

(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
2016年11月3日 (03.11.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/173508 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/11 (2006.01) A01P 7/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) A01G 7/06 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/32 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
A01N 47/44 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/080542

(22) 国际申请日: 2016年4月28日 (28.04.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510219911.8 2015年4月30日 (30.04.2015) 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]; 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: 康越景 (KANG, Yuejing); 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)。郭明欣 (GUO, Mingxin); 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)。刘海利 (LIU, Haili); 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)。张成伟 (ZHANG, Chengwei); 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)。丁德荣 (DING, Derong); 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)。焦国伟 (JIAO, Guowei); 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)。魏雪松 (WEI, Xuesong); 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)。汤波 (TANG, Bo); 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)。夏祖灵 (XIA, Zuling); 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)。熊冠军 (XIONG, Guanjun); 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)。徐亮 (XU, Liang); 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)。鲍晓明 (BAO, Xiaoming); 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)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特广场7层, Beijing 100004 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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。

[见续页]

(54) Title: HERBICIDE-TOLERANT MAIZE PLANT DBN9858, AND NUCLEOTIDE SEQUENCE AND METHOD FOR DETECTING SAME

(54) 发明名称: 除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 及用于检测其的核酸序列和方法

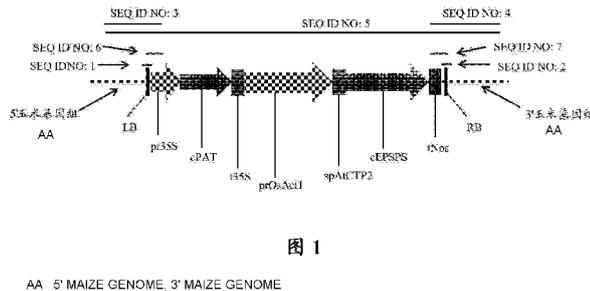


图 1

AA 5' MAIZE GENOME, 3' MAIZE GENOME

(57) Abstract: Provided are a nucleotide sequence for detecting a maize event DBN9858 existing in a biological sample, and a detecting method therefor.

(57) 摘要: 提供了用于检测生物样品中存在玉米事件 DBN9858 的核酸序列及其检测方法。



WO 2016/173508 A1



(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)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 及用于检测其的核酸序列和方法

本申请要求于 2015 年 04 月 30 日提交中国专利局、申请号为 201510219911.8、发明名称为“用于检测除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 的核酸序列及其检测方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及一种用于检测除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 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玉米植物 DBN9858 和检测生物样品中是否包含特定转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 分子的方法。

背景技术

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。

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。

玉米 (*Zea mays* L.) 在世界上很多地区都是主要的粮食作物。在玉米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。玉米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) 在玉米植物中表达而获得，例如玉米事件 NK603、玉米事件 MON88017 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。

5 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（一种对于植物中的氮解毒必需的酶）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，其速效性间于百草枯和草甘膦之间。

10 从链霉菌分离的酶膦丝菌素 N-乙酰基转移酶（PAT）通过乙酰化催化 L-膦丝菌素转化为其无活性形式。表达 PAT 的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。

15 同时，随着转基因抗虫玉米大面积种植，少量存活下来的昆虫/害虫经过几代繁殖后，可能产生抗性。抗除草剂转基因玉米作为非抗虫转基因玉米，与转基因抗虫玉米以一定比例一并种植，可以延缓昆虫/害虫产生抗药性。

20 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式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
25 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玉米植物 DBN9858 的核酸序列及其检测方法，转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 的 DNA 分子。

为实现上述目的，本发明提供了一种核酸序列，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。

所述 SEQ ID NO:1 或其互补序列为转基因玉米事件 DBN9858 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玉米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玉米事件 DBN9858 的存在。所述 SEQ ID NO:2 或其互补序列为转

基因玉米事件 DBN9858 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 序列和玉米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玉米事件 DBN9858 的存在。

5 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' 侧翼玉米基因组 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或互补于包含完整的所述 SEQ ID NO:1 的所述 SEQ ID
10 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, 可以诊断转基因玉米事件 DBN9858 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
15 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
20 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玉米事件 DBN9858 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 1301 个核苷酸的序列, 所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列由 1067 个核苷酸的玉米侧翼基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1-1067)、89 个核苷酸的 DBN10006 构建体 DNA
25 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1068-1156) 和 145 个核苷酸的 pr35S 启动子序列的 5' 末端 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 1157-1301) 组成, 包含所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列即可鉴定为转基因玉米事件 DBN9858 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' 侧翼玉米基因组 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

5 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, 可以诊断转基因玉米事件 DBN9858 或其后代的存在。所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列为转基因玉米事件 DBN9858 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 1310 个核苷酸的序列, 所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列由 164 个核苷酸的

10 tNos 终止子序列 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 1-164)、84 个核苷酸的 DBN10006 构建体 DNA 序列 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 165-248) 和 1062 个核苷酸的玉米整合位点侧翼基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO:4 的 249-1310) 组成, 包含所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列即可鉴定为转基因玉米事件 DBN9858 的存在。

所述 SEQ ID NO:5 或其互补序列为表征转基因玉米事件 DBN9858 的长度

15 为 6890 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玉米事件 DBN9858 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	1067	1-1067
LB	89	1068-1156
pr35S	530	1157-1686
cPAT	552	1706-2257
t35S	195	2279-2473
prOsAct1	1411	2479-3889
spAtCTP2	228	3890-4117
cEPSPS	1368	4118-5485
tNos	253	5492-5744

RB	84	5745-5828
3'基因组	1062	5829-6890

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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 或其后代的存在。

- 5 为实现上述目的，本发明还提供了一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，包括：

使待检测样品与至少两种引物在核酸扩增反应中接触；

进行核酸扩增反应；

检测扩增产物的存在；

- 10 所述扩增产物包括 SEQ ID NO:3 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸、或者 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、或者 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。

- 15 更进一步地，所述扩增产物包括 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。

在上述技术方案中，所述引物包括至少一种所述核酸序列。

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。

- 20 为实现上述目的，本发明还提供了一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，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、或者 SEQ ID NO:4 或其互补序列中至少 11 个连续的核苷酸；

- 25 使所述待检测样品和所述探针在严格杂交条件下杂交；

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 $6 \times \text{SSC}$ (柠檬酸钠)、0.5%SDS (十二烷基硫酸钠)

溶液中，在 65℃ 下杂交，然后用 2 × SSC、0.1%SDS 和 1 × SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

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、或者 SEQ ID NO:2 或其互补序列中第 1-11 位或第 12-22 5 位连续核苷酸。

更进一步地，所述探针具有 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。

为实现上述目的，本发明还提供了一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，包括：

10 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、或者 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；

15 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、或者 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。

20 更进一步地，所述标记物核酸分子具有 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。

可选择地，至少一个所述探针用至少一种荧光基团标记。

25 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、或者 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玉米事件 DBN9858 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、或者 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 分子具有 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、或者 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,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 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 或 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具有耐受性的玉米植株的方法,包括向所述玉米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具有耐受性的玉米植株的方法包括:

将对草甘膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件 DBN9858 第一亲本玉米植株与缺少草甘膦耐受性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;

用草甘膦除草剂处理所述子代植株;

选择耐受草甘膦的所述子代植株。

为实现上述目的,本发明还提供了一种产生对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法,包括向所述玉米植株的基因组中引入编码草铵膦耐受性 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,所述产生对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法包括:

将对草铵膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件 DBN9858 第一亲本玉米植株与缺少草铵膦耐受性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;

用草铵膦除草剂处理所述子代植株;

选择耐受草甘膦的所述子代植株。

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草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法,包括向所述玉米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、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草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法包括:

将对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件 DBN9858 第一亲本玉米植株与缺少草甘膦和/或草铵膦耐受性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;

用草甘膦除草剂和草铵膦除草剂处理所述子代植株;

选择耐受草甘膦和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具有耐受性的玉米植物的方法,包括:

种植至少一粒玉米种子,所述玉米种子的基因组中包括编码草甘膦耐受性 EPSPS 的核酸序列和特定区域的核酸序列;

使所述玉米种子长成玉米植株;

用有效剂量草甘膦除草剂喷洒所述玉米植株,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。

为实现上述目的,本发明还提供了一种培养对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植物的方法,包括:

种植至少一粒玉米种子,所述玉米种子的基因组中包括编码草铵膦耐受性 PAT 蛋白的核酸序列和特定区域的核酸序列;

使所述玉米种子长成玉米植株;

用有效剂量草铵膦除草剂喷洒所述玉米植株,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。

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草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植物的方法,包括:

种植至少一粒玉米种子,所述玉米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、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;

使所述玉米种子长成玉米植株;

用有效剂量草甘膦除草剂和草铵膦除草剂喷洒所述玉米植株,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。

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玉米植物的大田中,所述转基因玉米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,所述转基因玉米植物具有对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

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玉米植物的大田中,所述转基因玉米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,所述转基因玉米植物具有对草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

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玉米植物的大田中，所述草甘膦耐受性的转基因玉米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玉米植物同时具有对草铵膦除草剂的耐

5 受性。

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，包括在种植抗虫玉米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玉米植物，所述草甘膦耐受性的转基因玉米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。

10

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玉米粉、玉米面、玉米油、玉米淀粉、玉米面筋、玉米饼、化妆品或填充剂。

15

在本发明用于检测抗除草剂玉米植物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“玉米”是指玉蜀黍 (*Zea mays*)，并且包括可以与玉米交配的所有植物品种，包括野生玉米种。

20

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。

25

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。“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”是现存在于生物体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”。

“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。

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。“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 DBN9858 的转基因玉米事件及其后代, 所述转基因玉米事件 DBN9858 即为玉米植物 DBN9858, 其包括转基因玉米事件 DBN9858 的植物和种子及其植物细胞或其可再生部分, 所述转基因玉米事件 DBN9858

的植物部分，包括但不限于细胞、花粉、胚珠、花、芽、根、茎、穗丝、花序、耳穗、叶和来自玉米植物 DBN9858 的产物，例如玉米粉、玉米面、玉米油、玉米浆、玉米穗丝、玉米淀粉和留在玉米作物田间的生物量。

本发明转基因玉米事件 DBN9858 包含了一个 DNA 构建体，当其在植物
5 细胞内表达时，所述转基因玉米事件 DBN9858 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
10 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、Tsfl 启动子、泛素蛋白 (Ubiquitin) 启动子、肌动蛋白 (Actin) 启动子、
15 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
20 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、
25 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。

5 所述 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶（EPSPS）基因可以是从小土壤农杆菌（*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。

10 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抗除草剂玉米植物 DBN9858 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玉米植物 DBN9858 的植物材料的生长或产量。

15 从链霉菌（*Streptomyces viridochromogenes*）分离的酶磷丝菌素 N-乙酰基转移酶（phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT）基因通过乙酰化催化 L-磷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。磷丝菌素 N-乙酰基转移酶（PAT）基因也可以作为选择性标记基因。

25 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玉米植物 DBN9858 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玉米植物 DBN9858 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。

5 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)。

10 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。

15 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
20 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”指包括异源 DNA 的原始转化体和该转化体的后代。
25 术语“事件”还指转化体和含有异源 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。

5 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。

10 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。

15 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。

20 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玉米事件 DBN9858，通过以下步骤：首先使第一亲本玉米植物与第二亲本玉米植物有性杂交，从而产生了多样的第一代子代植株，所述第一亲本玉米植物由培育自转基因玉米事件 DBN9858 及其后代的玉米植物组成，该转基因玉米事件 DBN9858 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，第二亲本玉米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玉米植物。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玉米植物或第三亲本玉米植物进行回交，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（如包含转基因玉米事件 DBN9858 中插入序列的 5' 端和 3' 端鉴定

25

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玉米植物。

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* 基因的玉米能杀死例如鳞翅目和鞘翅目的昆虫/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玉米 (关于庇护所玉米要求根据产品不同有 5%、10%、20% 等。并且可以是非抗虫转基因玉米 (如除草剂耐受性转基因玉米), 或抗非目标害虫的玉米, 并非一定是非转基因玉米)。当绝大部分的昆虫/害虫在相应的转基因抗虫玉米上被杀死后, 还有一部分昆虫/害虫在庇护所玉米上没有死, 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, 探针与来自转基因玉米事件 DBN9858 基因组的一条 DNA 链互补, 不论该基因组 DNA 是来自转基因玉米事件 DBN9858 或种子还是来源于转基因玉米事件 DBN9858 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。

5 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。

10 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玉米事件 DBN9858 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玉米基因组侧翼区域, 所述 DNA 分子的片段可以用作引物或探针。

15 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或扩增方法都可以用于鉴定样品中来源于转基因玉米事件 DBN9858 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分子的对应该核苷酸互补时, 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。

25

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×氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 处理, 然后在 50°C 条件下用 2.0×SSC 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 $2.0 \times \text{SSC}$ 、 50°C 到高度严格条件的约 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 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 $2.0 \times \text{SSC}$ 和约 65°C 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。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，为了确定玉米植物是否由含有本

发明转基因玉米事件 DBN9858 通过有性杂交方式产生，或采集自田地的玉米样品是否包含转基因玉米事件 DBN9858，或玉米提取物，例如粗粉、粉或油是否包含转基因玉米事件 DBN9858，从玉米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玉米事件
5 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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。
10

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，该距离的范围可以为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
15 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
20 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 序列和来自转基因玉米事件 DBN9858 的侧翼 DNA 序列可以通过利用所提供的引物序列对转基因玉米事件 DBN9858 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
25 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 的玉米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, 其扩增与转基因玉米事件 DBN9858 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。

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 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。

15 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。

20 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。

25 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。

5 基于杂交原理，用于检测来源于除草剂耐受性转基因玉米事件 DBN9858 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。

10 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。

15 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/侧翼序列的存在，其说明扩增和杂交是成功的。

20 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。

25 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 检测试剂盒。所述试剂盒有利于鉴定样品中是否存在转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA，还可以用于培育含有转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 的玉米植物。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，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。在玉米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玉米基因组结合部位的 DNA 结构包含：位于转基因插入序列 5' 末端的玉米植物 DBN9858 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磷丝菌素 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，第二个表达盒由由水稻肌动蛋白 1 启动子 (prOsAct1)，可操作地连接到拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽的编码序列 (spAtCTP2) 上，可操作地连接到土壤杆菌属 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，可操作地连接到胭脂碱合酶的转录终止子 (tNos) 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' 末端的玉米植物 DBN9858 侧翼基因组区域 (SEQ ID NO:5)。在 DNA 扩增方法中，作为引物的 DNA 分子可以是来源于玉米植物 DBN9858 中转基因插入序列的任何部分，也可以是来源于转基因玉米事件 DBN9858 中侧翼玉米基因组的 DNA 区域的任何部分。

转基因玉米事件 DBN9858 可以与其他转基因玉米品种组合，例如除草剂耐受性 (如 2,4-D、麦草畏等) 的玉米，或携带其他抗虫基因 (如 *Cry1Ab*、*Vip3A* 等) 的转基因玉米品种。所有这些不同转基因事件的各种组合，与本发明的转基因玉米事件 DBN9858 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玉米品种。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。

本发明提供了一种用于检测除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 的核酸序列及其检测方法，转基因玉米事件 DBN9858 耐受含草甘膦和/或草铵膦的农业除草剂的植物毒性作用。该双重性状的玉米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磷丝菌素 N-乙酰基转移酶 (PAT) 蛋白，其赋予植物对草铵膦的耐受性。双重性状玉米具有如下优点：1) 施加含草甘膦的农业除草剂给玉米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玉米作为非抗虫转基因玉米，与转基因抗虫玉米以一定比例一并种植，可以延缓昆虫/害虫产生抗性；4) 玉米产量没有降低。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 区段上，并且存在于转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 的植物材料的存在。

序列简述

- SEQ ID NO:1 转基因玉米事件 DBN9858 中 5' 转基因片段的插入位点和玉米基因组 DNA 的每一侧的 11 个核苷酸；
- SEQ ID NO:2 转基因玉米事件 DBN9858 中 3' 转基因片段的插入位点和玉米基因组 DNA 的每一侧的 11 个核苷酸；
- SEQ ID NO:3 转基因玉米事件 DBN9858 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 1301 个核苷酸的序列；
- SEQ ID NO:4 转基因玉米事件 DBN9858 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 1310 个核苷酸的序列；
- SEQ ID NO:5 整个 T-DNA 序列、5' 和 3' 的侧翼玉米基因组序列；
- SEQ ID NO:6 位于 SEQ ID NO:3 内部的序列，跨越了 DBN10006 构建体 DNA 序列和 pr35S 启动子序列；
- SEQ ID NO:7 位于 SEQ ID NO:4 内部的序列，跨越了 tNos 终止子序列和 DBN10006 构建体 DNA 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；
- 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;
- 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;
- 5 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;
- SEQ ID NO:19 Taqman 检测 *PAT* 的引物 3;
- SEQ ID NO:20 Taqman 检测 *PAT* 的引物 4;
- 10 SEQ ID NO:21 Taqman 检测 *PAT* 的探针 2;
- SEQ ID NO:22 玉米内源基因 *Ubiquitin* 泛素蛋白的第一引物;
- SEQ ID NO:23 玉米内源基因 *Ubiquitin* 泛素蛋白的第二引物;
- SEQ ID NO:24 Southern 印迹杂交检测中 *PAT* 的探针;
- SEQ ID NO:25 Southern 印迹杂交检测中 *EPSPS* 的探针;
- 15 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;
- 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;
- 20 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。
- 25 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。

附图说明

图 1 为本发明用于检测除草剂耐受性玉米植物 DBN9858 的核酸序列及其检测方法的转基因插入序列与玉米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玉米植物 DBN9858 的核酸序列及其检测方法的重组表达载体 DBN10006 的结构示意图。

具体实施方式

5 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玉米植物 DBN9858 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

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 DBN10006 (如图 2 所示)。所述载体 DBN10006 包含两个串联的转基因表达盒,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;第二个表达盒由水稻肌动蛋白 1 启动子 (prOsAct1),可操作地连接到拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽的编码序列 (spAtCTP2) 上,可操作地连接到土壤杆菌属 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,可操作地连接到胭脂碱合酶 15 的转录终止子 (tNos) 上而组成。

将所述载体 DBN10006 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) 为选择标记对转化细胞进行筛选。

1.2、植物转化

采用常规的农杆菌侵染法进行转化,将无菌培养的玉米幼胚与本实施例 1.1 中所述的农杆菌共培养,以将构建的重组表达载体 DBN10006 中的 T-DNA 转入到玉米染色体组中,以产生转基因玉米事件 DBN9858。

25 对于农杆菌介导的玉米转化,简要地,从玉米中分离未成熟的幼胚,用农杆菌悬浮液接触幼胚,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幼胚之一的至少一个细胞 (步骤 1: 侵染步骤),在此步骤中,幼胚优选地浸入农杆菌悬浮液 ($OD_{660}=0.4-0.6$, 侵染培养基 (MS 盐 4.3 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 68.5 g/L、葡萄糖 36 g/L、乙酰

丁香酮 (AS) 40 mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1 mg/L, pH 5.3)) 中以启动接种。幼胚与农杆菌共培养一段时期 (3 天) (步骤 2: 共培养步骤)。优选地, 幼胚在侵染步骤后在固体培养基 (MS 盐 4.3 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、乙酰丁香酮 (AS) 100 mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1 mg/L、琼脂 8 g/L, pH 5.8) 上培养。在此共培养阶段后, 可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中, 恢复培养基 (MS 盐 4.3 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1 mg/L、植物凝胶 3 g/L, pH 5.8) 中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素 (头孢霉素), 不添加植物转化体的选择剂 (步骤 3: 恢复步骤)。优选地, 幼胚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, 接种的幼胚在含选择剂 (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, 幼胚在有选择剂的筛选固体培养基 (MS 盐 4.3 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、N-(膦羧甲基) 甘氨酸 0.25 mol/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1 mg/L、植物凝胶 3 g/L, pH 5.8) 上培养, 导致转化的细胞选择性生长。然后, 愈伤组织再生成植物 (步骤 5: 再生步骤), 优选地, 在含选择剂的培养基上生长的愈伤组织在固体培养基 (MS 分化培养基和 MS 生根培养基) 上培养以再生植物。

筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述 MS 分化培养基 (MS 盐 4.3 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、6-苜基腺嘌呤 2 mg/L、N-(膦羧甲基) 甘氨酸 0.125 mol/L、植物凝胶 3 g/L, pH 5.8) 上, 25°C 下培养分化。分化出来的小苗转移到所述 MS 生根培养基 (MS 盐 2.15 g/L、MS 维他命、干酪素 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、吲哚-3-乙酸 1 mg/L、琼脂 8 g/L, pH 5.8) 上, 25°C 下培养至约 10 cm 高, 移至温室培养至结实。在温室中, 每天于 28°C 下培养 16 小时, 再于 20°C 下培养 8 小时。

25 1.3. 转基因事件的鉴定和筛选

一共产生了 332 个独立转基因 T₀ 植株。

通过 TaqManTM 分析 (参见第二实施例) 检测再生的转基因玉米植株是否存在 *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 DBN9858 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(参见第五实施例)。

第二实施例、用 TaqMan 进行转基因玉米事件 DBN9858 检测

取转基因玉米事件 DBN9858 的叶片约 100 mg 作为样品,用 Qiagen 的 DNeasy Plant Maxi Kit 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。同时以野生型玉米植株作为对照,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、取转基因玉米事件 DBN9858 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;

15 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 l;

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,以野生型玉米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:

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

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

25 探针 1: ATGCAGGCGATGGGCGCCCGCATCCGTA 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: TTCACTGTAGACGTCTCAATGTAATGG 如序列表中 SEQ ID

NO:20 所示;

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

PCR 反应体系为:

5	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 μL
	50×引物/探针混合物	1 μL
	基因组 DNA	3 μL
	水 (dd H ₂ O)	6 μL

所述 50×引物/探针混合物包含 1 mM 浓度的每种引物各 45 μL, 100 μM 浓度的探针 50 μL 和 860 μL 1×TE 缓冲液, 并且在 4°C, 贮藏在琥珀试管中。

PCR 反应条件为:

	步骤	温度	时间
	21	95°C	5 分钟
	22	95°C	30 秒
15	23	60°C	1 分钟
	24	回到步骤 22, 重复 40 次	

利用 SDS2.3 软件 (Applied Biosystems) 分析数据, 获得单拷贝的转基因玉米事件 DBN9858。

第三实施例、转基因玉米事件 DBN9858 检测

20 3.1、基因组 DNA 提取

DNA 提取按照常规采用的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法: 取 2 克幼嫩的转基因玉米事件 DBN9858 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 Buffer (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

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
5 ng/ μ L 之间。用选择出的限制性内切酶 *Bam*HI、*Xma*I、*Kpn*I、*Sac*II (5' 端
分析) 和 *Spe*I、*Pst*I、*Eco*57I (3' 端分析) 分别酶切基因组 DNA。每个酶
切体系中加入 26.5 μ L 基因组 DNA、0.5 μ L 上述选择出的限制性内切酶、以及
3 μ L 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 μ L 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
10 8.5 μ L 双蒸水 (dd H₂O)、1 μ L 10X T₄ Buffer 以及 0.5 μ L T₄ 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
15 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
QIAquick Gel 提取试剂盒 (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,
20 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
25 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玉米事件 DBN9858 的玉米

植物或种子的鉴定。

发现在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 1 - 1067 位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件 DBN9858 插入序列的右边界侧翼 (5' 侧翼序列), 在 SEQ ID NO:5 的核苷酸 5829 - 6890 位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 中转基因片段的插入位点和玉米基因组 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 也是转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 DNA 的存在。所述 SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO:3 的核苷酸第 1068 - 1301 位) 跨越了 DBN10006 构建体 DNA 序列和 pr35S 启动子序列, 所述 SEQ ID NO:7 (SEQ ID NO:4 的核苷酸第 1 - 248 位) 跨越了 tNos 终止子序列和 DBN10006 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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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 tNos 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

基因玉米事件 DBN9858 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 pr35S 启动子序列的引物 7 (SEQ IDNO: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玉米事件 DBN9858 的诊断性扩增子。扩增子的检测可以通过使用如表 3 所示的 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、用于转基因玉米事件 DBN9858 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, 1.5mM MgCl ₂ 终浓度
3	dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的 10 mM 溶液	0.4 μ L	每种 dNTP 200 μ M 终浓度
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 (500µg/ml)	0.1 µL	50 ng/反 应
7	<i>REDTaq</i> 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
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 玉米基因组 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 DBN9858 的玉米基 因组 DNA	

表 3、Perkin-Elmer9700 热循环仪条件

循环数	设置
1	94°C 3 分钟
34	94°C 30 秒
	64°C 30 秒
	72°C 1 分钟
1	72°C 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)、MJ 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。MJ 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)，当其用在转基因玉米事件 DBN9858 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 1301 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化玉米基因组 DNA 和非 DBN9858 玉米基因组 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)，当其用在转基因玉米事件 DBN9858 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 1310 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化玉米基因组 DNA 和非 DBN9858 玉米基因组 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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 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 μL	
2	2 \times Universal Master Mix (Applied Biosystems 目录号 4304437)	5 μL	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 (重悬浮于无核酸酶水中到 10 μM 的浓度)	0.3 μL	0.1 μM 终浓度
4	<i>REDTaq</i> 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 非转基因玉米基因组 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 DBN9858 的玉米基因组 DNA	

表 5、接合性测定 Perkin-Elmer9700 热循环仪条件

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

使用以上循环参数 (表 5) 在 Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA)、MJ 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。MJ 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玉米事件 DBN9858 的存在情况的 DNA。或者反应将由含有来源于玉米基因组的 DNA 的生物样品产生两个不同的 DNA 扩增子, 所述来源于玉米基因组的 DNA 相对于转基因玉米事件 DBN9858 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玉米基因组基因座的第一扩增子和诊断转基因玉米事件 DBN9858DNA 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玉米 DNA 样品，可诊断确定该样品中转基因玉米事件 DBN9858 的存在，且该样品由相对于转基因玉米植物 DBN9858 中存在的插入 DNA 对应的等位基因为纯合的玉米种子所产生。

- 5 需要说明的是，转基因玉米事件 DBN9858 的引物对被用于产生对转基因玉米事件 DBN9858 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，用于扩增玉米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。
- 10 对转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 抽提样品分析应该包括一个转基因玉米事件 DBN9858 的阳性组织 DNA 抽提物对照，一个来源于非转基因玉米事件 DBN9858 的阴性 DNA 抽提物对照和一个不含有模板玉米 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
- 15 源于转基因事件玉米植物 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 的诊断性扩增子。当在 DNA 扩增方法中测试时产生对转基因玉米事件 DBN9858 为诊断性的扩增子的、推定含有包含转基因玉米事件 DBN9858 的玉米植物或种子 DNA 的提取物，或来源
- 20 于转基因玉米事件 DBN9858 的产物，可以被用作扩增的模板，来确定是否存在转基因玉米事件 DBN9858。

第四实施例、通过 Southern 印迹杂交进行转基因玉米事件 DBN9858 检测

4.1、用于 Southern 印迹杂交的 DNA 提取

- 25 利用 T4、T5 代纯合的转化事件进行 Southern 印迹分析。利用研钵和研杵，在液氮中研磨大约 5 到 10 g 植物组织。在 12.5 mL 提取缓冲液 A (0.2 M Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.1% v/v β -巯基乙醇, 2.5% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮) 中重悬浮植物组织，以 4000 rpm 离心 10 分钟 (2755 g)。弃掉上清液后，在 2.5 mL 提取缓冲液 B (0.2 M Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% v/v β -巯基乙醇, 2.5% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮, 3% 肌氨酰, 20% 乙醇) 中重

悬浮沉淀，并且在 37°C 温育 30 分钟。在温育期间，用无菌环混合样品一次。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 4000 rpm 离心 20 分钟。收集含水层，并且在添加 0.54 体积异丙醇后以 4000 rpm 离心 5 分钟以沉淀 DNA。弃掉上清液，并且在 500 μ L TE 中重悬浮 DNA 沉淀。为了降解任何存在的 RNA，在 37°C，将 DNA 和 1 μ L 30 mg/ml RNAase A 温育 30 分钟，以 4000 rpm 离心 5 分钟，并且在 0.5 体积 7.5 M 醋酸铵和 0.54 体积异丙醇存在的情况下，通过以 14000 rpm 离心 10 分钟沉淀 DNA。弃掉上清液后，用 500 μ L 质量分数为 70% 的乙醇洗沉淀，并且使其干燥后在 100 μ L TE 缓冲液中重悬浮。

10 4.2、限制酶消化

利用分光光度计或荧光计定量检测 DNA 浓度（利用 1 \times TNE 和 Hoechst 染料）。

在 100 μ L 反应体系中，每次消化 5 μ g DNA。用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 分别消化基因组 DNA，以 T-DNA 上 *EPSPS* 和 *PAT* 的部分序列作为探针。

15 对于每种酶，在适当的温度下温育过夜消化物。利用真空离心蒸发浓缩器（speed vacuum）旋转样品以减少体积至 30 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 TBE 电泳缓冲液中电泳分离，在 20 伏特下电泳凝胶过夜。

25 在 0.25 M HCl 中洗凝胶 15 分钟以使 DNA 脱嘌呤，然后用水洗。设定 Southern 印迹杂交如下：在盘中放置 20 张厚的干燥印迹纸，其上再放置 4 张薄的干燥印迹纸。在 0.4 M NaOH 中预先湿润 1 张薄印迹纸，并且放置在该纸堆上，接着放置 1 张在 0.4 M NaOH 中预先湿润的 Hybond-N+ 转移膜（Amersham Pharmacia Biotech, #RPN303B）。凝胶置放在上部，确保在凝胶和膜之间没有气泡。3 张另外预先浸泡的印迹纸被放置在凝胶上部，并且用 0.4 M NaOH 填满缓冲液盘。用预先浸泡在 0.4 M NaOH 中的灯芯连接凝胶堆层和缓冲液盘，将 DNA 转移到膜上。在室温下进行大约 4 小时的 DNA 转移。转移后，在 2 \times SSC 中漂洗 Hybond 膜 10 秒，DNA 通过 UV 交联与膜结合。

4.4、杂交

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。将 25 ng 探针 DNA 在 45 μ L TE 中煮沸 5 分钟, 在冰上放置 7 分钟, 然后转移到 Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633) 试管中。向 Rediprime 试管添加 5 μ L 32 P 标记的 dCTP 后, 在 37 $^{\circ}$ C 温育探针 15 分钟。根据制造商的说明书, 通过微离心 G-50 柱子 (Amersham Pharmacia Biotech, #27-5330-01) 离心, 以移除未掺入的 dNTPs, 纯化该探针。利用闪烁计数器测量探针活性。

通过在 65 $^{\circ}$ C 用 20 mL 预加温的 Church 预杂交液 (500 mM Na_3PO_4 , 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA) 湿润该 Hybond 膜 30 分钟, 预杂交该 Hybond 膜。煮沸标记的探针 5 分钟, 并且在冰上放置 10 分钟。向预杂交缓冲液添加适量探针 (每 1 mL 预杂交缓冲液 1 百万次计数), 在 65 $^{\circ}$ C 过夜进行杂交。第二天, 弃掉杂交缓冲液, 用 20 mL Church 冲洗溶液 1 (40 mM Na_3PO_4 , 1 mM EDTA, 5% SDS, 0.5% BSA) 漂洗后, 在 65 $^{\circ}$ C 下, 在 150 mL Church 冲洗溶液 1 中洗膜 20 分钟。用 Church 冲洗溶液 2 (40 mM Na_3PO_4 , 1 mM EDTA, 1% SDS) 重复该过程 2 次。将该膜暴露于磷屏或 X 光片以检测探针结合的位置。

每个 Southern 上包括三种对照样品: (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玉米序列; (2) 来自阴性分离子的 DNA, 其中引入了 *Hind* III-消化的 DBN10006, 其量基于探针长度等价于一个拷贝数, 以说明在检测玉米基因组内的单个基因拷贝时, 该实验的灵敏度; 和 (3) 基于探针长度等价于一个拷贝数的 *Hind* III-消化的 DBN10006 质粒, 其作为杂交的阳性对照并用于说明实验的灵敏度。

杂交数据提供了确证的证据支持 TaqManTM PCR 分析, 即玉米植物 DBN9858 含有 *EPSPS* 和 *PAT* 基因的单拷贝。利用该 *EPSPS* 探针, *Sac* I 和 *Hind* III 酶解分别产生大小约 4 kb 和 11 kb 的单一条带; 利用该 *PAT* 探针, *Sac* I 和 *Hind* III 酶解分别产生大小约 3.5 kb 和 1.8 kb 的单一条带。这表明 *EPSPS* 和 *PAT* 各一个拷贝存在于玉米转化事件 DBN9858 中。

第五实施例、事件的除草剂耐受性检测

本试验选用农达除草剂 (41% 草甘膦异丙铵盐水剂) 和保试达除草剂 (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 15 m² (5 m × 3 m), 行距 60 cm, 株距 25 cm, 常规栽培管理, 小区之间有 1 m 的宽隔离带。将转基因玉米事件 DBN9858 分别进行如下 3 种处理: 1) 不喷施; 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 V8 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 (Basta) 除草剂, 然后在 V8 期按相同剂量再次喷洒保试达 (Basta) 除草剂。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。

10 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玉米产量。药害症状分级如表 6 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 (%) = Σ (同级受害株数 × 级别数) / (总株数 × 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。每个小区的玉米产量是称量各小区中间 3 行的玉米粒总产量 (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。转基因玉米事件 DBN9858 对除草剂耐受性的结果和玉米产量结果如表 7 所示。

表 6、除草剂对玉米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

20 表 7、转基因玉米事件 DBN9858 对除草剂耐受性的结果和玉米产量结果

项目/植株	DBN9858
除草剂受害率 (%) (不喷施)	0

-40-

草甘膦受害率 (%)	0
草铵膦受害率 (%)	0
产量百分率 (%) (草甘膦)	100.1
产量百分率 (%) (草铵膦)	101

结果说明，在除草剂（草甘膦和草铵膦）受害率方面：1）转基因玉米事件 DBN9858 在草甘膦除草剂（1680 g a.e. /ha）处理下受害率基本为 0；转基因玉米事件 DBN9858 在草铵膦除草剂（800 g a.i. /ha）处理下受害率也基本为 0；由此，转基因玉米事件 DBN9858 具有良好的除草剂（草甘膦和草铵膦）耐

5 受性。
在产量方面：转基因玉米事件 DBN9858 在不喷施、草甘膦除草剂（1680 g a.e. /ha）和草铵膦除草剂（800 g a.i. /ha）3 种处理下产量没有明显差异；在喷施除草剂后，转基因玉米事件 DBN9858 的产量反而略有增加，由此，进一步表明转基因玉米事件 DBN9858 具有良好的除草剂（草甘膦和草铵膦）耐受性。

10 第六实施例

可由转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 材料在所述农产品或商品中存在的核苷酸序列。所述农产品或商品包括但不限于玉米油、玉米粗粉、玉米面、玉米面筋、玉米饼、玉米淀粉、以及将要作为食物源供动物消费的任何其他食品、或者另外作为膨大剂

15 或化妆组合物中的成分用于化妆用途等。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 所示的转基因玉米事件 DBN9858 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

20 中所所示的序列，以诊断转基因玉米事件 DBN9858 的存在。

综上所述，本发明转基因玉米事件 DBN9858 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玉米事件 DBN9858 的 DNA 分子。

对应于转基因玉米事件 DBN9858 的种子已于 2014 年 12 月 24 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

25

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:玉米(*Zea mays*),保藏编号为CGMCC No.10212,并于2016年2月17日转换成根据布达佩斯条约的国际保藏。保藏物将在保藏处保藏30年。

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,5 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

- 1、具有以下核酸序列的核酸分子，其中，所述核酸序列包含 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
5 至少 11 个连续的核苷酸。
- 2、根据权利要求 1 所述核酸序列，其中，所述核酸序列包含 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 所述的核酸序列，其中，所述核酸序列包含 SEQ ID NO:3 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列。
- 10 4、根据权利要求 3 所述的核酸序列，其中，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玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，其包括：
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
15 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；
其中，所述目标扩增产物包含 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。
- 20 6、根据权利要求 5 所述检测样品中转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，其中，所述目标扩增产物包含 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玉米事件 DBN9858 的 DNA
25 存在的方法，其中，所述目标扩增产物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。
- 8、根据权利要求 5-7 任一项所述检测样品中转基因玉米事件 DBN9858 的 DNA 存在的方法，其中，至少一种所述引物包含权利要求 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玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其中，所述引物包含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。

5 10、一种检测样品中转基因玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其包括：

使待检测样品与探针接触，所述探针包含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；

10 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玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其中，所述探针包含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
15 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玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其中，所述探针包含或具有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。

20 13、根据权利要求10-12任一项所述检测样品中转基因玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其中所述探针是标记物核酸分子，并且使用标记物辅助育种分析来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否是连锁的。

25 14、根据权利要求10-13任一项所述检测样品中转基因玉米事件DBN9858的DNA存在的方法，其中，至少一个所述探针用至少一种荧光基团标记。

15、一种DNA检测试剂盒，其包含至少一个DNA分子，所述DNA分子包含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玉米事件DBN9858或其后代具有特异性的DNA引物或探针。

16、根据权利要求 15 所述 DNA 检测试剂盒，其中，所述 DNA 分子包含 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。

17、根据权利要求 15 或 16 所述 DNA 检测试剂盒，其中，所述 DNA 分子包含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。

18、一种植物细胞或部分，其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含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。

19、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玉米植株的方法，其包括：

向所述玉米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玉米植株的基因组中引入 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列。

20、根据权利要求 19 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玉米植株的方法，其包括：

将对草甘膦除草剂和草铵膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件 DBN9858 第一亲本玉米植株与缺少草甘膦和/或草铵膦耐受性的第二亲本玉米植株有性杂交，从而产生大量子代植株；

用草甘膦除草剂处理所述子代植株；和
选择耐受草甘膦的所述子代植株。

21、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玉米植物的方法，其包括：

种植至少一粒玉米种子，所述玉米种子的基因组中包含：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；

使所述玉米种子长成玉米植株；

5 用有效剂量草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂喷洒所述玉米植株，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: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：

10 种植至少一粒玉米种子，所述玉米种子的基因组中包含 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列；

使所述玉米种子长成玉米植株；

用有效剂量草甘膦除草剂喷洒所述玉米植株，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。

15 22、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玉米植物的大田中，所述转基因玉米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，所述转基因玉米植物具有对
20 草甘膦除草剂和/或草铵膦除草剂的耐受性。

23、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玉米植物的大田中，所述草甘膦耐受性的转基因玉米植物在其基因组中包含选自
25 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玉米植物同时具有对草铵膦除草剂的耐受性。

24、一种延缓昆虫抗性的方法，其包括在种植抗虫玉米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玉米植物，所述具有草甘膦和/或草铵膦耐受性的转基因玉米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。

- 25、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，其中，所述农产品或商品为玉米粉、玉米面、玉米油、玉米淀粉、玉米面筋、
5 玉米饼、化妆品或填充剂。

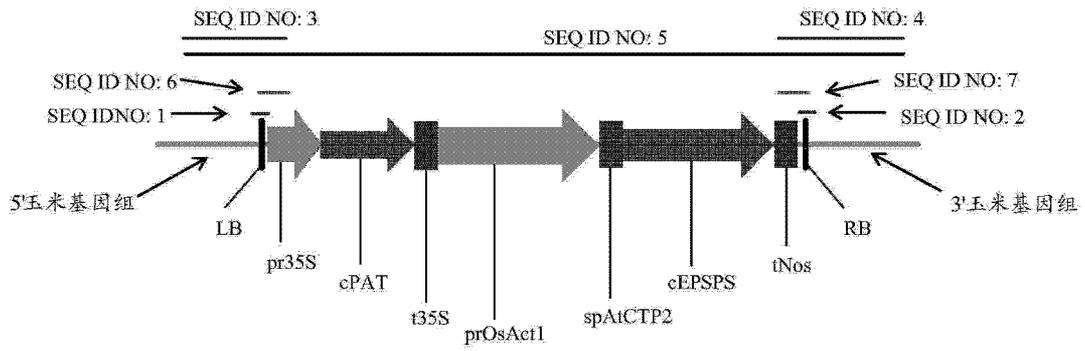


图 1

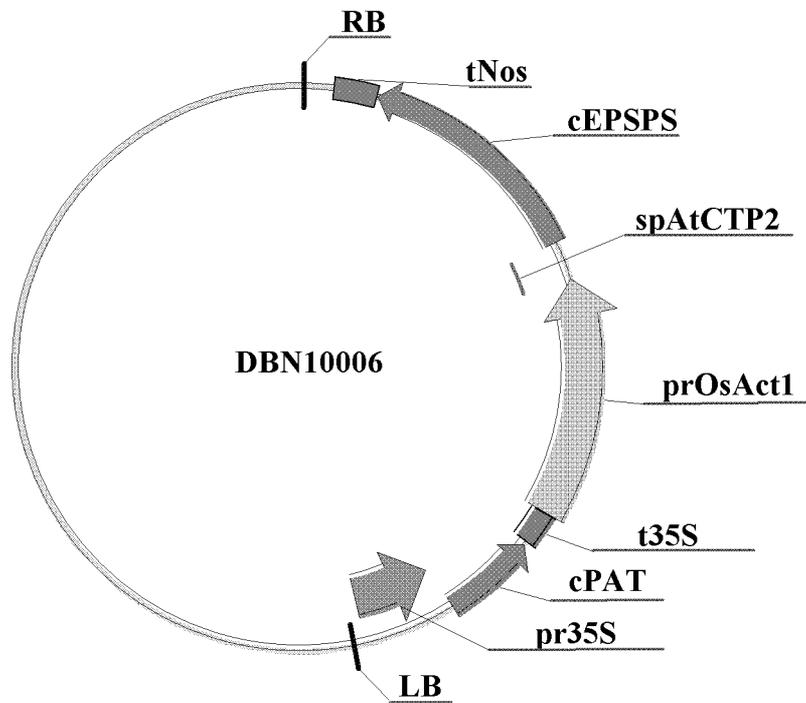


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/080542

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 47/44 (2006.01) i; A01P 7/04 (2006.01) i; A01G 7/06 (2006.01) i; C12N 15/82 (2006.01) i; C12N 15/32 (2006.01) i; C12N 15/54 (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; A01G

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)

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

Search Terms: CORN, MAIZE, TRANSGEN+, DETECT+, DBN9858

GenBank, EMBL, DDBJ: a sequence search carried out on SEQ ID NOs: 1, 3 and 5 and the 1st-11th or 12th-22nd consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104878095 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.; DBN BIOTECH CENTER, BEIJING DBN TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.), 02 September 2015 (02.09.2015), see the whole document	1-25 (parts)
X	"GENBANK login no.: XM_008681044", GENBANK DATABASE, 02 August 2014 (02.08.2014), see sequences and related information	1 (part)
Y	"GENBANK login no.: XM_008681044", GENBANK DATABASE, 02 August 2014 (02.08.2014), see sequences and related information	15 (part)
Y	CN 101495635 A (MONSANTO TECHNOLOGY, LLC), 29 July 2009 (29.07.2009), see claim 14	15-16 (parts)
Y	CN 1295621 A (ZENECA MOGEN B.V.), 16 May 2001 (16.05.2001) see SEQ ID NO: 15	16 (part)

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 22 July 2016 (22.07.2016)	Date of mailing of the international search report 10 August 2016 (10.08.2016)
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 WU, Tingchen Telephone No.: (86-10) 62089319

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/080542

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 1333834 A (JAPAN TOBACCO INC.), 30 January 2002 (30.01.2002) see SEQ ID NO: 1	16 (part)
A	CN 101495635 A (MONSANTO TECHNOLOGY, LLC), 29 July 2009 (29.07.2009), see claims 1-66	1-14, 17-25 (parts)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/080542

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.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/CN2016/080542

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 1-25 (parts) relate to SEQ ID NO: 1 and the part of SEQ ID NO: 3 or 5 which comprises SEQ ID NO: 1;

[2] group 2: claims 1, 3-5, 7-15 and 17-24 (parts) relate to SEQ ID NO: 6 and the part of SEQ ID NO: 3 or 5 which comprises SEQ ID NO: 6;

[3] group 3: claims 1-25 (parts) relate to SEQ ID NO: 2 and the part of SEQ ID NO: 4 or 5 which comprises SEQ ID NO: 2; and

[4] group 4: claims 1, 3-5, 7-15 and 17-24 (parts) relate to SEQ ID NO: 7 and the part of SEQ ID NO: 4 or 5 which comprises SEQ ID NO: 7.

[5] The above-mentioned 4 sets of inventions do not have the same structure, do not share the same or corresponding common technical feature, and accordingly the 4 sets of inventions do not contain same or corresponding specific technical features, do not fall within a single general inventive concept, lack unity of invention, and do not comply with the requirements 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.:

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/080542

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104878095 A	02 September 2015	None	
CN 101495635 A	29 July 2009	UA 98770 C2	25 June 2012
		ZA 200810027 A	28 October 2009
		BR PI0712921 A2	02 October 2012
		PE 04562008 A1	13 June 2008
		CA 2653338 A1	06 December 2007
		EA 200870576 A1	28 April 2009
		AU 2007267586 A1	06 December 2007
		PT 2021476 E	10 September 2014
		IL 195451 A	28 May 2014
		SI 2021476 T1	30 October 2014
		AU 2007267586 A2	08 January 2009
		IL 195451 D0	01 August 2011
		US 2014189911 A1	03 July 2014
		EP 2021476 B1	09 July 2014
		JP 5529322 B2	25 June 2014
		RS 53560 B1	27 February 2015
		HR P20140951 T1	21 November 2014
		MY 150655 A	14 February 2014
		TW 200817679 A	16 April 2008
		ES 2498976 T3	26 September 2014
		D0 P2007000106 A	15 December 2008
		US 2011321185 A1	29 December 2011
		TW 1453412 B	21 September 2014
		AP 200804692 D0	31 December 2008
		EP 2021476 A4	28 October 2009
		JP 2013150632 A	08 August 2013
		NZ 573179 A	30 September 2011
		US 8581047 B2	12 November 2013
		UY 30370 A1	02 January 2008
		JP 5513883 B2	04 June 2014
		WO 2007140256 A1	06 December 2007
		MX 2008015108 A	04 February 2009
		CR 10461 A	12 January 2009
		SG 171612 A1	29 June 2011
		US 2008260932 A1	23 October 2008
		EP 2021476 A1	11 February 2009
		KR 20090033840 A	06 April 2009
		AR 061131 A1	06 August 2008
		AU 2007267586 B2	05 April 2012
		KR 20130042052 A	25 April 2013
		US 8062840 B2	22 November 2011
		EG 26119 A	05 March 2013
		JP 2009538153 A	05 November 2009
		KR 101366363 B1	21 February 2014
CN 1295621 A	16 May 2001	JP 2002509728 A	02 April 2002
		WO 9950428 A2	07 October 1999
		EP 1062356 A2	27 December 2000
		WO 9950428 A3	23 December 1999
		CO 4820447 A1	28 July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/080542

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1333834 A	30 January 2002	ZA 200005113 A	02 January 2002
		PE 03572000 A1	02 May 2000
		MA 24792 A1	01 October 1999
		PL 343636 A1	27 August 2001
		AR 015255 A1	18 April 2001
		CA 2324969 A1	07 October 1999
		AU 3419099 A	18 October 1999
		BR 9909360 A	12 December 2000
		US 6465636 B1	15 October 2002
		EP 1136560 A4	27 October 2004
		WO 0125459 A1	12 April 2001
		AT 414779 T	15 December 2008
		EP 1136560 A1	26 September 2001
		KR 20020013479 A	20 February 2002
		KR 100785946 B1	14 December 2007
		CN 1249246 C	05 April 2006
		CA 2353077 A1	12 April 2001
		AU 6000199 A	10 May 2001
		JP 4394323 B2	06 January 2010
		CA 2353077 C	20 March 2012
EP 1136560 B1	19 November 2008		
DE 69939944 D1	02 January 2009		
ES 2317712 T3	16 April 2009		
AU 783763 B2	01 December 2005		
US 7087812 B1	08 August 2006		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/080542

<p>A. 主题的分类</p> <p>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 47/44(2006.01)i; A01P 7/04(2006.01)i; A01G 7/06(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/32(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12Q; A01H; A01N; A01P; A01G</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED 检索词: 玉米, 转基因, 检测, CORN, MAIZE, TRANSGEN+, DETECT+, DBN9858 GenBank, EMBL, DDBJ; 对SEQ ID NOs:1, 3, 5以及包含SEQ ID NO: 1中第1-11位或第12-22位连续核苷酸的序列检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 104878095 A (北京大北农科技集团股份有限公司, 北京大北农科技集团股份有限公司生物技术中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文</td> <td>1-25 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息</td> <td>1 (部分)</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息</td> <td>15 (部分)</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101495635 A (孟山都技术有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见权利要求14</td> <td>15-16 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1295621 A (杰尼克莫根有限公司) 2001年 5月 16日 (2001 - 05 - 16) 参见SEQ ID NO:15</td> <td>16 (部分)</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 104878095 A (北京大北农科技集团股份有限公司, 北京大北农科技集团股份有限公司生物技术中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文	1-25 (均为部分)	X	"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息	1 (部分)	Y	"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息	15 (部分)	Y	CN 101495635 A (孟山都技术有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见权利要求14	15-16 (均为部分)	Y	CN 1295621 A (杰尼克莫根有限公司) 2001年 5月 16日 (2001 - 05 - 16) 参见SEQ ID NO:15	16 (部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 104878095 A (北京大北农科技集团股份有限公司, 北京大北农科技集团股份有限公司生物技术中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文	1-25 (均为部分)																		
X	"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息	1 (部分)																		
Y	"GENBANK 登录号: XM_008681044" GENBANK DATABASE, 2014年 8月 2日 (2014 - 08 - 02), 参见序列及相关信息	15 (部分)																		
Y	CN 101495635 A (孟山都技术有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见权利要求14	15-16 (均为部分)																		
Y	CN 1295621 A (杰尼克莫根有限公司) 2001年 5月 16日 (2001 - 05 - 16) 参见SEQ ID NO:15	16 (部分)																		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2016年 7月 22日	2016年 8月 10日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																			
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	吴汀晨																			
传真号 (86-10)62019451	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 1333834 A (日本烟草产业株式会社) 2002年 1月 30日 (2002 - 01 - 30) 参见SEQ ID NO:1	16 (部分)
A	CN 101495635 A (孟山都技术有限公司) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见权利要求1-66	1-14, 17-25 (均为部分)

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1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1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1-25 (均为部分), 涉及SEQ ID NO: 1及包含SEQ ID NO: 1的SEQ ID NO: 3或5的部分;

[2] 组2: 权利要求1, 3-5, 7-15, 17-24 (均为部分), 涉及SEQ ID NO: 6及包含SEQ ID NO: 6的SEQ ID NO: 3或5的部分;

[3] 组3: 权利要求1-25 (均为部分), 涉及SEQ ID NO: 2及包含SEQ ID NO: 2的SEQ ID NO: 4或5的部分;

[4] 组4: 权利要求1, 3-5, 7-15, 17-24 (均为部分), 涉及SEQ ID NO:7及包含SEQ ID NO: 7的SEQ ID NO: 4或5的部分。

[5] 上述4组发明之间没有相同的结构, 不具备相同或相应的共同技术特征, 因而这4组发明之间没有相同或相应的特定特征技术, 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1-25(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/CN2016/080542

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	104878095	A	2015年 9月 2日	无			
CN	101495635	A	2009年 7月 29日	UA	98770	C2	2012年 6月 25日
				ZA	200810027	A	2009年 10月 28日
				BR	PI0712921	A2	2012年 10月 2日
				PE	04562008	A1	2008年 6月 13日
				CA	2653338	A1	2007年 12月 6日
				EA	200870576	A1	2009年 4月 28日
				AU	2007267586	A1	2007年 12月 6日
				PT	2021476	E	2014年 9月 10日
				IL	195451	A	2014年 5月 28日
				SI	2021476	T1	2014年 10月 30日
				AU	2007267586	A2	2009年 1月 8日
				IL	195451	D0	2011年 8月 1日
				US	2014189911	A1	2014年 7月 3日
				EP	2021476	B1	2014年 7月 9日
				JP	5529322	B2	2014年 6月 25日
				RS	53560	B1	2015年 2月 27日
				HR	P20140951	T1	2014年 11月 21日
				MY	150655	A	2014年 2月 14日
				TW	200817679	A	2008年 4月 16日
				ES	2498976	T3	2014年 9月 26日
				DO	P2007000106	A	2008年 12月 15日
				US	2011321185	A1	2011年 12月 29日
				TW	I453412	B	2014年 9月 21日
				AP	200804692	D0	2008年 12月 31日
				EP	2021476	A4	2009年 10月 28日
				JP	2013150632	A	2013年 8月 8日
				NZ	573179	A	2011年 9月 30日
				US	8581047	B2	2013年 11月 12日
				UY	30370	A1	2008年 1月 2日
				JP	5513883	B2	2014年 6月 4日
				WO	2007140256	A1	2007年 12月 6日
				MX	2008015108	A	2009年 2月 4日
				CR	10461	A	2009年 1月 12日
				SG	171612	A1	2011年 6月 29日
				US	2008260932	A1	2008年 10月 23日
				EP	2021476	A1	2009年 2月 11日
				KR	20090033840	A	2009年 4月 6日
				AR	061131	A1	2008年 8月 6日
				AU	2007267586	B2	2012年 4月 5日
				KR	20130042052	A	2013年 4月 25日
				US	8062840	B2	2011年 11月 22日
				EG	26119	A	2013年 3月 5日
				JP	2009538153	A	2009年 11月 5日
				KR	101366363	B1	2014年 2月 21日
CN	1295621	A	2001年 5月 16日	JP	2002509728	A	2002年 4月 2日
				WO	9950428	A2	1999年 10月 7日
				EP	1062356	A2	2000年 12月 27日
				WO	9950428	A3	1999年 12月 23日
				CO	4820447	A1	1999年 7月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/080542

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)
		ZA 200005113 A	2002年 1月 2日
		PE 03572000 A1	2000年 5月 2日
		MA 24792 A1	1999年 10月 1日
		PL 343636 A1	2001年 8月 27日
		AR 015255 A1	2001年 4月 18日
		CA 2324969 A1	1999年 10月 7日
		AU 3419099 A	1999年 10月 18日
		BR 9909360 A	2000年 12月 12日
		US 6465636 B1	2002年 10月 15日
CN 1333834 A	2002年 1月 30日	EP 1136560 A4	2004年 10月 27日
		WO 0125459 A1	2001年 4月 12日
		AT 414779 T	2008年 12月 15日
		EP 1136560 A1	2001年 9月 26日
		KR 20020013479 A	2002年 2月 20日
		KR 100785946 B1	2007年 12月 14日
		CN 1249246 C	2006年 4月 5日
		CA 2353077 A1	2001年 4月 12日
		AU 6000199 A	2001年 5月 10日
		JP 4394323 B2	2010年 1月 6日
		CA 2353077 C	2012年 3月 20日
		EP 1136560 B1	2008年 11月 19日
		DE 69939944 D1	2009年 1月 2日
		ES 2317712 T3	2009年 4月 16日
		AU 783763 B2	2005年 12月 1日
		US 7087812 B1	2006年 8月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)