ ID NO:6（SEQ ID NO:3 的核苷酸第 741-872 位）跨越了 pDBN4003 构建体 DNA 序列和 t35S 终止子序列，所述 SEQ ID NO:7（SEQ ID NO:4 的核苷酸第 170-287 位）跨越了 prGm17gTsfl 启动子序列和 pDBN4003 构建体 DNA 序列。

此外，通过使用来自 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的至少一个引物来产生扩增子，所述引物用于 PCR 方法中时产生转基因大豆事件 DBN9004 的诊断性扩增子。

具体地，从转基因插入序列的 5' 末端产生 PCR 产物，该 PCR 产物为包含来源于转基因大豆事件 DBN9004 的植物材料的基因组中侧翼于 T-DNA 插入序列的 5' 末端的基因组 DNA 的一部分。这个 PCR 产物包含 SEQ ID NO:3。为了进行 PCR 扩增，设计与侧翼于转基因插入序列的 5' 末端的基因组 DNA 序列杂交的引物 5（SEQ ID NO:8），和与之

配对的位于转基因 t35S 转录终止序列的引物 6 (SEQ ID NO:9) 。

从转基因插入序列的 3' 末端产生 PCR 产物, 该 PCR 产物包含来源于转基因大豆事件 DBN9004 的植物材料的基因组中侧翼于 T-DNA 插入序列的 3' 末端的基因组 DNA 的一部分。这个 PCR 产物包含 SEQ ID NO:4。为了进行 PCR 扩增, 设计与侧翼于转基因插入序列的 3' 末端的基因组 DNA 序列杂交的引物 8 (SEQ ID NO:11), 和与之配对的位于插入物的 3' 末端的 prGm17gTsfl 启动子序列的引物 7 (SEQ ID NO:10) 。

表 2 和表 3 中说明的 DNA 扩增条件可以用于上述 PCR 接合性试验以产生转基因大豆事件 DBN9004 的诊断性扩增子。扩增子的检测可以通过使用 Stratagene Robocycler、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪等进行, 或通过本领域技术人员已知的方法和设备进行。

表 2、用于转基因大豆事件 DBN9004 的 5' 转基因插入物/基因组接合区域鉴定的 PCR 步骤和反应混合物条件

步骤	试剂	数量	备注
1	无核酸酶的水	添加到终体积 20 μ L	
2	10 $\times$ 反应缓冲液 (与 MgCl ₂)	2.0 μ L	1 $\times$ 缓冲液终浓度, 1.5 mM MgCl ₂ 终浓度
3	dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的 10 mM 溶液	0.4 μ L	每种 dNTP 终浓度 200 μ M
4	事件引物 5 (SEQ ID NO:8 重悬浮在 1 $\times$ TE 缓冲液或无核酸酶水中到 10 μ M 的浓度)	0.2 μ L	0.1 μ M 终浓度
5	事件引物 6 (SEQ ID NO:9 重悬浮在 1 $\times$ TE 缓冲液或无核酸酶水中到 10 μ M 的浓度)	0.2 μ L	0.1 μ M 终浓度
6	RNase, 无 DNase (500 μ g/ml)	0.1 μ L	50 ng/反应
7	REDTaq® DNA 聚合酶 (1 单位/ μ l)	1.0 μ L (建议在下一步之前转换吸管)	1 单位/反应
8	提取的 DNA (模板): 待分析样品的叶片	200 ng 基因组 DNA	
	阴性对照	50 ng 非转基因大豆基因组 DNA	
	阴性对照	无模板 DNA (DNA 重悬浮在其中的溶液)	

	阳性对照	50ng 包含 DBN9004 的大豆基因组 DNA	
--	------	----------------------------	--

表 3、Perkin-Elmer9700 热循环仪条件

循环数	设置
1	94℃ 3 分钟
34	94℃ 30 秒
	64℃ 30 秒
	72℃ 1 分钟
1	72℃ 10 分钟

轻轻地混合，如果热循环仪上没有保温帽，可以在每个反应液上方添加 1-2 滴矿物油。使用以上循环参数（表 3）在 Stratagene Robocycler（Stratagene, La Jolla, CA）、M J Engine（MJ R-Biorad, Hercules, CA）、Perkin-Elmer 9700（Perkin Elmer, Boston, MA）或 Eppendorf Mastercycler Gradient（Eppendorf, Hamburg, Germany）热循环仪上进行 PCR。M J Engine 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪应当在计算的模式下运行。Perkin-Elmer 9700 热循环仪运行时要将变温速率（ramp speed）设定为最大值。

实验结果表明：引物 5 和 6（SEQ ID NO:8 和 9），当其用在转基因大豆事件 DBN9004 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 1207 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化大豆基因组 DNA 和非 DBN9004 大豆基因组 DNA 的 PCR 反应中时，没有片段被扩增；引物 7 和 8（SEQ ID NO:10 和 11），当其用在转基因大豆事件 DBN9004 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 631 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化大豆基因组 DNA 和非 DBN9004 大豆基因组 DNA 的 PCR 反应中时，没有片段被扩增。

PCR 接合性测定还可用于鉴定来源于转基因大豆事件 DBN9004 的材料是纯合子或是杂合子。将引物 9（SEQ ID NO:12）、引物 10（SEQ ID NO:13）和引物 11（SEQ ID NO: 14）用于扩增反应以产生转基因大豆事件 DBN9004 的诊断性扩增子。表 4 和表 5 中说明的 DNA 扩增条件可以用于上述接合性试验以产生转基因大豆事件 DBN9004 的诊断性扩增子。

表 4、接合性测定反应液

步骤	试剂	数量	备注
1	无核酸酶的水	添加到终体积 10 μ L	
2	2 $\times$ Universal Master Mix（Applied Biosystems 目录号 4304437）	5 μ L	1 $\times$ 终浓度
3	引物 9 SEQ ID NO:12、引物 10 SEQ ID NO:13 和引物 11 SEQ ID NO:14	0.3 μ L	0.1 μ M 终浓度

	(重悬浮于无核酸酶水的中到 10 μM 的浓度)		
4	REDTaq® DNA 聚合酶 (1 单位/μL)	1.0 μL (建议在下一步之前转换吸管)	1 单位/反应
5	提取的 DNA (模板): 待分析样品的叶片	200 ng 基因组 DNA	
	阴性对照	50 ng 非转基因大豆基因组 DNA	
	阴性对照	无模板 DNA (DNA 重悬浮在其中的溶液)	
	阳性对照	50 ng 包含 DBN9004 的大豆基因组 DNA	

表 5、接合性测定 Perkin-Elmer9700 热循环仪条件

循环数	设置
1	95℃ 10 分钟
10	95℃ 15 秒
	64℃ 1 分钟 (-1℃/循环)
30	95℃ 15 秒
	54℃ 1 分钟
1	10℃ 浸没

使用以上循环参数 (表 5) 在 Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA)、M J Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA)、Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) 或 Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) 热循环仪上
5 进行 PCR。M J Engine 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪应当在计算的模式下运行。Perkin-Elmer 9700 热循环仪运行时要将变温速率 (ramp speed) 设定为最大值。

在所述扩增反应中, 含有模板 DNA 的生物样品含有诊断该样品中转基因大豆事件 DBN9004 的存在情况的 DNA。或者反应将由含有来源于大豆基因组的 DNA 的生物样品产生两个不同的 DNA 扩增子, 所述来源于大豆基因组的 DNA 相对于转基因大豆事件
10 DBN9004 中存在的插入 DNA 对应的等位基因是杂合的。这两个不同的扩增子将对应于来源于野生型大豆基因组基因座的第一扩增子和诊断转基因大豆事件 DBN9004DNA 的存在情况的第二扩增子。仅产生对应于针对杂合基因组描述的第二扩增子的单个扩增子的大豆 DNA 样品, 可诊断确定该样品中转基因大豆事件 DBN9004 的存在, 且该样品由相对于转基因大豆植物 DBN9004 中存在的插入 DNA 对应的等位基因为纯合的大豆种子所
15 产生。

需要说明的是，转基因大豆事件 DBN9004 的引物对被用于产生对转基因大豆事件 DBN9004 基因组 DNA 为诊断性的扩增子。这些引物对包括但不限于，引物 5 和 6 (SEQ ID NO:8 和 9)，和引物 7 和 8 (SEQ ID NO:10 和 11)，用于所述的 DNA 扩增方法中。另外，用于扩增大豆内源基因的一个对照引物 12 和 13 (SEQ ID NO:22 和 23) 被包括在内，作为反应条件的一个内在标准。对转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 抽提样品分析应该包括一个转基因大豆事件 DBN9004 的阳性组织 DNA 抽提物对照，一个来源于非转基因大豆事件 DBN9004 的阴性 DNA 抽提物对照和一个不含有模板大豆 DNA 抽提物的阴性对照。除了这些引物对之外，还可以使用来自 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4、或其互补序列的任何引物对，当它们被用于 DNA 扩增反应时分别产生对于来源于转基因事件大豆植物 DBN9004 的组织为诊断性的包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO:2 的扩增子。表 2-表 5 中说明的 DNA 扩增条件可以用于使用合适的引物对以产生转基因大豆事件 DBN9004 的诊断性扩增子。当在 DNA 扩增方法中测试时产生对转基因大豆事件 DBN9004 为诊断性的扩增子的、推定含有包含转基因大豆事件 DBN9004 的大豆植物或种子 DNA 的提取物，或来源于转基因大豆事件 DBN9004 的产物，可以被用作扩增的模板，来确定是否存在转基因大豆事件 DBN9004。

第四实施例、通过 Southern 印迹杂交进行转基因大豆事件 DBN9004 检测

4.1、用于 Southern 印迹杂交的 DNA 提取

利用 T4、T5 和 T6 代纯合的转化事件进行 Southern 印迹分析。利用研钵和研杵，在液氮中将植物组织磨碎。在 20 mL CTAB 裂解缓冲液 (100 mM Tris pH8.0, 20 mM EDTA pH8.0, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v β -巯基乙醇, 2% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮) 中重悬浮 4-5 g 研磨过的植物组织，并且在温度 65°C 下温育 60 分钟。温育期间，每 10 分钟将样品颠倒混匀一次。温育后，添加等体积的氯仿/异戊醇 (24:1)，通过倒置轻轻混合，以转速 4000 rpm 离心 20 分钟。收集水相，在添加等体积异丙醇后在温度 -20 °C 下放置 1 小时以沉淀 DNA，再以转速 4000 rpm 离心 5 分钟得到 DNA 沉淀，然后在 1 mL TE 缓冲液中重悬浮 DNA 沉淀。为了降解任何存在的 RNA，在温度 37°C 下，将 DNA 和浓度为 30 mg/mL 的 5 μ L RNAase A 温育 30 分钟，以转速 4000 rpm 离心 5 分钟，然后在 0.1 体积 3 M 醋酸钠和 2 体积无水乙醇存在的情况下，以转速 14000 rpm 离心 10 分钟沉淀 DNA。弃掉上清液后，用 70%(v/v) 的 1 mL 乙醇洗涤沉淀，使其干燥后在 1 mL TE 缓冲液中重新溶解。用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度。

4.2、限制酶消化

在 100 μ L 反应体系中，每次消化 5 μ g DNA。用限制性内切酶 EcoRI 和 EcoRV 分别消化基因组 DNA，以 T-DNA 上 EPSPS 和 PAT 的部分序列作为探针。对于每种酶，在适当的温度下过夜温育消化物。利用真空离心蒸发浓缩器 (speed vacuum, Thermo Scientific) 旋转样品以减少体积至 20 μ L。

4.3、凝胶电泳

向来源于本实施例 4.2 中的每个样品添加溴酚蓝加样染料，并且将每个样品加样到含有溴化乙锭的 0.7% 琼脂糖凝胶上，在 TAE 电泳缓冲液（40 mM Tris- 醋酸，2 mM EDTA, pH8.0）中电泳分离，在 20 伏特下电泳凝胶过夜。

- 5 分别用变性液（1.5 M NaCl，0.5 M NaOH）和中和液（1.5 M NaCl，0.5 M Tris, pH7.2）处理凝胶各 30 分钟。在瓷盘中倒入 5 X SSC，搭上一块玻璃板，然后依次放浸湿的滤纸桥，凝胶，带正电的尼龙膜（Roche, Cat. No. 11417240001），三层滤纸，纸塔，重物。在室温下转膜过夜后，在 2 X SSC 中漂洗尼龙膜 10 秒，通过 UV 交联将 DNA 固定在膜上。

4.4、杂交

- 10 用 PCR 扩增适合的 DNA 序列用于探针制备。所述 DNA 探针为 SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:25，或者与上述序列部分同源或互补。用 DNA 高效地高辛标记及检测试剂盒 II（DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒，Roche, Cat. No. 11585614910）进行探针的 DIG 标记、Southern 印迹杂交以及信号检测等操作，具体方法参考其产品说明书。

- 15 每个 Southern 上包括两种对照样品：（1）来自阴性（未转化的）的分离子的 DNA，其用于鉴定任何可与元件-特异性探针杂交的内源大豆序列；（2）基于探针长度等价于一个拷贝数的 Hind III- 消化的 pDBN4003 质粒，其作为杂交的阳性对照并用于说明实验的灵敏度。

- 20 杂交数据提供了确证的证据支持 TaqMan™ PCR 分析，即大豆植物 DBN9004 含有 EPSPS 和 PAT 基因的单拷贝。利用该 EPSPS 探针，EcoR I 和 EcoR V 酶切分别产生大小约 11 kb 和 13 kb 的单一一条带；利用该 PAT 探针，EcoR I 和 EcoR V 酶切分别产生大小约 8 kb 和 3.2 kb 的单一一条带。这表明 EPSPS 和 PAT 各一个拷贝存在于大豆转化事件 DBN9004 中。

第五实施例、通过 ELISA 检测转基因大豆事件名称蛋白质

- 25 EPSPS 和 PAT 蛋白质在转基因大豆事件 DBN9004 中的表达范围，可通过 ELISA 进行检测。

- 30 取 2 mg 转基因大豆事件 DBN9004 的新鲜叶片作为样品，液氮研磨后加入 1 mL 所述萃取缓冲液（8 g/L NaCl，0.27 g/L KH₂PO₄，1.42 g/L Na₂HPO₄，0.2 g/L KCl，5.5 ml/L Tween-20，pH7.4），4000 rpm 的转速下离心 10 分钟，取上清液用所述萃取缓冲液稀释 40 倍，取 80 μl 稀释后的上清液用于 ELISA 检测。

用 ELISA（酶联免疫吸附测定法）试剂盒（ENVIRLOGIX 公司，EPSPS 试剂盒和 PAT 试剂盒）对样品中蛋白质（EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白）量占叶片鲜重的比例进行检测分析，具体方法参考其产品说明书。同时以野生型大豆植株叶片（非转基因，NGM）作为对照，按照上述方法进行检测分析，每株重复 6 次。

转基因大豆事件 DBN9004 的蛋白质 (EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白) 含量的实验结果如表 6 所示。分别测得转基因大豆事件 DBN9004 和野生型大豆植株的新鲜叶片中 EPSPS 蛋白平均表达量占叶片鲜重的比例 ($\mu\text{g/g}$) 分别为 230.9 和 0; 转基因大豆事件 DBN9004 和野生型大豆植株的新鲜叶片中 PAT 蛋白平均表达量占叶片鲜重的比例 ($\mu\text{g/g}$) 分别为 200.1 和 0。

表 6、转基因大豆事件 DBN9004 的蛋白表达量 ($\mu\text{g/g}$) 测定平均结果

蛋白/植株	DBN9004	NGM
EPSPS 蛋白	230.9 $\pm$ 1.04	0
PAT 蛋白	200.1 $\pm$ 1.07	0

第六实施例、转基因大豆事件 DBN9004 的除草剂耐受性检测

本试验选用农达除草剂 (4.1% 草甘膦异丙铵盐药剂) 和保试达 (Basta) 除草剂 (有效成分 18% 的草铵膦) 进行喷施。采用随机区组设计, 3 次重复。小区面积为 18 m² (5 m $\times$ 3.6 m), 行距 60 cm, 株距 8 cm, 常规栽培管理, 小区之间有 1 m 的宽隔离带。将转基因大豆事件 DBN9004 分别进行如下 3 种处理: 1) 不喷施, 人工控草; 2) 按 1680 g a.e./ha (a.e./ha 是指 "活性成分当量酸每公顷") 剂量在 V3 叶期喷洒农达除草剂, 然后在 R2 期 (盛花期) 按相同剂量再次喷洒农达除草剂; 3) 按 800 g a.i./ha (a.i./ha 是指 "活性成分每公顷") 剂量在 V3 叶期喷洒保试达除草剂, 然后在 V6 期按相同剂量再次喷洒保试达除草剂; 4) 按 800 g a.i./ha 剂量在 V3 叶期喷洒保试达除草剂, 然后在 R2 期按 1680 g a.e./ha 剂量喷洒农达除草剂。用野生型大豆植株 (非转基因, NGM) 做平行对照实验。需要说明的是, 不同含量和剂型的草甘膦除草剂换算成等量草甘膦酸的形式, 以及不同浓度的草铵膦溶液换算成上述等量有效成分草铵膦均适用于以下结论。

分别在用药后 1 周和 2 周调查药害症状, 并在收获时测定小区的大豆产量。药害症状分级如表 7 所示。用除草剂受害率作为评价转化事件的除草剂耐受性的指标, 具体地, 除草剂受害率 (%) = $\frac{\sum (\text{同级受害株数} \times \text{级别数})}{\text{总株数} \times \text{最高级别}}$; 其中除草剂受害率包括草甘膦受害率和草铵膦受害率, 除草剂受害率是根据草甘膦或草铵膦处理后 2 周的药害调查结果而确定的。每个小区的大豆产量是称量各小区中间 3 行的大豆粒总产量 (重量), 不同处理间的产量差异以产量百分率的形式进行度量, 产量百分率 (%) = 喷施产量/不喷施产量。转基因大豆事件 DBN9004 对除草剂耐受性的结果和大豆产量结果如表 8 所示。

表 7、除草剂对大豆药害程度的分级标准

药害级别	症状描述
1	生长正常, 无任何受害症状
2	轻微药害, 药害少于 10%
3	中等药害, 以后能恢复, 不影响产量

4	药害较重，难以恢复，造成减产
5	药害严重，不能恢复，造成明显减产或绝产

表 8、转基因大豆事件 DBN9004 对除草剂耐受性的结果和产量测试结果

项 目/植 株	DBN9004	NGM
除草剂受害率 (%) (不喷施)	0	0
草甘膦受害率 (%)	0	100
草铵膦受害率 (%)	0	100
草铵膦+草甘膦受害率 (%)	0	100
产量百分率 (%) (草甘膦)	109.7	0
产量百分率 (%) (草铵膦)	106.2	0
产量百分率 (%) (草铵膦+草甘膦)	111.5	0

结果说明，在除草剂（草甘膦和草铵膦）受害率方面：1) 转基因大豆事件 DBN9004 在草甘膦除草剂（1680 g a.e./ha）处理下受害率基本为 0；2) 转基因大豆事件 DBN9004 在草铵膦除草剂（800 g a.i./ha）处理下受害率也基本为 0；3) 转基因大豆事件 DBN9004 在草铵膦除草剂（800 g a.i./ha）和草甘膦除草剂（1680 g a.e./ha）处理下受害率也基本为 0；由此，转基因大豆事件 DBN9004 具有良好的除草剂（草甘膦和草铵膦）耐受性。

在产量方面：转基因大豆事件 DBN9004 在喷施草甘膦除草剂（1680 g a.e./ha）、草铵膦除草剂（800 g a.i./ha）和草铵膦除草剂（800 g a.i./ha）+草甘膦除草剂（1680 g a.e./ha）3 种处理下的产量与不喷施处理相比有略有增加，由此，进一步表明转基因大豆事件 DBN9004 具有良好的除草剂（草甘膦和草铵膦）耐受性。

第七实施例

可由转基因大豆事件 DBN9004 生产诸如农产品或商品。如果在所述农产品或商品中检测到足够的表达量，所述农产品或商品预期含有能够诊断转基因大豆事件 DBN9004 材料在所述农产品或商品中存在的核苷酸序列。所述食品或商品包括但不限于来自大豆植物 DBN9004 的产物，例如大豆饼、粉和油，具体可以为卵磷脂、脂肪酸、甘油、固醇、食用油、脱脂大豆片、包括脱脂的和烘烤的大豆粉、豆浆凝块、豆腐、大豆蛋白浓缩物、分离的大豆蛋白、水解植物蛋白、组织化大豆蛋白和大豆蛋白纤维等。基于探针或引物对的核酸检测方法和/或试剂盒可以被开发以检测生物样品中诸如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的转基因大豆事件 DBN9004 核苷酸序列，其中探针序列或引物序列选自如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中所示的序列或其片段或者与之互补的序列，以诊断转基因大豆事件 DBN9004 的存在。

综上所述，本发明转基因大豆事件 DBN9004 对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有较好的耐受性，对产量无影响，且检测方法可以准确快速的鉴定生物样品中是否包含转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 分子。

对应于转基因大豆事件 DBN9004 的种子已于 2015 年 11 月 27 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 分类命名: 大豆 (Glycine max), 保藏编号为 CGMCC No.11171。保藏物将在保藏处保藏 30 年。

- 5 最后所应说明的是, 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制, 尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

权利要求书

1、一种具有 以下核酸序列的核酸分子 ,其特征在于 ,所述核酸序列包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸。

2、根据权利要求 1所述核酸分子 ,其特征在于 ,所述核酸序列包括 SEQ ID NO: 1 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列。

3、根据权利要求 2所述的核酸分子 ,其特征在于 ,所述核酸序列包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列。

4、根据权利要求 3所述的核酸分子 ,其特征在于 ,所述核酸序列包括 SEQ ID NO:5 或其互补序列。

5、一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,包括 :

使待检测样品与用于扩增 目标扩增产物的至少两种引物在核酸扩增反应中接触 ;

进行核酸扩增反应 ;和

检测所述 目标扩增产物的存在 ;

所述 目标扩增产物包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸。

6、根据权利要求 5所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,所述 目标扩增产物包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

7、根据权利要求 5 或 6所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,所述 目标扩增产物包括选自以下的至少一种 :SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

8、根据权利要求 5-7 任一项所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,至少一种所述引物包括权利要求 1-4 任一项所述核酸序列或其片段或者与之互补的序列。

9、根据权利要求 8所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,所述引物包括第一引物和第二引物 ,所述第一引物选自 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO: 10 ;所述第二引物选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 。

10、一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法 ,其特征在于 ,包括 :

使待检测样品与探针接触 ,所述探针包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连

续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸；

使所述待检测样品和所述探针在严格杂交条件下杂交；和

检测所述待检测样品和所述探针的杂交情况。

11、根据权利要求 10 所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，
5 其特征在于，所述探针包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

12、根据权利要求 10 或 11 所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，其特征在于，所述探针包含选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

10 13、根据权利要求 10-12 任一项所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，其特征在于，至少一个所述探针用至少一种荧光基团标记。

14、一种检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，其特征在于，包括：

15 使待检测样品与标记物核酸分子接触，所述标记物核酸分子包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸；

使所述待检测样品和所述标记物核酸分子在严格杂交条件下杂交；和

检测所述待检测样品和所述标记物核酸分子的杂交情况，进而通过标记物辅助育种分析以确定草甘膦耐受性和/或草铵膦耐受性与标记物核酸分子在遗传学上是连锁的。

20 15、根据权利要求 14 所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，其特征在于，所述标记物核酸分子包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

16、根据权利要求 14 或 15 所述检测样品中转基因大豆事件 DBN9004 的 DNA 存在的方法，其特征在于，所述标记物核酸分子包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、SEQ ID NO:6 或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

17、一种 DNA 检测试剂盒，其特征在于，包括至少一个 DNA 分子，所述 DNA 分子包括 SEQ ID NO:3 的同源序列或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 的同源序列或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸，其可以作为对于转基因大豆事件 DBN9004 或其后代具有特异性的 DNA 引物或探针。

18、根据权利要求 17 所述 DNA 检测试剂盒，其特征在于，所述 DNA 分子包括 SEQ ID NO:1 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸、和/或 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 位连续核苷酸。

19、根据权利要求 17 或 18 所述 DNA 检测试剂盒，其特征在于，所述 DNA 分子包

括选自以下的至少一种：SEQ ID NO: 1 的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:2 的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:6 的同源序列或其互补序列、和 SEQ ID NO:7 的同源序列或其互补序列。

20、一种植物细胞或部分，其特征在于，包含编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列、编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列和特定区域的核酸序列，所述特定区域的核酸序列包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示的序列。

21、一种产生对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植株的方法，其特征在于，包括向所述大豆植株的基因组中引入编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、以及特定区域的核酸序列，所述特定区域的核酸序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列；

优选地，所述方法包括向所述大豆植株的基因组中引入 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列。

22、根据权利要求 21 所述产生对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植株的方法，其特征在于，包括：

将对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的转基因大豆事件 DBN9004 第一亲本大豆植株与缺少草甘膦和/或草铵膦耐受性的第二亲本大豆植株有性杂交，从而产生大量子代植株；

20 用草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂处理所述子代植株；和

选择耐受草甘膦和/或草铵膦的所述子代植株。

23、一种培养对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂具有耐受性的大豆植物的方法，其特征在于，包括：

25 种植至少一粒大豆种子，所述大豆种子的基因组中包括编码草甘膦耐受性 EPSPS 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、以及特定区域的核酸序列；

使所述大豆种子长成大豆植株；和

用有效剂量草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂喷洒所述大豆植株，收获与其他不具有特定区域的核酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤的植株；

30 所述特定区域的核酸序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列；

优选地，所述方法包括：

种植至少一粒大豆种子，所述大豆种子的基因组中包含 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列；

使所述大豆种子长成玉米植株；

用有效剂量草甘膦除草剂喷洒所述大豆植株，收获与其他不具有 SEQ ID NO:5 的植株相比具有减弱的植物损伤的植株。

24、一种保护植物免受由除草剂引起的损伤和/或控制田间杂草的方法，其特征在于，包括将含有有效剂量草甘膦和/或草铵膦的除草剂施加到种植至少一种转基因大豆植物的大田中，所述转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列，所述转基因大豆植物具有对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

25、一种控制草甘膦耐受性植物的大田中草甘膦抗性杂草的方法，其特征在于，包括将含有有效剂量草铵膦的除草剂施加到种植至少一种草甘膦耐受性的转基因大豆植物的大田中，所述草甘膦耐受性的转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列，所述草甘膦耐受性的转基因大豆植物同时具有对草铵膦除草剂的耐受性。

26、一种延缓昆虫抗性的方法，其特征在于，包括在种植抗虫大豆植物的大田中种植至少一种具有草甘膦和/或草铵膦耐受性的转基因大豆植物，所述具有草甘膦和/或草铵膦耐受性的转基因大豆植物在其基因组中包含选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 所示序列中至少一种核酸序列。

27、一种包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的多核苷酸的农产品或商品，其特征在于，所述农产品或商品为卵磷脂、脂肪酸、甘油、固醇、大豆片、大豆粉、大豆蛋白或其浓缩物、大豆油、大豆蛋白纤维、豆浆凝块或豆腐。

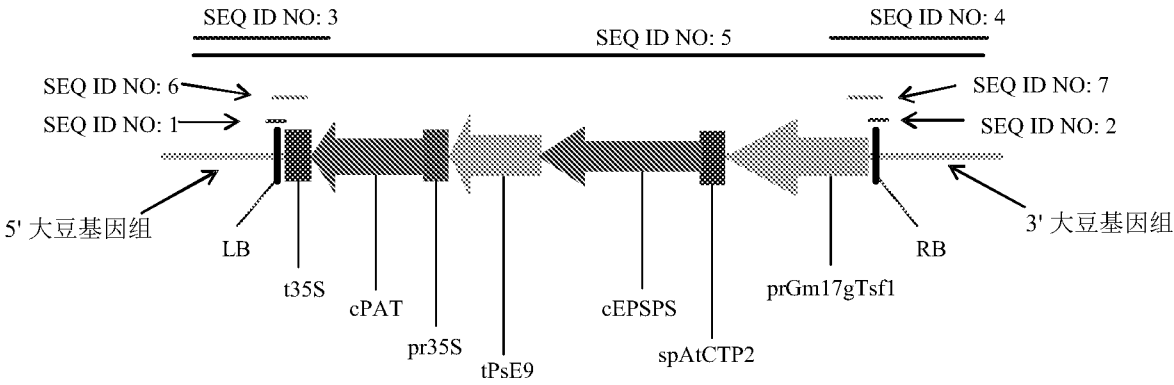


图 1

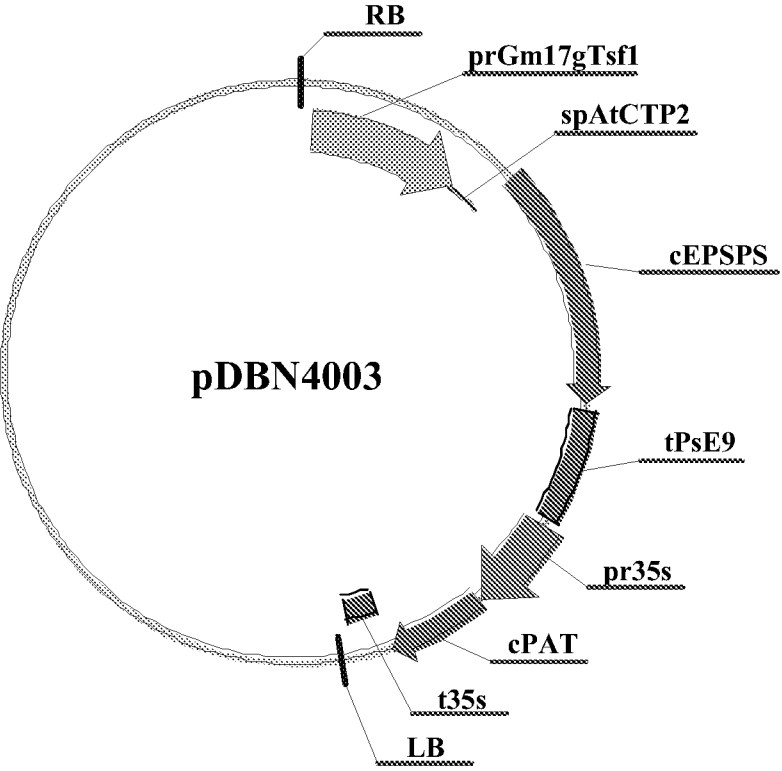


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079658

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence (s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐ on paper

☒ in electronic form

b. (time)

☒ in the international application as filed

☐ together with the international application in electronic form

☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079658

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Group 1: claims 1-27 (partial of each), relating to nucleic acid molecules as shown in SEQ ID NO: 1 and nucleic acid molecules of SEQ ID NO: 3 or 5 comprising SEQ ID NO: 1, and relevant method of detecting, detection kit, plant cell or part, method of generating soybean plant, method of culturing soybean plant, method of protecting plants, method of controlling weeds, method of delay insect resistance, and agricultural products or commodity comprising said nucleic acid;
- [2] Group 2: claims 1-27 (partial of each), relating to SEQ ID NO: 6 and nucleic acid molecules of SEQ ID NO: 3 or 5 comprising SEQ ID NO: 6, and relevant method of detecting, detection kit, plant cell or part, method of generating soybean plant, method of culturing soybean plant, method of protecting plants, method of controlling weeds, method of delay insect resistance, and agricultural products or commodity comprising said nucleic acid;
- [3] Group 3: claims 1-27 (partial of each), relating to SEQ ID NO: 2 and nucleic acid molecules of SEQ ID NO: 4 or 5 comprising SEQ ID NO: 2, and relevant method of detecting, detection kit, plant cell or part, method of generating soybean plant, method of culturing soybean plant, method of protecting plants, method of controlling weeds, method of delay insect resistance, and agricultural products or commodity comprising said nucleic acid;
- [4] Group 4: claims 1-27 (partial of each), relating to SEQ ID NO: 7 and nucleic acid molecules of SEQ ID NO: 4 or 5 comprising SEQ ID NO: 7, and relevant method of detecting, detection kit, plant cell or part, method of generating soybean plant, method of culturing soybean plant, method of protecting plants, method of controlling weeds, method of delay insect resistance, and agricultural products or commodity comprising said nucleic acid.
- [5] The nucleic acids used in said 4 groups of inventions do not have the same structures, said 4 groups of inventions do not have the same or corresponding specific technical features, and accordingly said 4 groups of inventions do not fall within a single inventive concept, lack unity of invention therebetween, and do not comply with the requirement of PCT Rule 13.1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1-27 (partial of each), the part relating to SEQ ID Nos: 1, 3, and 5

- Remark on protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079658

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; A01H 5/00 (2006.01) i; A01H 1/02 (2006.01) i; A01N 57/20 (2006.01) i; A01N 25/32 (2006.01) i; A01P 13/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12Q; A01H; A01N; A01P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED;

Search terms: soybean, BEAN?, Glycine max, TRANSGEN+, DETECT+, DBN9004;

GenBank, EMBL, DDBJ: sequence search relates to SEQ ID NOS: 1, 3, and 5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106086011 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.), 09 November 2016 (09.11.2016), see claims 1-28	1-27
X	"GenBank accession number: FJ154952", GENBANK DATABASE, 23 September 2008 (23.09.2008), see sequences and related information	1
X	"GenBank accession number: GQ497217", GENBANK DATABASE, 28 September 2009 (28.09.2009), see sequences and related information	1
X	"GenBank accession number: DQ156557", GENBANK DATABASE, 01 March 2006 (01.03.2006), see sequences and related information	1
Y	"GenBank accession number: FJ154952", GENBANK DATABASE, 23 September 2008 (23.09.2008), see sequences and related information	17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 28 June 2017 (28.06.2017)	Date of mailing of the international search report 10 July 2017 (10.07.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer W U Jingchen Telephone No.: (86-10) 62089319

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/079658

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102596984 A (MONSANTO COMPANY), 18 July 2012 (18.07.2012), see claims 10	17
A	CN 102596984 A (MONSANTO COMPANY), 18 July 2012 (18.07.2012), see the whole document	1-16, 18-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/079658

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106086011 A	09 November 2016	None	
CN 102596984 A	18 July 2012	WO 2011034704 A I	24 March 2011
		US 2014041075 A I	06 February 2014
		MX 2012003299 A	20 April 2012
		US RE46292 E	31 January 2017
		JP 5726878 B 2	03 June 2015
		RU 2012115127 A	27 October 2013
		AU 2010295864 B 2	10 October 2013
		NZ 598724 A	25 January 2013
		US 9447428 B 2	20 September 2016
		EP 2478000 A I	25 July 2012
		CA 2773929 C	19 April 2016
		AP 2872 A	31 March 2014
		AR 077976 A I	05 October 2011
		JP 2015077134 A	23 April 2015
		US 2011067134 A I	17 March 2011
		CA 2773929 A I	24 March 2011
		WO 2011034704 A 8	03 June 2011
		US 2016319299 A I	03 November 2016
		KR 20120081150 A	18 July 2012
		AP 2012062 17 D O	30 April 2012
		EP 3127425 A 3	10 May 2017
		EP 2478000 A 4	14 May 2014
		AU 2010295864 C I	30 April 2015
		JP 2013505020 A	14 February 2013
		US 8501407 B 2	06 August 2013
		EP 3127425 A 2	08 February 2017
		JP 5985588 B 2	06 September 2016
		CO 6531446 A 2	28 September 2012
		IN 2963DEN2012 A	31 July 2015
		KR 101376028 B I	19 March 2014
		AU 2010295864 A I	05 April 2012
		UY 32867 A	30 March 2012
		SG 179103 A I	30 May 2012

A. 主题的分类

C12N 15/11 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; AOIH 5/00 (2006.01) i; AOIH 1/02 (2006.01) i; AOIN 57/20 (2006.01) i; AOIN 25/32 (2006.01) i; AOIP 13/00 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C12N; C12Q; A01H; A01N; A01P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI, WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED; 检索词: 大豆, 转基因, 检测, BEAN?, Glycine max, TRANSGEN+, DETECT+, DBN9004; GenBank, EMBL, DDBJ: 关于 SEQ ID NOS: 1, 3, 5 的序列检索

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106086011 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2016 年 11 月 9 日 (2016 - 11 - 09) 参见权利要求 1-28	1-27
X	"GenBank 登录号: FJ154952" GENBANK DATABASE, 2008 年 9 月 23 日 (2008 - 09 - 23), 参见序列及相关信息	1
X	"GenBank 登录号: GQ497217" GENBANK DATABASE, 2009 年 9 月 28 日 (2009 - 09 - 28), 参见序列及相关信息	1
X	"GenBank 登录号: DQ156557" GENBANK DATABASE, 2006 年 3 月 1 日 (2006 - 03 - 01), 参见序列及相关信息	1
Y	"GenBank 登录号: FJ154952" GENBANK DATABASE, 2008 年 9 月 23 日 (2008 - 09 - 23), 参见序列及相关信息	17

☒ 其余文件在 c 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017 年 6 月 28 日

国际检索报告邮寄日期

2017 年 7 月 10 日

ISA/CN 的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

吴汀晨

电话号码 (86-10) 62089319

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 102596984 A (孟山都技术公司) 2012 年 7 月 18 0 (2012 - 07 - 18) 参见权利要求 10	17
A	CN 102596984 A (孟山都技术公司) 2012 年 7 月 18 0 (2012 - 07 - 18) 参见全文	1—16, 18-27

第 I 栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第 I 页第 1.c 项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在 申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见：

第 III 栏 缺乏发明单一性的意见 (续第 I 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 组 1：权利要求 1-27 (均为部分)，涉及 SEQ ID NO: 1 所示的核酸分子及包含 SEQ ID NO: 1 的 SEQ ID NO: 3 或 5 的核酸分子，以及相关的检测方法、检测试剂盒、植物细胞或部分、产生大豆植株的方法、培养大豆植物的方法、保护植物的方法、控制杂草的方法、延缓昆虫抗性的方法、和包含上述核酸的农产品或商品；
- [2] 组 2：权利要求 1-27 (均为部分)，涉及 SEQ ID NO: 6 及包含 SEQ ID NO: 6 的 SEQ ID NO: 3 或 5 的核酸分子，以及相关的检测方法、检测试剂盒、植物细胞或部分、产生大豆植株的方法、培养大豆植物的方法、保护植物的方法、控制杂草的方法、延缓昆虫抗性的方法、和包含上述核酸的农产品或商品；
- [3] 组 3：权利要求 1-27 (均为部分)，涉及 SEQ ID NO: 2 及包含 SEQ ID NO: 2 的 SEQ ID NO: 4 或 5 的核酸分子，以及相关的检测方法、检测试剂盒、植物细胞或部分、产生大豆植株的方法、培养大豆植物的方法、保护植物的方法、控制杂草的方法、延缓昆虫抗性的方法、和包含上述核酸的农产品或商品；
- [4] 组 4：权利要求 1-27 (均为部分)，涉及 SEQ ID NO: 7 及包含 SEQ ID NO: 7 的 SEQ ID NO: 4 或 5 的核酸分子，以及相关的检测方法、检测试剂盒、植物细胞或部分、产生大豆植株的方法、培养大豆植物的方法、保护植物的方法、控制杂草的方法、延缓昆虫抗性的方法、和包含上述核酸的农产品或商品。
- [5] 上述 4 组发明所使用的核酸分子之间没有相同的结构，导致 4 组发明之间也不具备相同或相应的特定技术特征，因而这 4 组发明不属于一个总的发明构思，不具有单一性，不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定。
1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：权利要求 1-27 (均为部分)，涉及 SEQ ID No: 1, 3, 5 的部分

对异议的意见

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN20 17/079658

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106086011	A	2016 年 11 月 9 日	无			
CN	102596984	A	2012 年 7 月 18 日	WO	2011034704	AI	2011 年 3 月 24 日
				US	2014041075	AI	2014 年 2 月 6 日
				MX	2012003299	A	2012 年 4 月 20 日
				US	RE46292	E	2017 年 1 月 31 日
				JP	5726878	B2	2015 年 6 月 3 日
				RU	2012115127	A	2013 年 10 月 27 日
				AU	2010295864	B2	2013 年 10 月 10 日
				NZ	598724	A	2013 年 1 月 25 日
				US	9447428	B2	2016 年 9 月 20 日
				EP	2478000	AI	2012 年 7 月 25 日
				CA	2773929	C	2016 年 4 月 19 日
				AP	2872	A	2014 年 3 月 31 日
				AR	077976	AI	2011 年 10 月 5 日
				JP	2015077134	A	2015 年 4 月 23 日
				US	2011067134	AI	2011 年 3 月 17 日
				CA	2773929	AI	2011 年 3 月 24 日
				WO	2011034704	A8	2011 年 6 月 3 日
				US	2016319299	AI	2016 年 11 月 3 日
				KR	20120081150	A	2012 年 7 月 18 日
				AP	201206217	DO	2012 年 4 月 30 日
				EP	3127425	A3	2017 年 5 月 10 日
				EP	2478000	A4	2014 年 5 月 14 日
				AU	2010295864	CI	2015 年 4 月 30 日
				JP	2013505020	A	2013 年 2 月 14 日
				US	8501407	B2	2013 年 8 月 6 日
				EP	3127425	A2	2017 年 2 月 8 日
				JP	5985588	B2	2016 年 9 月 6 日
				CO	6531446	A2	2012 年 9 月 28 日
				IN	2963DEN2012	A	2015 年 7 月 31 日
				KR	101376028	BI	2014 年 3 月 19 日
				AU	2010295864	AI	2012 年 4 月 5 日
				UY	32867	A	2012 年 3 月 30 日
				SG	179103	AI	2012 年 5 月 30 日