

(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12月1日 (01.12.2016)



(10) 国际公布号  
WO 2016/188332 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 15/11 (2006.01) C12N 5/14 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/082025
- (22) 国际申请日: 2016年5月13日 (13.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201510267044.5 2015年5月22日 (22.05.2015) CN  
201610246599.6 2016年4月18日 (18.04.2016) CN
- (71) 申请人: 杭州瑞丰生物科技有限公司 (HANG-ZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY LIMITED, INC.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭区文一西路1500号, Zhejiang 311121 (CN)。
- (72) 发明人: 沈志成 (SHEN, Zhicheng); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙大紫金港校区, Zhejiang 310058 (CN)。林朝阳 (LIN, Chaoyang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙大紫金港校区, Zhejiang 310058 (CN)。张先文 (ZHANG, Xianwen); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙

大紫金港校区, Zhejiang 310058 (CN)。徐晓丽 (XU, Xiaoli); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙大紫金港校区, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州天正专利事务所有限公司 (TIAN-ZHENG PATENT ATTORNEYS); 中国浙江省杭州市上城区庆春路9号长堤明苑22层B座王兵、俞慧, Zhejiang 310009 (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。

(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,

[见续页]

(54) Title: CORN TRANSFORMATION EVENT AND SPECIFICITY IDENTIFICATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种玉米转化事件及其特异性鉴定方法和应用

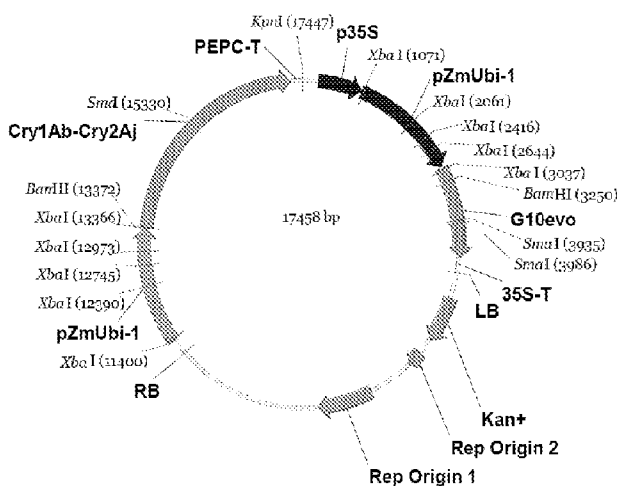


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a corn transformation event and a specificity identification method and use thereof, wherein the transformation event uses the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO.1 as the left wing region of the exogenous gene and uses the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO.3 as the right wing region of the exogenous gene, or uses the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO.14 as the left wing region of the exogenous gene and use the nucleotide sequences shown by SEQ ID NO.15 as the right wing region of the exogenous gene; the corn transformation event can introduce the exogenous gene specifically into a corn strain and endow the acceptor corn with insect-resistant and glyphosate-resistant capabilities; the insect-resistant and glyphosate-resistant gene in the acceptor corn can be stably inherited; and the expression of the insect-resistant and glyphosate-resistant gene would not produce an adverse impact on the agronomic traits of the acceptor corn, and implementing the identification method can provide molecular markers for using the transformation event to breed, thereby increasing the efficiency of the breeding work.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2016/188332 A1

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))。

**根据细则 4.17 的声明:**

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

---

一种玉米转化事件及其特异性鉴定方法和应用, 所述转化事件以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区, 以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区或者以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区, 以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区; 该玉米转化事件可实现将外源基因特异性引入到玉米品系中, 赋予受体玉米抗虫抗草甘膦的能力; 抗虫抗草甘膦基因在受体玉米中能够稳定遗传; 抗虫抗草甘膦基因的表达对受体玉米的农艺性状不会产生不良影响, 实施该鉴定方法可以为利用转化事件进行育种提供分子标记, 提高育种工作效率。

## 一种玉米转化事件及其特异性鉴定方法和应用

### (一) 技术领域

本发明属于植物分子生物学领域，特别是转基因农作物品种培育领域。本发明涉及具有抗虫抗草甘膦玉米转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”及其特异性检测方法。

### (二) 背景技术

玉米 (*Zea mays*) 是一种重要的作物，是世界上很多地区的主要食物来源。随着植物基因工程的发展，通过导入外源基因来进行遗传改造成为遗传育种的主要手段之一。在玉米生产中，抗虫和抗除草剂都是非常需要的农艺性状。抗虫转基因玉米能够大幅度地降低化学杀虫剂的使用量，从而降低生产成本并且减少农药对环境和农作物产品的污染。抗除草剂玉米可以大幅度降低防治杂草所需要的农业劳动力，降低劳动力的投入，减少杂草对玉米产量的影响。此外，利用除草剂防治杂草也更加有利于推广免耕技术，减少土壤和肥料的流失。因此抗虫和抗除草剂性能在玉米生产中具有突出的重要性。

转化事件是由外源基因在基因组插入位点的上下游侧翼区和外源基因构成的分子结构。通常，外源基因转化植物可以得到一个转化体群体，这个转化体群体包含大量独立的事件，其中每个事件都是独特的。外源基因在植物中的表达受到外源基因所插入的染色体位置的影响。这可能源自染色质结构或者整合位点附近转录调控元件的影响。相同基因在不同转化事件中的表达水平具有很大的差异，在表达的空间或时间模式上也可能存在差异。而且外源基因的插入也可能会影响内源基因的表达。因此，每个独立转化事件对受体植物的影响都是不同的。获得能有效表达外源基因，同时不影响植株本身农艺性状的植物转化事件在培育转基因作物新品种中具有重要的应用价值。

目前并不清楚外源基因在植物中的插入位点整合规律，因此研发过程中需要产生大量转化体并从中筛选理想的转化事件。通常需要产生数百乃至数千的不同转化事件，并在这些转化事件中筛选出具有预期转基因表达水平和模式的单一转化事件。利用育种方法、体细胞原生质融合技术可以将该转化事件导入到不同遗传背景的玉米基因组中，从而赋予玉米抗虫抗草甘膦的能力。

通过转化事件专利对转基因农作物进行知识产权保护是目前国际上通用方法，能够进入商业化的转化事件是从大量转化事件中筛选鉴定获得，外源基因与受体作物基因组特异位点整合，具有独特的分子特征，同时外源基因表达规律与生产实际需要相吻合，在基因分子特征和表达规律上都与一般转化事件不同，因此具有明显的新颖性、实用性和创造性。目前，国际上商业化的转化事件多获得知识产权保护，部分转化事件在中国申请并获得专利保护。

### (三) 发明内容

本发明目的是提供优良的玉米抗虫抗草甘膦转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”，这两个独立转化事件所含外源基因的设计构思相同，是同个植物转化载体侵染玉米后，通过筛选获得的优良转化事件，这两个转化事件都可实现将外源基因引入到玉米品系中，赋予受体玉米具有抗虫抗草甘膦的能力；抗虫抗草甘膦基因外源基因在受体玉米中能够稳定遗传；抗虫抗草甘膦基因的

表达对受体玉米的农艺性状不会产生不良影响。

本发明提供一种玉米转化事件，所述转化事件以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区或者以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区。所述外源基因包括抗虫基因和抗草甘膦基因，所述抗虫基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.4 所示，所述抗草甘膦基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.5 所示。

进一步，优选所述外源基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.2 所示。

进一步，优选所述玉米转化事件以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区，即本发明提供抗虫抗草甘膦玉米转化事件“双抗 12-5”，其特征 DNA 序列由外源 T-DNA 插入序列 SEQ ID NO.2、插入序列左侧翼区玉米基因组序列 SEQ ID NO.1 和插入序列右侧翼区玉米基因组序列 SEQ ID NO.3 构成。

进一步，所述玉米转化事件以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区，即本发明提供抗虫抗草甘膦玉米转化事件“双抗 12-15”，其特征 DNA 序列由外源 T-DNA 插入序列 SEQ ID NO.2、插入序列左侧翼区玉米基因组序列 SEQ ID NO.14 和插入序列右侧翼区玉米基因组序列 SEQ ID NO.15 构成。

本发明所述玉米转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”是利用农杆菌侵染法，将含有抗虫抗草甘膦基因表达框的外源 T-DNA 序列导入玉米细胞中，通过再生含有外源基因的玉米细胞获得玉米转基因群体，并利用分子生物学和生物测定的方法筛选得到能够满足生产需要的玉米转化事件。

本发明提供的外源 T-DNA 含有抗虫基因表达框和抗草甘膦基因表达框。

本发明提供的抗虫基因表达框由玉米 *polyubiquitin-1* 基因启动子 (pZmUbi-1)、抗虫融合基因 *cry1Ab-cry2Aj* 和玉米 *PEP carboxylase* 基因(pepc)终止子构成。其中玉米 *polyubiquitin-1* 基因启动子 (pZmUbi-1) 大小为 2.1kb，核苷酸序列为 SEQ ID NO.7，是组成型启动子，可驱动目的基因在玉米所有组织中表达。*PEP carboxylase* 基因(pepc)终止子，来源于玉米，大小为 0.2kb，核苷酸序列为 SEQ ID NO.8。

进一步，所述抗虫基因是 *cry1Ab* 和 *cry2Aj* 的融合基因，核苷酸序列为 SEQ ID NO.4，其中，1-1947 bp 为 *cry1Ab* 的核苷酸序列；1948-1965 bp 核苷酸序列为 CCCGGGAAGGGTGGAGGA，编码 *Cry1Ab* 和 *Cry2Aj* 之间的连接肽，连接肽序列为 PGKGGG；1966-3861bp 为 *cry2Aj* 改良基因的核苷酸序列。融合基因全长为 3861bp，编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO.6。所编码的蛋白质由 1287 个氨基酸残基组成，蛋白分子量大小为 142.8 kDa。*Cry1* 和 *Cry2* 是两类被广泛应用的抗虫基因，其中 *Cry1Ab*，*Cry1Ac*，*Cry1F* 和 *Cry2Ab* 等在玉米、棉花中已经大规模推广应用，*Cry1Ab* 是一种杀虫能力比较强的 Bt 晶体杀虫蛋白质，特别是其对玉米螟的杀虫活性尤为高。*Cry2Aj* 对主要农作物鳞翅目害虫具有比较高的杀虫能力，与目前生产大量推广的 *Cry2Ab* 的杀虫谱比较接近，氨基酸序列也比较相似。这些基因的安全性和抗虫能力已经得到充分证明。本发明使用了

*cry1Ab* 和 *cry2Aj* 的融合基因，其特点是同时利用两种不同的抗虫 Bt 基因，并且它们在玉米中表达量相同。目前的研究认为，二个不同类型抗虫基因同时表达有可能减缓害虫抗性的发生 (Zhao et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21:1493-1497)，有利于抗虫转基因玉米的长期有效利用。

本发明提供的抗草甘膦表达框是由花椰菜花斑病病毒(Cauliflower Mosaic Virus, CaMV)的 35S 启动子和玉米 *polyubiquitin-1* 基因启动子组成的复合启动子(p35S-pZmUbi-1，核苷酸序列为 SEQ ID NO.9)，5'端连有一段编码 AHAS 基因叶绿体信号肽的 G10evo (EPSPS) (核苷酸序列为 SEQ ID NO.5，编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO.10) 和 CaMV 的 35S 基因终止子 (SEQ ID NO.11) 构成。

进一步，所述抗草甘膦基因是 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS) 基因。草甘膦是一种广谱灭生性除草剂，它通过抑制植物中 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶的活性，导致植物不能合成芳香族氨基酸而死亡。为了方便杂草控制，通过在作物转入对草甘膦具有抗性的 EPSPS 可以使作物获得抗草甘膦的能力，实现在农作物生长的同时选择性地除草。

本发明还涉及一种含玉米转化事件的重组载体，其含有本发明所述 T-DNA 插入序列。在一个实施方案中，所述载体图谱如附图 1 所示，载体序列为 SEQ ID NO.13。

本发明提供一种含玉米转化事件的重组细胞，重组细胞中含有本发明所述的重组载体。在一个实施方案中，所述重组细胞为含有本发明所述重组载体的重组农杆菌细胞。

本发明提供用于检测转化事件“双抗 12-5”的引物对，所述引物对由特异性识别 T-DNA 插入序列的第一引物和任意特异性识别 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.3 的第二引物组成。在一些实施方案中，所述第一引物序列为：SP1 或 R1，所述第二引物序列为：RB-Test 或 LB-test。

本发明提供一种鉴定玉米转化事件“双抗 12-5”的方法，其包括：

- 1) 从待鉴定的玉米样品提取基因组 DNA；
- 2) 以提取的 DNA 样品为模板，使用本发明提供的引物对进行 PCR 扩增；
- 3) 检测 PCR 扩增产物，如果扩增产物长度与转化事件上所述 PCR 引物对的序列之间的理论长度一致，则说明所述样品中含有“双抗 12-5”。

本发明还提供一种玉米转化事件“双抗 12-5”特异性的 PCR 鉴定方法，所述用于玉米转化事件“双抗 12-5”特异性 PCR 鉴定的引物 (SP1 和 RB-Test 是检测外源基因右侧是否与玉米基因组特异性位点连接，R1 和 LB-test 是检测外源基因左侧是否与玉米基因组特异性位点连接) 为：

SP1: 5'-TTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCC-3' (SEQ ID NO.17);

RB-Test: 5'-CTCGTCATCGACCAAGTCATGAAG-3' (SEQ ID NO.18)。

R1: 5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG-3' (SEQ ID NO.19);

LB-test: 5'-AAGACGTCCGGGGGAACCGTTGTTC-3' (SEQ ID NO.20);

本发明所述 PCR 反应体系为：

10×扩增缓冲液 5μL

dNTP 混合物 200μmol/L

正向引物 10pmol

反向引物	10pmol
基因组 DNA	0.1~2μg
Taq DNA 聚合酶	2.5μL
MgCl <sub>2</sub>	1.5mmol/L
加双蒸水至	50μL;

PCR 反应条件为：32 个循环，每个循环是 95℃，45 秒；65℃，50 秒；72℃，30 秒。

本发明提供用于检测转化事件“双抗 12-15”的引物对，所述引物对由特异性识别 T-DNA 插入序列的第一引物和任意特异性识别 SEQ ID NO.14 或 SEQ ID NO.15 的第二引物组成。在一些实施方案中，所述第一引物序列为：LB-15T 或 RB-15T，所述第二引物序列为：LB-15G 或 RB-15G。

本发明提供一种鉴定玉米转化事件“双抗 12-15”的方法，其包括：

- 4) 从待鉴定的玉米样品提取基因组 DNA；
- 5) 以提取的 DNA 样品为模板，使用本发明提供的引物对进行 PCR 扩增；
- 6) 检测 PCR 扩增产物，如果扩增产物长度与转化事件上所述 PCR 引物对的序列之间的理论长度一致，则说明所述样品中含有“双抗 12-15”。

本发明还提供一种玉米转化事件“双抗 12-15”特异性的 PCR 鉴定方法，所述用于玉米转化事件“双抗 12-15”特异性 PCR 鉴定的引物（RB-15T 和 RB-15G 是检测外源基因右侧是否与玉米基因组特异性位点连接，LB-15T 和 LB-15G 是检测外源基因左侧是否与玉米基因组特异性位点连接）为：

LB-15T: 5'-CTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCC-3' (SEQ ID NO.21);

LB-15G: 5'-GCCGTACGTTTCCCAGCC-3' (SEQ ID NO.22)。

RB-15T: 5'-AGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGT-3' (SEQ ID NO.23);

RB-15G: 5'-CGTACAGGGAGCTTAGGGGG-3' (SEQ ID NO.24);

本发明所述 PCR 反应体系为：

10×扩增缓冲液	5μL
dNTP 混合物	200μmol/L
正向引物	10pmol
反向引物	10pmol
基因组 DNA	0.1~2μg
Taq DNA 聚合酶	2.5μL
MgCl <sub>2</sub>	1.5mmol/L
加双蒸水至	50μL;

PCR 反应条件为：32 个循环，每个循环是 95℃，45 秒；65℃，50 秒；72℃，30 秒。

本发明提供一种所述玉米转化事件在制备抗虫抗草甘膦玉米细胞中的应用，利用含有所述玉米转化事件的玉米材料与玉米育种材料进行杂交后，进一步进行回交，获得所述抗虫抗草甘膦玉

米细胞。具体利用抗虫抗草甘膦转化事件“双抗 12-5”培育抗虫抗草甘膦玉米的方法，包括：利用含有转化事件“双抗 12-5”的玉米材料与其它玉米育种材料进行杂交后，进一步进行回交，获得含有本发明所述转化事件“双抗 12-5”的新材料。

本发明提供利用抗虫抗草甘膦转化事件“双抗 12-15”培育抗虫抗草甘膦玉米的方法，包括：利用含有转化事件“双抗 12-15”的玉米材料与其它玉米育种材料进行杂交后，进一步进行回交，获得含有本发明所述转化事件“双抗 12-15”的新材料。

本发明所述含“双抗 12-5”转化事件（即 SEQ ID NO.12）的植物细胞，即玉蜀黍属玉米 *Zea mays* L. 双抗 12-5 种子，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC NO: P201506，保藏日期：2015 年 4 月 27 日，保藏地址：中国武汉武汉大学，邮编 430072。

本发明所述含“双抗 12-15”转化事件（即 SEQ ID NO.16）的植物细胞，即玉蜀黍属玉米 *Zea mays* L. 双抗 12-15 种子，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC NO: P201607，保藏日期：2016 年 4 月 11 日，保藏地址：中国武汉武汉大学，邮编 430072。

与现有技术相比，本发明的有益效果主要体现在：本发明提供了优良的转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”，所述转化事件可实现将外源基因特异性引入到玉米品系中，赋予受体玉米具有抗虫抗草甘膦的能力；抗虫抗草甘膦基因在受体玉米中能够稳定遗传；抗虫抗草甘膦基因的表达对受体玉米的农艺性状不会产生不良影响。

#### （四）附图说明

图 1、实施例 1 含目的基因的质粒结构图，LB 和 RB：T-DNA 的边界序列；pZmUbi-1：玉米 *polyubiquitin-1* 启动子；p35S：35S 启动子（CaMV 病毒）；G10evo：抗草甘膦 EPSPS 基因；Cry1Ab-Cry2Aj：抗虫 Bt 融合基因 *cry1Ab/cry2Aj*。

图 2、双抗 12-5 抗草甘膦基因的 Southern 杂交后的荧光显影图；BamHI 为基因组经 BamHI 单酶切；XbaI 为基因组经 XbaI 单酶切；以地高辛标记的 G10evo 全长 DNA 作为探针杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影；图右侧为 DNA 长度标准（bp）标记，箭头指杂交产生的特异性条带。

图 3、双抗 12-5 抗虫基因的 Southern 杂交后荧光显影图；KpnI 为双抗 12-5 的基因组 DNA 经过 KpnI 酶切；SmaI 为“双抗 12-5”的基因组 DNA 经过 SmaI 酶切，地高辛标记的 Cry1Ab 全长 DNA 作为探针，杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影，图右侧为 DNA 长度标准（bp）。

图 4、双抗 12-15 抗虫基因的 Southern 杂交后的荧光显影图；SacI 为基因组经 SacI 单酶切，AclI 位双抗 12-15 基因组经 AclI 单酶切，M 为 DNA 长度标准（bp）。

图 5、双抗 12-15 抗草甘膦基因的 Southern 杂交后的荧光显影图；BamHI 为双抗 12-15 基因组经 BamHI 单酶切；XbaI 为双抗 12-15 基因组经 XbaI 单酶切；以地高辛标记的 G10evo 全长 DNA 作为探针杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影；M 为 DNA 长度标准（bp）标记。

图 6、插入位点的 PCR 验证电泳图；1 为转基因玉米双抗 12-5 左侧翼 PCR；2 为非转基因对照左侧翼 PCR；3 为转基因玉米右侧翼 PCR；4 为非转基因对照右侧翼 PCR；M 为 DNA 大小标准（PCR 产物在 200 - 500bp 之间）。

图 7、插入位点的 PCR 验证电泳图；玉米“双抗 12-15”左侧翼 PCR；1 和 2 为非转基因对照；泳道 3-6 为转基因玉米“双抗 12-15”；M 为 DNA 大小标准（PCR 产物在 1170 bp 左右）。

图 8、插入位点的 PCR 验证电泳图；玉米“双抗 12-15”右侧翼 PCR；1 和 2 为非转基因对照；泳道 3-6 为转基因玉米“双抗 12-15”；M 为 DNA 大小标准（PCR 产物在 600 bp 左右）。

图 9、双抗 12-5 在受体玉米中的 DNA 遗传稳定性检测电泳图；M 为 DNA 大小标准样品(100 bp 梯度)；-为阴性对照(非转基因玉米)；+为阳性对照（加入了经过序列测定验证的 PCR 阳性产物的非转基因玉米样品）；1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别是第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 代的受体玉米样品；PCR 产物的预期大小是 145bp，与 PCR 产物电泳分析的大小基本一致。

图 10、“双抗 12-15”在受体玉米中的 DNA 遗传稳定性检测电泳图；M 为 DNA 大小标准样品(100 bp 梯度)；-为阴性对照(非转基因玉米)；+为阳性对照（加入了经过序列测定验证的 PCR 阳性产物的非转基因玉米样品）；1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别是第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 代的受体玉米样品；PCR 产物的预期大小是 1000bp，与 PCR 产物电泳分析的大小基本一致。

(五) 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于此：

**实施例 1：转化事件的获得**

(1) 含有外源基因的质粒载体的获得

本发明用于玉米转化的载体图谱如图 1 所示，转化质粒载体核苷酸序列为 SEQ ID NO.13，具体载体组成元件的名称、位置如表 1 所示。其中 T-DNA 基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO:2 所示。SEQ ID NO:2 包含完整的抗草甘膦表达框和抗虫表达框，具体由如下部分组成，抗草甘膦表达框：来源于 CaMV 的 35S 启动子与玉米 Polyubiquitin-1 启动子形成的复合启动子(核苷酸序列为 SEQ ID NO.9 所示)，该复合启动子驱动 5'端连有一段编码 AHAS 基因叶绿体信号肽的抗草甘膦基因 G10evo (EPSPS)（核苷酸序列为 SEQ ID NO.5 所示），终止子是 CaMV 的 35S 基因终止子（长度为 0.2kb，其核苷酸序列为 SEQ ID NO.11）。抗虫表达框：Cry1Ab-PGKGGG-Cry2Aj 融合基因，驱动 Cry1Ab-Cry2Aj 融合基因的启动子为来源于玉米 polyubiquitin-1 基因启动子（pZmUbi-1）(通过 PCR 从玉米基因组获得，大小为 2.1kb，核苷酸序列为 SEQ ID NO.7，pZmUbi-1 可驱动目的基因在所有植物组织中表达)，终止子为来源于玉米的 PEP carboxylase 基因(pepc)终止子（大小为 0.2kb，核苷酸序列为 SEQ ID NO.8）。利用电击法（2500V）将获得的植物转化质粒导入农杆菌 LBA4404 中，获得含有植物转化载体的农杆菌。

表 1 玉米转化载体组成元件的名称、位置和功能

元件	质粒中的位置(长度)	功能	备注
完整载体	17458	--	SEQ ID NO.13
RB (T-DNA 右边界)	11088-11113 (26bp)	T-DNA 插入边界序列	大部分农杆菌载体是相同的。



玉米泛素启动子 (pZmUbi-1)	11355-13370 (2016bp)	启动抗虫基因的表达	SEQ ID NO.7
<i>cryIAb/cry2Aj</i> (融合基因)	13380-17240 (3861bp)	抗虫	SEQ ID NO.4
玉米 <i>pepc</i> 终止子	17250-17449 (200bp)	转录终止信号	SEQ ID NO.8
35S玉米泛素 复合启动子	245-2975 (2731bp)	启动抗草甘膦基因的 表达	SEQ ID NO.9
AHAS 基因编码叶 绿体信号肽的序列	2976-3248 (273bp)	将 G10evo 导入到叶 绿体中	SEQ ID NO.5
G10evo (EPSPS)	3249-4572 (1324bp)	抗草甘膦	
CaMV 的 35S 终止 子	4573-4762 (190bp)	转录终止信号	SEQ ID NO.11
LB (T-DNA 左边 界)	4829-4854 (26bp)	T-DNA 插入边界序列	
载体框架序列	4855-11087 (6233 bp)	转化载体框架序列	

## (2) 玉米遗传转化

本研究中获得玉米转化事件所用的方法是农杆菌介导方法, 根据 Frame 等报道的方法和培养基配方 (Plant Physiol, 2002,129:13-22) 进行转化, 使用草甘膦为筛选试剂, 具体步骤如下:

(1) 取授粉后 8~10 天的亲本玉米穗, 收集大小为 1.0-1.5 mm 未成熟胚。将含有转化载体的农杆菌与未成熟胚在 22 °C 共培养 2-3 天。

(2) 将步骤 (1) 培养后的未成熟胚转移到含有终浓度 200 mg/L 特美汀抗生素 (葛兰素史克, 美国) 的愈伤组织诱导培养基上, 28°C 暗培养 10-14 天杀灭农杆菌。

(3) 将步骤 (2) 诱导培养后的所有愈伤组织转到含有终浓度 2 mM 草甘膦的筛选培养基上, 28 °C 暗培养 2-3 周。

(4) 转移步骤 (3) 所有的愈伤组织到新鲜的含有 (2 mM) 草甘膦的筛选培养基上, 28 °C 暗培养 2-3 周。

(5) 然后, 转移步骤 (4) 成活的胚性组织到再生培养基上, 28 °C 暗培养 10-14 天, 每皿一个株系。

(6) 转移步骤 (5) 胚性组织到新鲜的再生培养基上, 26 °C 光照培养 10-14 天。

(7) 转移步骤 (6) 所有发育完全的植株到生根培养基上, 26 °C 光照培养直到根发育完全, 将生根后的再生苗移植到温室中生长繁种, 用于筛选分析。

### 实施例 2: 转化事件的筛选

通过农杆菌介导获得了 240 个抗虫抗草甘膦玉米独立转化体 (实施例 1)。根据载体序列 (SEQ ID NO.13 设计引物, 用 PCR 方法筛选含有抗草甘膦基因 G10eve (核苷酸序列为 SEQ ID NO.5 所示) 和抗虫基因 *cryIAb-cry2Aj* (核苷酸序列为 SEQ ID NO.4 所示), 同时不含载体骨架序列的玉米转化体, 并在温室中进行抗虫抗草甘膦性能的初步测试: 通过喷施 0.4 wt% 的草甘膦, 去除草甘膦抗性差的转化体, 在剩余的转化体上接玉米螟, 筛选没有玉米螟为害的转化体, 共计获得 15

个含转化事件编号为“双抗 12-1”~“双抗 12-15”的具有较强抗虫抗草甘膦能力的玉米转化体。分别将含双抗独立转化事件的转化体与玉米自交系 B73 杂交留种，进行随后的筛选分析。

#### (1) 草甘膦抗性筛选

选择 15 个含转化事件“双抗 12-1”-转化事件“双抗 12-15”的转化体的 T3 和 T5 代转基因玉米进行草甘膦抗性对比。转基因玉米和亲本非转基因对照种子发芽后 20-30 天，长至 4-5 叶期，喷施终浓度为 0.4 wt% 的草甘膦（农达，孟山都公司，美国），使用量为 25 L/亩，7 天后记录玉米生长发育情况和死亡率。草甘膦喷施试验结果如表 2 所示，转基因品系都具有明显的抗草甘膦能力。其中含有转化事件“双抗 12-1”、“双抗 12-3”、“双抗 12-4”、“双抗 12-5”、“双抗 12-7”、“双抗 12-9”、“双抗 12-10”、“双抗 12-12”、“双抗 12-13”、“双抗 12-14”和“双抗 12-15”的草甘膦抗性水平比较高。

表 2. 双抗玉米草甘膦抗性试验

转化事件	T3 代	T5 代
双抗 12-1	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-2	心叶疑似变形	心叶疑似变形
双抗 12-3	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-4	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-5	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-6	心叶变形	心叶变形
双抗 12-7	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-8	心叶变形	心叶变形
双抗 12-9	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-10	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-11	心叶少量黄白	心叶少量黄白
双抗 12-12	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-13	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-14	没有明显药害	没有明显药害
双抗 12-15	没有明显药害	没有明显药害
常规对照	全部死亡	全部死亡

#### (2) 抗虫能力测试

##### 1) 田间抗虫能力测试

分别选择 15 个含转化事件“双抗 12-1”~“双抗 12-15”的转化体的 T3 和 T5 代转基因玉米进行抗虫性能分析。转基因玉米和亲本非转基因对照温室中发芽后 20 天喷洒浓度为 0.4 wt% 的草甘膦确定是转基因后，各取 10 株，每株接 1 龄亚洲玉米螟 10 个，亚洲玉米螟来自中国科学院植物保护研究所玉米害虫组。将卵块至于  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ，RH  $70 \pm 5\%$ ，16h:8h (L:D) 条件下孵化，选取孵化 12 小时内的幼虫供生测实验用。接虫 6 天后调查玉米螟为害情况，进行抗虫分级。抗虫分级采用 9 级标准 (Marcon et al., 1999)：1~3 级：虫孔针刺状(1 级：稀少、分散；2 级：中等数量；3 级：大量)。4~6 级：虫孔火柴头大小(4 级：稀少、分散；5 级：中等数量；6 级：大量)。7~9 级：虫孔大于火柴头(7 级：稀少分散；8 级：中等数量；9 级：大量)。抗性级别分类：1~2 级(高抗)，3~4 级(抗虫)，5~6 级(感虫)，7~9 级(高感)。结果如表 3 所示，“双抗 12-1”、“双抗 12-5”、“双抗 12-9”、“双抗 12-10”、“双抗 12-11”、“双抗 12-13”、“双抗 12-14”和“双抗 12-15”具有高抗虫性能。

表 3：不同转化事件对玉米螟的抗性等级鉴定

玉米品系	T3 代	T5 代	抗虫级别
双抗 12-1	少量取食斑点	少量取食斑点	1
双抗 12-2	少量取食	少量取食	3
双抗 12-3	少量取食斑点	少量取食斑点	2
双抗 12-4	少量取食斑点	少量取食斑点	2
双抗 12-5	少量取食斑点	少量取食斑点	1
双抗 12-6	少量取食	少量取食	3
双抗 12-7	少量取食斑点	少量取食斑点	2
双抗 12-8	少量取食	少量取食	3
双抗 12-9	少量取食斑点	少量取食斑点	1
双抗 12-10	少量取食斑点	少量取食斑点	1
双抗 12-11	少量取食	少量取食	4
双抗 12-12	少量取食	少量取食	3
双抗 12-13	少量取食斑点	少量取食斑点	2
双抗 12-14	少量取食斑点	少量取食斑点	1
双抗 12-15	少量取食斑点	少量取食斑点	1
对照	取食严重	取食严重	7

## 2) 实验室抗虫性能测试

分别选择 15 个含转化事件“双抗 12-1”~“双抗 12-15”的转化体的 T3 和 T5 代转基因玉米，在转基因玉米和对照玉米心叶中期 (6-8 叶完全展开) 选择未完全展开的心叶叶片在实验室进行玉米螟抗性测定。接玉米螟 2 天后调查取食面积和玉米螟死亡情况。结果见表 4 所示，结果显示

大部分转基因玉米抗性良好。它们的叶片被取食非常少，特别是双抗 12-5、双抗 12-9、双抗 12-11、双抗 12-14 和双抗 12-15 接虫 2 天后玉米螟取食面积不到 10 mm<sup>2</sup>。接虫 2 天以后玉米螟死亡率在 80%以上，4 天以后大部分转基因玉米螟死亡率到达 100%。

表 4： 转基因玉米心叶期对亚洲玉米螟的抗虫性

发育时期	玉米品系	被取食的总面积 (mm <sup>2</sup> /25 头虫) (mean ± SE)		死亡率(%)		
		48 h	96 h	48 h	96 h	168 h
心叶	对照 1	119.5 ± 18.0a	263.0 ± 39.5a	2.8	6.4	11.2
中期 (Mid-whorl)	对照 2	104.4 ± 14.3a	238.8 ± 39.7a	4.4	6.2	10.2
	双抗 12-2	10.6 ± 1.5b	26.8 ± 6.8b	69.2	92.7	100
	双抗 12-3	12.8 ± 3.3b	13.5 ± 3.3b	89.2	100	100
	双抗 12-4	13.0 ± 2.0b	18.8 ± 4.3b	69.6	99.1	100
	双抗 12-5	6.4 ± 1.4b	8.5 ± 1.9b	80.8	100	100
	双抗 12-9	2.7 ± 0.6b	6.1 ± 1.4b	75.6	99.6	100
	双抗 12-10	13.1 ± 2.5b	17.4 ± 2.9b	81.2	100	100
	双抗 12-11	5.7 ± 1.5b	6.5 ± 1.8b	82.8	100	100
	双抗 12-12	12.8 ± 3.3b	13.5 ± 3.3b	89.2	100	100
	双抗 12-13	10.4 ± 1.2b	21.2 ± 1.8b	75.6	100	100
	双抗 12-14	4.2 ± 1.1b	5.1 ± 1.2b	89.8	100	100
	双抗 12-15	4.9 ± 1.6b	5.9 ± 1.8b	89.6	100	100

注：表 4 中 a、b 表示差异显著

(3) 外源基因插入拷贝数鉴定

综合抗虫和抗草甘膦测定结果，选择抗虫和耐草甘膦能力都比较强的双抗 12-1、双抗 12-5、双抗 12-9、双抗 12-10、双抗 12-14 和双抗 12-15 进行外源基因插入拷贝数鉴定。使用罗氏公司(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche) 进行 Southern 分析，遵照试剂盒提供的操作步骤进行杂交探针制作和 DNA 杂交检测。即提取玉米基因组 DNA，分别经过限制性内切酶 BamHI 和 XbaI 酶切（这些限制性内切酶在外源基因中具有单个的识别位点），在琼脂糖胶上电泳分离酶切片段，然后将 DNA 转移到尼龙基质膜上，利用地高辛标记的 G10eve（核苷酸序列 SEQ ID NO.5）全长 DNA 作为探针杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影。结果显示转化事件“双抗 12-5”在 BamHI 酶切时获得一条大约 14kb 的信号带，利用 XbaI 酶切时获得大约 5.0kb 的信号带（图 2），证明“双抗 12-5”中抗草甘膦基因是单拷贝插入。转化事件“双抗 12-15”在 BamHI 酶切时获得一条大约 2.5 kb 的信号带，而在 XbaI 酶切时获得大约 8.7 kb 的信号带（图 5），证明“双抗 12-15”中抗草甘膦基因是单拷贝插入。

利用 T-DNA 中右边的抗虫融合基因的 Cry1Ab 作为探针对“双抗 12-5”抗虫基因拷贝数进行 Southern 杂交分析，分别用限制性内切酶 KpnI 和 SmaI 对“双抗 12-5”的基因组 DNA 进行单酶切，在琼脂糖胶上分离以后，转移到尼龙基质膜上，然后利用地高辛标记的 Cry1Ab（核苷酸序列 SEQ ID NO. 4 中 1-1947 bp）作为探针杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影。结果显示，用 KpnI

酶切时获得一条大约 7kb 的信号带，而在 SmaI 酶切时获得大约 6.5kb 的信号带（图 3）。

分别用限制性内切酶 SacI 和 AclII 对转化事件“双抗 12-15”的基因组 DNA 进行单酶切，在琼脂糖胶上分离以后，转移到尼龙基质膜上，然后利用地高辛标记的 Cry1Ab（核苷酸序列 SEQ ID NO. 4 中 1-1947 bp）作为探针杂交到尼龙基质膜上以后荧光显影。结果显示，SacI 酶切时获得一条大约 7.8 kb 的信号带，而用 AclII 酶切时获得大约 5.0 kb 的信号带（图 4）。

因此上述实验证明转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”是一个抗虫基因和抗草甘膦基因都是单拷贝插入的转化事件。

#### （4）转基因玉米的农艺性状

根据抗虫性能、抗草甘膦能力和外源基因插入拷贝数，筛选获得具有高抗虫抗草甘膦能力，外源基因单拷贝插入的“双抗 12-5”和“双抗 12-15”进行农艺性状分析。结果显示转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”生长期、花期与非转基因亲本没有差异，在转基因玉米上使用草甘膦除草对“双抗 12-5”和“双抗 12-15”的产量没有影响（表 5）。

表 5：转基因玉米的每穗粒数、100 粒重量和生育期

	双抗 12-5		双抗 12-15		非转基因
	未喷草甘膦	喷草甘膦	未喷草甘膦	喷草甘膦	
平均每穗粒数	238±9.1	236±8.4	241±6.1	249±7.3	232±6.3*
100 粒重量(g)	22.9±2.9	23.6±2.4	23.1±2.6	23.9±1.8	22.1±2.2*
生长期 (d)	110±2.8	110±3.1	110±3.8	110±4.1	110±4.2

注：\*表示由于严重的虫害造成粒重和粒数降低。

#### 实施例 3：外源基因插入位点侧翼序列的鉴定

使用 Liu 等报道的 TAIL-PCR（Thermal asymmetric interlaced PCR）方法（Liu, Plant Journal 1995, 8(3):457-463）对优良转化事件“双抗 12-5”和“双抗 12-15”外源转基因 DNA 插入点两侧的区域序列进行测定。该方法通过 3 个嵌套的特异性引物分别和简并引物组合进行连续的 PCR 扩增，利用不同退火温度选择性地扩增目标片段。对扩增获得的 DNA 片段进行克隆、测序并与网上玉米基因组数据库（<http://www.maizegdb.org>）进行比对分析。

对转化事件“双抗 12-5” T-DNA 左侧翼区的 DNA 片段进行测序和比对，获得的序列为 SEQ ID NO.1，其中核苷酸 1-576 bp 之间的序列对应于玉米基因组 DNA，核苷酸 577-826 bp 之间的序列对应于外源 DNA。对 T-DNA 右侧翼区的 DNA 片段进行测序和比对，获得的序列为 SEQ ID NO.3，其中，核苷酸 1-210 bp 的序列对应于外源 DNA，核苷酸 211-1007 bp 的序列对应于玉米基因组 DNA。将上述经测序比对和验证过的插入位点上下游旁侧序列和外源 T-DNA 序列整合形成本发明所述的转化事件“双抗 12-5”的特异性核苷酸序列，序列编号为 SEQ ID NO.12（即 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.3 的拼接而成）。

对转化事件“双抗 12-15” T-DNA 左侧翼区的 DNA 片段进行测序和比对，获得的序列为 SEQ ID NO.14，其中核苷酸 1-1064 bp 之间的序列对应于玉米基因组 DNA，核苷酸 1065-1172 bp 之间

的序列对应于外源 DNA。对 T-DNA 右侧翼区的 DNA 片段进行测序和比对,获得的序列为 SEQ ID NO.15, 其中, 核苷酸 1-54 bp 的序列对应于外源 DNA, 核苷酸 55-604 bp 的序列对应于玉米基因组 DNA。将上述经测序比对和验证过的插入位点上下游旁侧序列外源 T-DNA 序列整合形成本发明所述的转化事件“双抗 12-15”的特异性核苷酸序列, 序列编号为 SEQ ID NO.16 (即 SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.15 的拼接而成)。

(2) 外源基因特异性检测

根据转化事件的核苷酸序列 (SEQ ID NO.12) 设计可以用于特异性检测“双抗 12-5”的 PCR 引物 (如表 6 所示)。

表 6. “双抗 12-5”特异性检测引物

引物名称	引物序列	引物来源	目的片段
SP1	TTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTT CCC	T-DNA 中	外源基因左侧/ 玉米基因组(304 bp)
LB-test	AAGACGTCCGGGGGAACCGTTGTTC	插入基因左侧玉 米基因组	
R1	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG	T-DNA 中	外源基因右侧/ 玉米基因组
RB-Test	CTCGTCATCGACCAAGTCATGAAG	插入基因右侧玉 米基因组	(350bp)

所述 PCR 反应体系为: 10×扩增缓冲液 5μL, dNTP 混合物 200μmol/L, 正向引物 10pmol, 反向引物 10pmol, 基因组 DNA 0.1~2μg, Taq DNA 聚合酶 2.5μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/L, 加双蒸水至 50μL。

PCR 条件是: 32 个循环, 每个循环是 95℃, 45 秒; 65℃, 50 秒; 72℃, 30 秒。PCR 的条件可以根据使用的酶和反应体系进行调整。对获得 PCR 产物进行琼脂糖电泳分析。左右边界的特异 PCR 产物分别是 304bp 和 350bp (图 6)。必要的时候也可以对 PCR 产物进行序列测定进一步验证。

根据转化事件的核苷酸序列 (SEQ ID NO.16) 设计可以用于特异性检测双抗 12-15 的 PCR 引物 (如表 7 所示)。

表 7. 双抗 12-15 特异性检测引物

引物名称	引物序列	引物来源	目的片段
LB-15T	CTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAAT CC	T-DNA 中	外源基因左侧/ 玉米基因组
LB-15G	GCCGTACGTTTCCCAGCC	插入基因左侧玉 米基因组	(1171bp)
RB-15T	AGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGT	T-DNA 中	外源基因右侧/ 玉米基因组(604 bp)
RB-15G	CGTACAGGGAGCTTAGGGGG	插入基因右侧玉 米基因组	

所述 PCR 反应体系为: 10×扩增缓冲液 5μL, dNTP 混合物 200μmol/L, 正向引物 10pmol, 反向引物 10pmol, 基因组 DNA 0.1~2μg, Taq DNA 聚合酶 2.5μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/L, 加双蒸水至 50μL。

PCR 条件是：32 个循环，每个循环是 95℃，45 秒；65℃，50 秒；72℃，30 秒。PCR 的条件可以根据使用的酶和反应体系进行调整。对获得 PCR 产物进行琼脂糖电泳分析。左右边界的特异 PCR 产物分别是 1171bp（图 7）和 604bp（图 8）。必要的时候也可以将 PCR 产物进行序列测定进一步验证。

#### 实施例 4：遗传稳定性检测

##### 1) 转化事件“双抗 12-5”在受体玉米中的遗传稳定性检测

根据转化事件“双抗 12-5”的重组 DNA 分子（SEQ ID NO.12）设计引物进行插入位点特异性的 PCR 检测，分别取 1-7 代次的受体玉米提取基因组，利用 PCR 鉴定 T-DNA 整合情况。引物为：BR-1(5'GGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCT-3')（SEQ ID NO.25）和 GN-1(5'CCTACTGCGATGACGTTTCGGTGCC-3')（SEQ ID NO.26），

反应体系：10×扩增缓冲液 5μL，dNTP 混合物 200μmol/L，BR-110pmol，10pmolGN-1，基因组 DNA0.1~2μg，Taq DNA 聚合酶 2.5μL，MgCl<sub>2</sub>1.5mmol/L，加双蒸水至 50μL。

反应条件：95℃1 分钟，60℃40 秒，72℃30 秒，30 个循环。Taq 酶从上海生工获得。结果显示，所有代次的转基因玉米 PCR 结果都为阳性。琼脂糖电泳分析显示，PCR 产物大小与预期大小一致是 145bp（图 9）。

##### “双抗 12-5”抗虫抗草甘膦生物测定

玉米螟生物测定（Marcon et al., 1999）表明第 1,2,3,4,5,6,7 代的转基因玉米对一龄玉米螟的杀虫效果都是 100%，抗虫能力稳定遗传。喷施草甘膦试验表明，第 1,2,3,4,5,6,7 代的转基因玉米都能抗每亩 100 克活性草甘膦含量的草甘膦农药。抗草甘膦能力稳定遗传。结果证明抗虫和抗草甘膦能力稳定遗传。

##### 2) 转化事件“双抗 12-15”在受体玉米中的遗传稳定性检测

根据转化事件“双抗 12-15”的重组 DNA 分子（SEQ ID NO.16）设计引物进行插入位点特异性的 PCR 检测，分别取 1-7 代次的受体玉米提取基因组，利用 PCR 鉴定 T-DNA 整合情况。引物为：LB-SP4：5'CTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCC（SEQ ID NO.27）和 LB-M:CTGTTCTGATGGTGGCAGGCAGG（SEQ ID NO.28），

反应体系：10×扩增缓冲液 5μL，dNTP 混合物 200μmol/L，BR-110pmol，10pmolGN-1，基因组 DNA0.1~2μg，Taq DNA 聚合酶 2.5μL，MgCl<sub>2</sub>1.5mmol/L，加双蒸水至 50μL。

反应条件：95℃1 分钟，60℃40 秒，72℃30 秒，30 个循环。Taq 酶从上海生工获得。结果显示，所有代次的转基因玉米 PCR 结果都为阳性。琼脂糖电泳分析显示，PCR 产物大小与预期大小一致是 1000 bp（图 10）。

##### “双抗 12-15”抗虫抗草甘膦生物测定

玉米螟生物测定表明第 1,2,3,4,5 代的转基因玉米对一龄玉米螟的杀虫效果都是 100%，抗虫性能稳定遗传。喷施草甘膦试验表明，第 1,2,3,4,5 代的转基因玉米都能抗每亩 100 克活性草甘膦含量的草甘膦农药。抗草甘膦性能稳定遗传。结果证明抗虫和抗草甘膦能力稳定遗传。

**实施例 5：抗虫抗草甘膦玉米品种培育**

## 1) “双抗 12-5”杂交转育

以含有“双抗 12-5”转化事件的玉米为供体亲本，以玉米自交系 B73 为受体亲本进行一次杂交，4 次回交和 3 次自交。在回交过程中使用草甘膦来清除不含“双抗 12-5”转基因复合结构的分离株系。于 BC4F3 代（回交 4 代后自交 3 代）获得了含有本发明所述的复合转基因结构的稳定自交系 B735。从该株系叶片组织中提取 DNA，扩增出外源插入基因及其侧翼的 DNA 片断，经测序分析证实，来自与供体亲本的复合转基因结构序列一致，说明“双抗 12-5”转化事件稳定转育到新的受体材料中。以 B735 为母本，Mo17 为父本组配获得杂交种 B7M，对 B7M 进行外源插入基因及其侧翼 DNA 的 PCR 分析和测序，结果显示 B7M 含有转化事件“双抗 12-5”。田间抗性试验显示，B7M 具有良好的抗草甘膦能力和抗虫性能。

## 1) “双抗 12-15”有性杂交转育

以含有“双抗 12-15”转化事件的玉米为供体亲本，以玉米自交系 MR-1 为受体亲本进行一次杂交，4 次回交和 3 次自交。在回交过程中使用草甘膦来清除不含“双抗 12-15”转基因复合结构的分离株系。于 BC4F3 代（回交 4 代后自交 3 代）获得了含有本发明所述的复合转基因结构的稳定自交系 M45。从该株系叶片组织中提取 DNA，扩增出外源插入基因及其侧翼的 DNA 片断，经测序分析证实，来自与供体亲本的复合转基因结构序列一致，说明“双抗 12-15”转化事件稳定转育到新的受体材料中。以 M45 为母本，RF1 为父本组配获得杂交种 M7R，对 M7R 进行外源插入基因及其侧翼 DNA 的 PCR 分析和测序，结果显示 M7R 含有转化事件“双抗 12-15”。田间抗性试验显示，M7R 具有良好的抗草甘膦能力和抗虫性能。



# 权利要求书

WO 2016/188332

PCT/CN2016/082025

1、一种玉米转化事件，其特征在于所述转化事件以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区或者以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区。

2、如权利要求 1 所述的玉米转化事件，其特征在于所述外源基因包括抗虫基因和抗草甘膦基因。

3、如权利要求 2 所述的玉米转化事件，其特征在于所述抗虫基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.4 所示。

4、如权利要求 2 所述的玉米转化事件，其特征在于所述抗草甘膦基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.5 所示。

5、如权利要求 1 所述的玉米转化事件，其特征在于所述外源基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO.2 所示。

6、一种权利要求 1 所述玉米转化事件的特异性 PCR 鉴定方法，其特征在于以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区，用于特异性 PCR 鉴定的引物：

SP1: 5'-TTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCC-3';

RB-Test: 5'-CTCGTCATCGACCAAGTCATGAAG-3'。

R1: 5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG-3';

LB-test: 5'-AAGACGTCCGGGGGAACCGTTGTTC-3'。

7、一种权利要求 1 所述玉米转化事件的特异性 PCR 鉴定方法，其特征在于以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区，用于特异性 PCR 鉴定的引物：

LB-15T: 5'-CTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAATCC-3';

LB-15G: 5'-GCCGTACGTTTCCCAGCC-3'。

RB-15T: 5'-AGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGT-3';

RB-15G: 5'-CGTACAGGGAGCTTAGGGGG-3'。

8、一种含权利要求 1 所述玉米转化事件的植物细胞，其特征在于所述植物细胞含以 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区的转化事件，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC NO:P201506，保藏日期：2015 年 4 月 27 日，保藏地址：中国武汉武汉大学，邮编 430072。

9、一种含权利要求 1 所述玉米转化事件的植物细胞，其特征在于所述植物细胞含以 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列为外源基因的左侧翼区，以 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列为外源基因的右侧翼区的转化事件，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC NO: P201607，保藏日期：2016 年 4 月 11 日，保藏地址：中国武汉武汉大学，邮编 430072。

10、一种权利要求 1 所述玉米转化事件在制备抗虫抗草甘膦玉米细胞中的应用，其特征在于所述方法为：利用含有所述玉米转化事件的玉米材料与玉米育种材料进行杂交后，进一步进行回交，获得所述抗虫抗草甘膦玉米细胞。

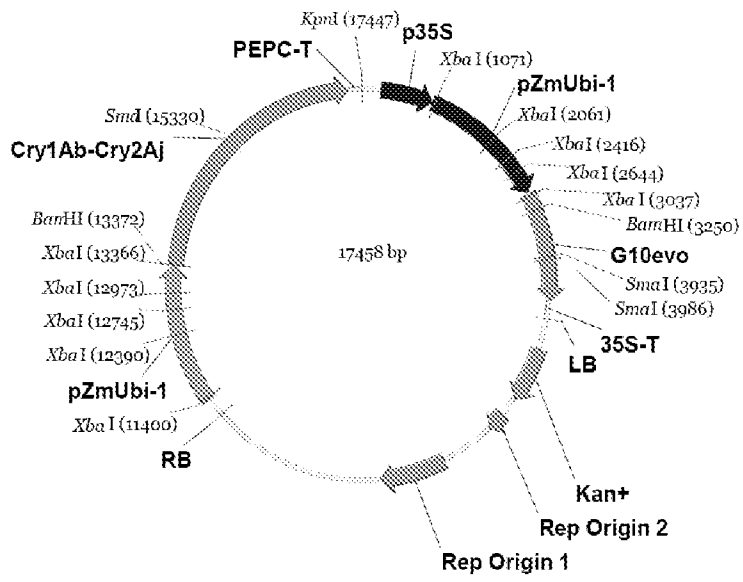


图 1

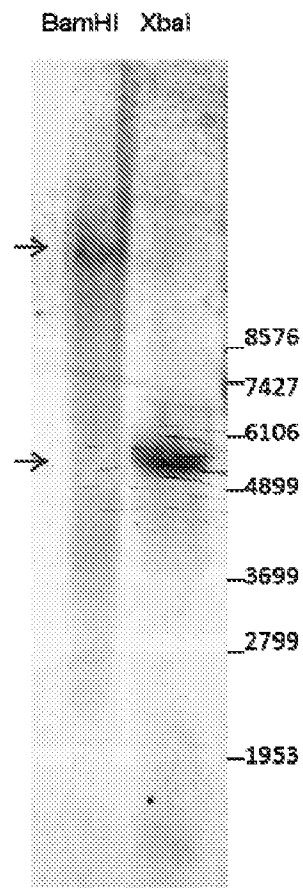


图 2

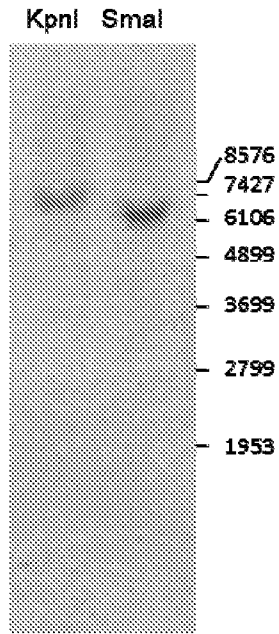


图 3

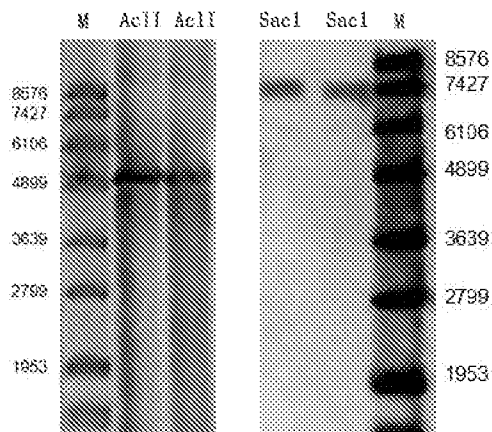


图 4

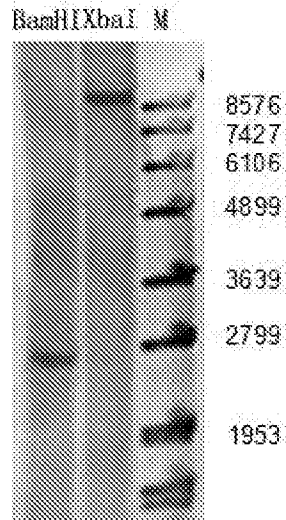


图 5

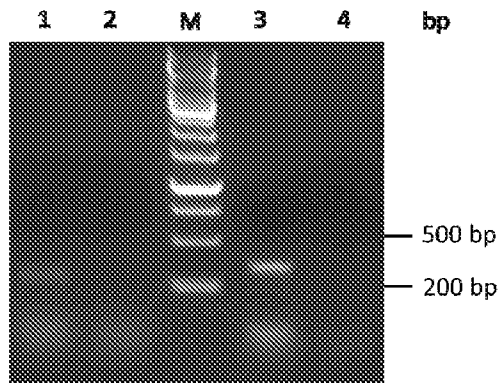


图 6

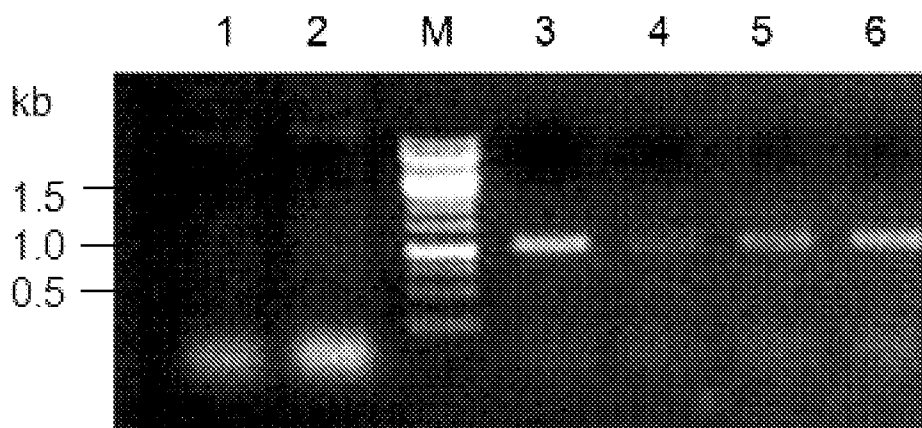


图 7

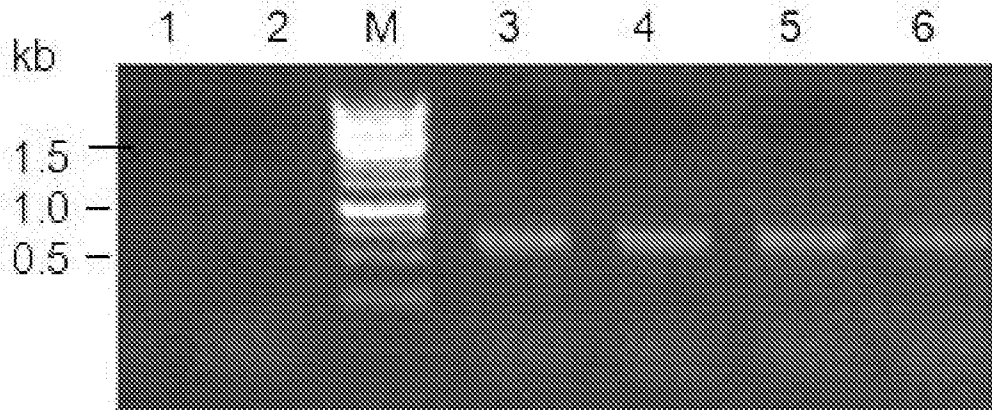


图 8

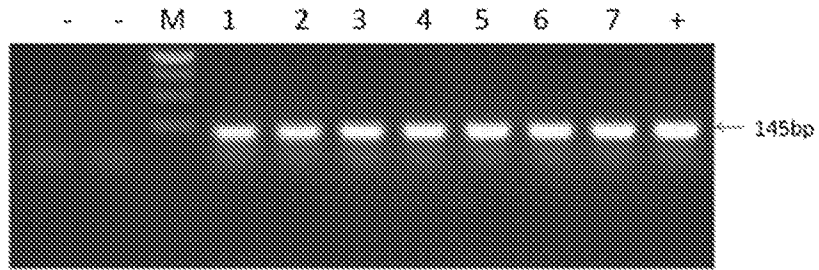


图 9

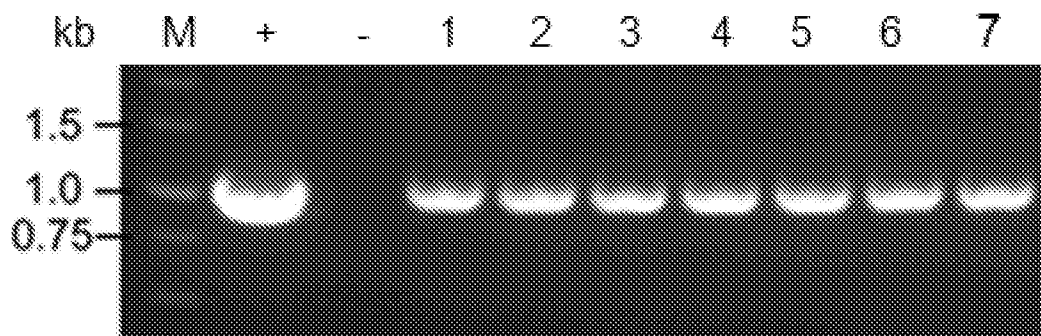


图 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/082025**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11 (2006.01) i; C12N 15/82 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; C12N 5/14 (2006.01) i; A01H 5/00 (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

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: HANGZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; ZHEJIANG UNIVERSITY; SHEN, Zhicheng; LIN, Chaoyang; ZHANG, Xianwen; XU, Xiaoli; insect-resistant gene, glyphosate resistance gene, herbicide, corn, Zea mays, cry1Ab, cry2Aj, promoter, terminator, polyubiquitin-1, pZmUbi-1, carboxylase, pepc, Cauliflower Mosaic Virus, CaMV, cauliflower mosaic, SEQ ID NOs. 1-28, G10evo, EPSPS, transformation event, transform event, insect-resistant, glyphosate-resistant, insect resistance, glyphosate resistance

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104946631 A (HANGZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 30 September 2015 (30.09.2015), claims 1-9, and embodiments 1-5	1-10
PX	CN 105002180 A (HANGZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 28 October 2015 (28.10.2015), claims 1-7, and embodiments 1-4	1-10
PX	CN 105200067 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 30 December 2015 (30.12.2015), claims 1-7, and embodiments 1-3	1-10
X	CHANG, Xue et al., "Evaluation of Transgenic cry1Ab/cry2A maize for its resistance to Ostrinia Furnacalis", JOURNAL OF PLANT PROTECTION, vol. 40, no. 4, 31 August 2013 (31.08.2013), pages 339-344	1-10
X	JIN, Dan, "Selection and Molecular Detection for the High Expression Strains from Transgenic Maize Events Carrying Fusion Bt Cry Toxin Gene and Cp4-EPSPS Glyphosate Resistance Gene", CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, vol. S1, 15 December 2013 (15.12.2013), D047-9	1-10

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>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
31 July 2016 (31.07.2016)

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  
**LI, Juanjuan**  
Telephone No.: (86-10) **82246978**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2016/082025****C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102321640 A (HANGZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 18 January 2012 (18.01.2012), the whole document	1-10
A	CN 102031266 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 27 April 2011 (27.04.2011), the whole document	1-10
A	CN 103266132 A (BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE, CAAS), 28 August 2013 (28.08.2013), the whole document	1-10
A	CN 102146371 A (HANGZHOU RUIFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 10 August 2011 (10.08.2011), the whole document	1-10
A	WO 2013014241 A1 (GENECTFVE), 31 January 2013 (31.01.2013), the whole document	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2016/082025**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104946631 A	30 September 2015	None	
CN 105002180 A	28 October 2015	None	
CN 105200067 A	30 December 2015	None	
CN 102321640 A	18 January 2012	CN 102321640 B	07 August 2013
CN 102031266 A	27 April 2011	CN 102031266 B	01 May 2013
CN 103266132 A	28 August 2013	CN 103266132 B	19 August 2015
CN 102146371 A	10 August 2011	CN 102146371 B	07 August 2013
		WO 2012097720 A1	26 July 2012
		US 2014298533 A1	02 October 2014
WO 2013014241 A1	31 January 2013	AR 087361 A1	19 March 2014
		AP 201407452 D0	28 February 2014
		CN 103827305 A	28 May 2014
		US 2014325697 A1	30 October 2014
		EA 201490301 A1	30 May 2014
		MX 2014001072 A	25 September 2014
		MD 20140016 A2	31 July 2014
		CA 2842833 A1	31 January 2013
		CL 2014000206 A1	11 July 2014
		EP 2737067 A1	04 June 2014



<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i; C12N 5/14(2006.01)i; A01H 5/00(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</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>WPI, EPODOC, CNPAT, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 杭州瑞丰生物科技有限公司, 浙江大学, 沈志成, 林朝阳, 张先文, 徐晓丽, 转化事件, 抗虫基因, 抗草甘膦基因, 除草剂, 玉米, Zea mays, cry1Ab, cry2Aj, 启动子, 终止子, polyubiquitin-1, pZmUbi-1, carboxylase, pepc, Cauliflower Mosaic Virus, CaMV, 花椰菜花斑病, SEQ ID NO.1-28, G10evo, EPSPS, transformation event, transform event, insect-resistant, glyphosate-resistant, insect resistance, glyphosate resistance</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 104946631 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30) 权利要求1-9, 实施例1-5</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105002180 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求1-7, 实施例1-4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105200067 A (浙江大学) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 权利要求1-7, 实施例1-3</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>常雪等. "转cry1Ab/cry2Aj玉米对亚洲玉米螟的抗性评价." 植物保护学报., 第40卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第339-344页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>金丹. "转Bt融合抗虫蛋白基因和Cp4-EPSPS抗草甘膦基因玉米转化事件中高表达株系的筛选及分子检测." 中国优秀硕士学位论文全文数据库., 第S1期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), D047-9</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 104946631 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30) 权利要求1-9, 实施例1-5	1-10	PX	CN 105002180 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求1-7, 实施例1-4	1-10	PX	CN 105200067 A (浙江大学) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 权利要求1-7, 实施例1-3	1-10	X	常雪等. "转cry1Ab/cry2Aj玉米对亚洲玉米螟的抗性评价." 植物保护学报., 第40卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第339-344页	1-10	X	金丹. "转Bt融合抗虫蛋白基因和Cp4-EPSPS抗草甘膦基因玉米转化事件中高表达株系的筛选及分子检测." 中国优秀硕士学位论文全文数据库., 第S1期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), D047-9	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 104946631 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30) 权利要求1-9, 实施例1-5	1-10																		
PX	CN 105002180 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求1-7, 实施例1-4	1-10																		
PX	CN 105200067 A (浙江大学) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 权利要求1-7, 实施例1-3	1-10																		
X	常雪等. "转cry1Ab/cry2Aj玉米对亚洲玉米螟的抗性评价." 植物保护学报., 第40卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第339-344页	1-10																		
X	金丹. "转Bt融合抗虫蛋白基因和Cp4-EPSPS抗草甘膦基因玉米转化事件中高表达株系的筛选及分子检测." 中国优秀硕士学位论文全文数据库., 第S1期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), D047-9	1-10																		
<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>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 7月 31日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 8月 10日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李娟娟</p> <p>电话号码 (86-10)82246978</p>																		

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
A	CN 102321640 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 全文	1-10
A	CN 102031266 A (浙江大学) 2011年 4月 27日 (2011 - 04 - 27) 全文	1-10
A	CN 103266132 A (中国农业科学院生物技术研究所) 2013年 8月 28日 (2013 - 08 - 28) 全文	1-10
A	CN 102146371 A (杭州瑞丰生物科技有限公司) 2011年 8月 10日 (2011 - 08 - 10) 全文	1-10
A	WO 2013014241 A1 (GENECTIVE) 2013年 1月 31日 (2013 - 01 - 31) 全文	1-10

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/082025

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	104946631	A	2015年 9月 30日	无	
CN	105002180	A	2015年 10月 28日	无	
CN	105200067	A	2015年 12月 30日	无	
CN	102321640	A	2012年 1月 18日	CN	102321640 B 2013年 8月 7日
CN	102031266	A	2011年 4月 27日	CN	102031266 B 2013年 5月 1日
CN	103266132	A	2013年 8月 28日	CN	103266132 B 2015年 8月 19日
CN	102146371	A	2011年 8月 10日	CN	102146371 B 2013年 8月 7日
				WO	2012097720 A1 2012年 7月 26日
				US	2014298533 A1 2014年 10月 2日
WO	2013014241	A1	2013年 1月 31日	AR	087361 A1 2014年 3月 19日
				AP	201407452 D0 2014年 2月 28日
				CN	103827305 A 2014年 5月 28日
				US	2014325697 A1 2014年 10月 30日
				EA	201490301 A1 2014年 5月 30日
				MX	2014001072 A 2014年 9月 25日
				MD	20140016 A2 2014年 7月 31日
				CA	2842833 A1 2013年 1月 31日
				CL	2014000206 A1 2014年 7月 11日
				EP	2737067 A1 2014年 6月 4日