

(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
2020年10月15日(15.10.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/207125 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6895 (2018.01) *A01H 1/02* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 6/46* (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/076208
- (22) 国际申请日: 2020年2月21日(21.02.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910280088.X 2019年4月9日(09.04.2019) CN
- (71) 申请人: 北京大北农生物技术有限公司(BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院原子能利用研究所49号楼, Beijing 100193 (CN).

(72) 发明人: 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北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。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北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。王诚(WANG, Cheng); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。王利君(WANG, Lijun); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。李风(LI, Feng); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。张良君(ZHANG, Liangjun); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10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北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。鲍晓明(BAO, Xiaoming); 中国北

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE FOR DETECTING MAIZE PLANT DBN9501 AND DETECTION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 用于检测玉米植物DBN9501的核酸序列及其检测方法

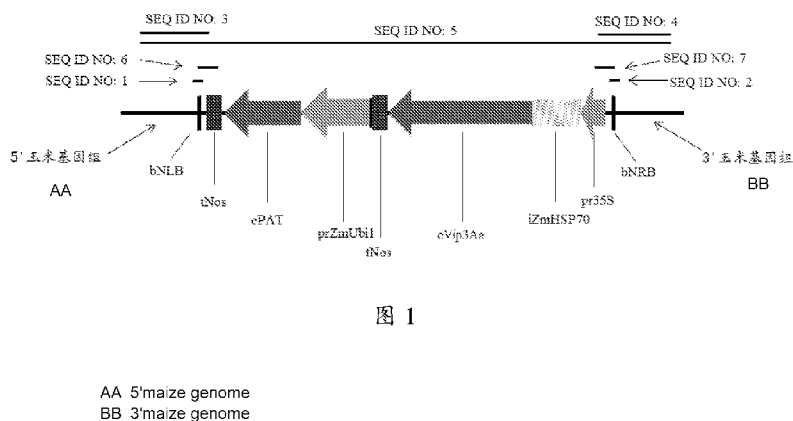


图 1

(57) Abstract: Provided are a nucleic acid sequence for detecting a genetically modified maize event DBN9501 and a detection method therefor, the nucleic acid sequence comprising SEQ ID NO: 1 or a complementary sequence thereof, or SEQ ID NO: 2 or a complementary sequence thereof. Also provided are a method for preparing a maize plant that is resistant to insects and/or tolerant to glufosinate-ammonium herbicide, a method for cultivating a maize plant that is resistant to insects and/or tolerant to glufosinate-ammonium herbicide, and a method for protecting a maize plant from damage caused by herbicides or for controlling weeds in the field in which a maize plant is grown, the genome of the maize plant comprising nucleic acid sequences shown in SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO: 2, nucleic acid sequences shown in SEQ ID NO: 3 and/or SEQ ID NO: 4 or a nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO: 5.



WO 2020/207125 A1

京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院
北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.);
中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦
B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于
生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和
48. 2(a) (viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5. 2(a))。

(57) 摘要: 提供一种用于检测转基因玉米事件DBN9501的核酸序列及其检测方法, 该核酸序列包括
SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:2或其互补序列。还提供了一种制备对昆虫具有抗性和/或对
草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法, 一种培养对昆虫具有抗性和/或耐受草铵膦除草剂
的玉米植株的方法, 和一种保护玉米植物免受由除草剂引起的损伤或控制种植玉米植株的大田中
杂草的方法, 其中该玉米植株的基因组中包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2所示的核酸序列、SEQ
ID NO:3和/或SEQ ID NO:4所示的核酸序列或SEQ ID NO:5所示的核酸序列。

用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法

技术领域

5 本发明涉及植物分子生物学领域，特别是农业生物技术研究中的转基因农作物育种领域。具体地，本发明涉及昆虫抗性和草铵膦除草剂耐受性的转基因玉米事件 DBN9501 和用于检测生物样品中是否包含特定转基因玉米事件 DBN9501 的核酸序列及其检测方法。

背景技术

10 玉米 (*Zea mays L.*) 在世界上很多地区都是主要的粮食作物。生物技术已经应用于玉米以改善其农艺性状和品质。在玉米生产中昆虫抗性是一项重要的农艺性状，特别是对鳞翅目昆虫的抗性，例如玉米螟、棉铃虫、小地老虎等。玉米对鳞翅目昆虫的抗性可以通过转基因的方法使鳞翅目昆虫的抗性基因在玉米植物中表达而获得。另一个重要的农艺性状是除草剂耐受性，如已有成功的玉米转化事件 NK603、GA21 等，美国等玉米主要种植区域已广泛种植。值得一提的是，草铵膦除草剂与草甘膦除草剂的作用机理不同，其为灭生性的触杀型除草剂，且可以作为一种有效管理草甘膦抗性杂草的手段。玉米对草铵膦除草剂的耐受性可以通过转基因的方法使草铵膦除草剂耐受型基因（如 *pat*）在玉米植物中表达而获得。

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式不一致。因此，通常需要产生成百上千个不同的事件并从这些事件中筛选出具有以商业化为目的所预期的转基因表达量和表达模式的单一事件。具有预期的转基因表达量和表达模式的事件可用于采用常规育种方法通过有性异型杂交将转基因渗入到其他遗传背景中。通过这种杂交方式产生的后代保持了原始转化体的转基因表达特征。应用这种策略模式可以确保在许多品种中具有可靠的基因表达，而这些品种能很好的适应当地的生长条件。

30 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，具体地说是包含于插入序列的第一引物和包含于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玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法，转基因玉米事件 DBN9501 对昆虫具有较好的抗性并对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转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 分子。

为实现上述目的，本发明提供了一种核酸序列，具有 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 1-384 位中至少 11 个连续的核苷酸、和 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 385-768 位中至少 11 个连续的核苷酸；和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 1-564 位中至少 11 个连续的核苷酸、和 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 565-1339 位中至少 11 个连续的核苷酸。

优选地，所述核酸序列具有 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 1-384 位中 22-25 个连续的核苷酸、和 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 385-768 位中 22-25 个连续的核苷酸；和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 1-564 位中 22-25 个连续的核苷酸、和 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 565-1339 位中 22-25 个连续的核苷酸。

优选地，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。

所述 SEQ ID NO:1 或其互补序列为转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 的存在。所述 SEQ ID NO:2 或其互补序列为转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 的存在。

优选地,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。

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 T-DNA 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于或互补于包含完整的所述 SEQ ID NO:1 的
10 所述 SEQ ID NO:3 的一部分。当第一核酸序列和第二核酸序列一起使用时,这些核酸序列可作为 DNA 引物对用于产生扩增产物的 DNA 扩增方法中。使用 DNA 引物对在 DNA 扩增方法中产生的扩增产物是包括 SEQ ID NO:1 的扩增产物时,可以诊断转基因玉米事件 DBN9501 或其后代的存在。所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列为转基因玉米事件 DBN9501 中在 T-DNA 插入
15 序列的 5'末端位于插入接合部位附近的一个长度为 768 个核苷酸的序列,所述 SEQ ID NO:3 或其互补序列由 384 个核苷酸的玉米基因组 5'侧翼序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸第 1-384 位)、168 个核苷酸的 DBN10707 构建体 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸第 385-552 位)和 216 个核苷酸的 tNos (胭脂碱合成酶)转录终止子的 DNA 序列 (SEQ ID NO:3 的核苷酸第
20 553-768 位)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 DBN9501 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 T-DNA 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
25 分的至少 11 个或更多个连续多核苷酸(第四核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或互补于包含完整的所述 SEQ ID NO:2 的所述 SEQ ID NO:4 的一部分。当第三核酸序列和第四核酸序列一起使用时,这些核酸序列可作为 DNA 引物对用于产生扩增产物的 DNA 扩增方法中。使用 DNA 引物对在 DNA 扩增方法中产生的扩增产物是包括 SEQ ID NO:2 的扩增产物
30 时,可以诊断转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 中在插入序列的 3'末端位于 T-DNA 插入接合部位附近的一个长度为 1339 个核苷酸的序列,所述 SEQ ID NO:4 或其互补序列由 271 个核苷酸的 pr35S 转录起始序列 (SEQ ID NO:4 的核苷酸第 1-271 位)、293 个核苷酸的 DBN10707 构建体 DNA 序列 (SEQ
35 ID NO:4 的核苷酸第 272-564 位)和 775 个核苷酸的玉米基因组 3'侧翼序列 (SEQ ID NO:4 的核苷酸第 565-1339 位)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 DBN9501 的存在。

进一步地，所述核酸序列包含 SEQ ID NO:5 或其互补序列。

所述 SEQ ID NO:5 或其互补序列为表征转基因玉米事件 DBN9501 的长度为 8559 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。

5 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 DBN9501 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	384	1-384
LB	168	385-552
tNos	253	553-805
cPAT	552	812-1363
prZmUbi1	1993	1370-3362
tNos	253	3418-3670
cVip3Aa19	2370	3671-6040
iZmHSP70	806	6047-6852
pr35S	639	6853-7491
RB	293	7492-7784
3'基因组	775	7785-8559

本领域技术人员熟知的，第一、第二、第三和第四核酸序列不必仅仅由 DNA 组成，也可包括 RNA、DNA 和 RNA 的混合物，或者 DNA、RNA 或其它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
10 明中所述探针或引物应该是至少大约 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个连续核苷酸的长度，其可以选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中所述的核苷酸。当选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸时，所述
15 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。

所述核酸序列或其互补序列可用于 DNA 扩增方法中以产生扩增子，所述扩增子用于检测生物样品中转基因玉米事件 DBN9501 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方法中，以检测生物样品中转基因玉米事件 DBN9501 或其后代的存在。

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 DBN9501 的 DNA 存在的方法，包括：

使待检测样品与用于扩增目标扩增产物的至少两种引物在核酸扩增反应中接触；

进行核酸扩增反应；和
检测所述目标扩增产物的存在；
所述目标扩增产物包含所述核酸序列。

5 优选地，所述目标扩增产物包含 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/或 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

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:1、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10；所述第二引物选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11。

10 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 DBN9501 的 DNA 存在的方法，包括：

使待检测样品与探针接触，所述探针包含所述核酸序列；
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。

15 所述严格条件可为在 6×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。

20 优选地，所述探针包含 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/或 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

可选地，至少一个所述探针用至少一种荧光基团标记。

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 DBN9501 的 DNA 存在的方法，包括：

25 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所述核酸序列；

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；

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昆虫抗性和/或除草剂耐受性与标记物核酸分子在遗传学上是连锁的。

30 优选地，所述标记物核酸分子包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:6-11 或其互补序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种 DNA 检测试剂盒，包括至少一个 DNA 分子，所述 DNA 分子包含所述核酸序列，其可以作为对于转基因玉米事件 DBN9501 或其后代具有特异性的 DNA 引物之一或探针。

35 优选地，所述 DNA 分子包含 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/或 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植物细胞，包含编码昆虫抗性 Vip3Aa 蛋白的核酸序列、编码草铵膦除草剂耐受性 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 和/或 SEQ ID NO:7 所示的序列。

优选地，所述植物细胞包含编码昆虫抗性 Vip3Aa 蛋白的核酸序列、编码草铵膦除草剂耐受性 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:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

优选地，所述植物细胞依次包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5 第 553-7491 位核酸序列和 SEQ ID NO:2，或者包含 SEQ ID NO:5 所示的序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种保护玉米植物免于昆虫侵袭的方法，包括在靶昆虫的膳食中提供至少一种转基因玉米植物细胞，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中包含 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列，摄食所述转基因玉米植物细胞的靶昆虫被抑制进一步摄食所述转基因玉米植物。

优选地，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中包含 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

优选地，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中依次包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5 第 553-7491 位核酸序列和 SEQ ID NO:2，或者包含 SEQ ID NO:5。

为实现上述目的，本发明还提供了一种保护玉米植物免受由除草剂引起的损伤或控制种植玉米植物的大田中杂草的方法，包括将含有有效剂量草铵膦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 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列，所述转基因玉米植物对草铵膦除草剂具有耐受性。

优选地，所述转基因玉米植物在其基因组中包含 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

优选地，所述转基因玉米植物在其基因组中依次包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5 第 553-7491 位核酸序列和 SEQ ID NO:2，或者包含 SEQ ID NO:5 所示的序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种培养对昆虫具有抗性和/或耐受草铵膦除草剂的玉米植物的方法，包括：

种植至少一粒玉米种子，所述玉米种子的基因组中包含编码昆虫抗性 Vip3Aa 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦除草剂耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、和特定区域的核酸序列，或者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；

用靶昆虫侵袭所述玉米植株和/或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；

5 所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列；优选地，所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种产生对昆虫具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法，包括将第一玉米植物基因组中包含的编码昆虫抗性 Vip3Aa 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、和特定区域的核酸序列，或者将所述第一玉米植物基因组中包含的 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列，引入第二玉米植物，从而产生大量子代植株；选择具有所述特定区域的核酸序列的所述子代植株，且所述子代植株对昆虫具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性；
10 所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列；优选地，所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

优选地，所述方法包括将转基因玉米事件 DBN9501 与缺少昆虫抗性和/或草铵膦耐受性的玉米植株进行有性杂交，从而产生大量子代植株，选择具有所述特定区域的核酸序列的所述子代植株；所述特定区域的核酸序列包含 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列；优选地，所述特定区域的核酸序列包含 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种产生自转基因玉米事件 DBN9501 的农产品或商品，所述农产品或商品为玉米粗粉、玉米面、玉米油、玉米穗丝、玉米淀粉、玉米面筋、玉米饼、化妆品或填充剂。

在本发明用于检测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。

30 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。

所述“包含”、“包含”或“含有”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、
35 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。

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 DNA”亦称“侧翼区”或“侧翼序列”或“侧翼基因组序列”或“侧翼基因组 DNA”，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“3'侧翼”或“右边界侧翼”等。当该侧翼区位于上游时，其也可以称为“5'侧翼”或“左边界侧翼”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。“接合区域”或“接合序列”是指包含接合点的 DNA。

本发明提供了称为 DBN9501 的转基因玉米事件及其后代，所述转基因玉米事件 DBN9501 亦称为玉米植物 DBN9501，其包括转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 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 DBN9501 的产物，例如玉米粗粉、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 DBN9501 包含了一个 DNA 构建体，当其在植物细胞内表达时，所述转基因玉米事件 DBN9501 获得对昆虫的抗性和对草

铵磷除草剂的耐受性。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 Vip3Aa19 蛋白的核酸序列，所述 Vip3Aa19 蛋白的核酸序列主要对鳞翅目昆虫具有抗性。第二个表达盒包含用于在植物中表达的适合的启动子和适合的多聚腺苷酸化信号序列，所述启动子可操作地连接编码麟丝菌素 N-乙酰基转移酶（phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT）的基因，所述 PAT 蛋白的核酸序列对草铵磷除草剂具有耐受性。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、泛素蛋白（Ubiquitin）启动子、肌动蛋白（Actin）启动子、土壤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）胭脂碱合成酶（NOS）启动子、章鱼碱合成酶（OCS）启动子、夜香树属（*Cestrum*）黄叶卷曲病毒启动子、马铃薯块茎储藏蛋白（Patatin）启动子、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶（RuBisCO）启动子、谷胱甘肽硫转移酶（GST）启动子、E9 启动子、GOS 启动子、alcA/alcR 启动子、毛根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）RolD 启动子和拟南芥属（*Arabidopsis thaliana*）Suc2 启动子。所述多聚腺苷酸化信号序列可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列，所述适合多聚腺苷酸化信号序列包括但不限于，来源于土壤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）胭脂碱合成酶（NOS）基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于花椰菜花叶病毒（CaMV）35S 终止子、来源于蛋白酶抑制剂 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。所述增强子可以加强基因的表达水平，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 Vip3Aa19 蛋白和/或 PAT 蛋白转运到细胞外或者细胞内特定的细胞器或区室，例如，利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体，或者利用‘KDEL’保留序列靶向内质网。

所述 Vip3Aa19 基因可以从苏云金芽胞杆菌（*Bacillus thuringiensis*，简称 Bt）中分离得到的，且可以通过优化密码子或者以其它方式改变 Vip3Aa19 基因的核苷酸序列，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“鳞翅目（*Lepidoptera*）”，包括蛾、蝶两类昆虫，是农林害虫最多的一个目，如小地老虎、棉铃虫、斜纹夜蛾、二点委夜蛾、桃蛀螟等。

所述麟丝菌素 N-乙酰基转移酶（PAT）基因可以从链霉菌

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

所述“草铵膦”又名草丁膦, 是指 2-氨基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸铵, 用“草铵膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草铵膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂处理包含了来源于转基因玉米事件 DBN9501 的植物材料的田地, 将控制所述田地中的杂草生长, 并且不影响来源于转基因玉米事件 DBN9501 的植物材料的生长或产量。

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

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

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

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

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

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

转基因“事件”是通过用异源 DNA 构建体转化植物细胞而得到的, 即包括至少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”是指含有异源 DNA 的原始转化体和该转化体的后代。术语“事件”还指原始转化体和含有异源 DNA 的其它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，来自于原始转化体亲本的插入 DNA 和侧翼基因组 DNA 也存在于杂交后代中的同一染色体位置。术语“事件”还指来自原始转化体的 DNA 序列，该 DNA 序列包含插入 DNA 和与插入 DNA 紧密相邻的侧翼基因组序列，该 DNA 序列被预期转移到子代中，该子代由含有插入 DNA 的亲本系（例如原始转化体和其自交产生的子代）与不含有插入 DNA 的亲本系进行有性杂交而产生，且该子代接受了包含目标基因的插入 DNA。

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

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

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

培养对鳞翅目昆虫具有抗性且对草铵膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件 DBN9501，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 DBN9501 及其后代的玉米植物组成，该转基因玉米事件 DBN9501 及其后代是通过利用本发明的对鳞翅目昆虫具有抗性且对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鳞翅目昆虫的抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性；然后选择对鳞翅目昆虫的侵袭具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性的子代植株，可以培育出对鳞翅目昆虫具有抗性且对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鳞翅目昆虫抗性和/或草铵膦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，然后通过用

鳞翅目昆虫侵袭、草铵膦除草剂施加或通过与性状相关的分子标记物（如包含转基因玉米事件 DBN9501 中插入序列的 5'端和 3'端鉴定出的接合位点的 DNA 分子）的鉴定来选择子代，从而产生对鳞翅目昆虫具有抗性且对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植物。

5 还应理解的是，两种不同的转基因植物也可以交配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。

10 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 DBN9501 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 DBN9501 或种子还是来源于转基因玉米事件 DBN9501 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
15 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
20 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。

25 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。

30 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 DBN9501 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序列，所述 DNA 分子的片段可以用作引物或探针。

35 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 DBN9501 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。

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×SSC、50°C 到高度严格条件的约 0.2×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×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，“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 DBN9501 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 DBN9501，或玉米提取物，例如粗粉、面或油是否包含转基因玉米事件 DBN9501，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 DBN9501 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 DBN9501 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 50 个核苷酸碱基对，更优选加上约 250 个核苷酸碱基对，最优选加上约 450 个核苷酸碱基对或更多。

可选的，引物对可以来源于插入 DNA 两侧的侧翼基因组序列，以产生包括整个插入核苷酸序列的扩增子。来源于植物基因组序列的引物对中的一个可以位于距插入 DNA 序列一定距离处，该距离的范围可以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 热扩增反应中形成的引物二聚体。

核酸扩增反应可以通过本领域已知的任何一种核酸扩增反应方法实现，包括聚合酶链式反应（PCR）。各种核酸扩增方法已是本领域技术人员所熟知的。PCR 扩增方法已经发展到可扩增多达 22 kb 的基因组 DNA 和多达 42 kb 的噬菌体 DNA。这些方法以及本领域的其他 DNA 扩增方法可以用于本发明。插入的外源 DNA 序列和来自转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 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 检测试剂盒含有用作引物的 DNA 分子，它们在适当的反应条件下特异性杂交到目标 DNA 上并扩增诊断性扩增子。试剂盒可提供基于琼脂糖凝胶的检测方法或者现有技术已知的检测诊断性扩增子的许多方法。含有与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的玉米基因组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 DBN9501 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 引物的其它 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。其中一个方法是遗传点分析 (Genetic Bit Analysis), 该方法设计了一个跨越插入 DNA 序列和相邻的侧翼基因组 DNA 序列的 DNA 寡核苷酸链。将该寡核苷酸链固定在一个微孔板的微孔内, 在对目标区域进行 PCR 扩增后 (在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物), 单链 PCR 产物可与固定的寡核苷酸链进行杂交, 并且作为单碱基延伸反应的模板, 该延伸反应使用了 DNA 聚合酶和为下一个预期的碱基特定标记的 ddNTPs。可以通过荧光或 ELISA 类方法得到结果。信号代表了插入/侧翼序列的存在, 其说明扩增、杂交和单碱基延伸反应是成功的。

15 另一种方法是焦磷酸测序技术 (Pyrosequencing)。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'-磷硫酸盐和荧光素一起进行温育。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。

30 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。现简要说明如下, 设计一个跨越插入 DNA 序列和相邻的基因组侧翼结合部位的 FRET 寡核苷酸探针。该 FRET 探针和 PCR 引物 (在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物) 在热稳定聚合酶和 dNTPs 存在下进行循环反应。FRET 探针的杂交导致 FRET 探针上荧光部分和淬灭部分的分裂以及荧光部分的释放。荧光信号的产生代表了插入/侧翼序列的存在, 其说明扩增和杂交是成功的。

基于杂交原理,用于检测来源于转基因玉米事件 DBN9501 的植物材料的适合技术还可以包括 Southern 印迹杂交 (Southern blot)、Northern 印迹杂交 (Northern blot) 和原位杂交 (in situ hybridization)。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。

Tyangi 等 (自然生物技术 (Nature 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。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。

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

可以使用本发明所述的组合物和 DNA 检测领域描述的或已知的方法来开发 DNA 检测试剂盒。所述试剂盒有利于鉴定样品中是否存在转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA,还可以用于培育含有转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 的玉米植物。所述试剂盒可以含有 DNA 引物或探针,其同源或互补于 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 5 的至少一部分,或含有其它 DNA 引物或探针,其同源或互补于 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 DBN9501 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玉米泛素基因 1 启动子 (prZmUbi1),可操作地连接到链霉菌的草铵膦耐受性的腓丝菌素 N-乙酰基转移酶 (cPAT) 上,并可操作地连接到胭脂碱合酶的转录终止子 (tNos) 上而组成,第二个表达盒由含有增强子区域的串联重复的花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (pr35S),可操作地连接到玉米热休克 70 kDa 蛋白内含子 (iZmHSP70) 上,可操作地连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的 Vip3Aa19 蛋白 (cVip3Aa19) 上,并可操

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 DBN9501 侧翼基因组区域 (SEQ ID NO:5)。在 DNA 扩增方法中, 作为引物的 DNA 分子可以是来源于转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 的玉米基因组侧翼 DNA 序列的任何部分。

转基因玉米事件 DBN9501 可以与其他转基因玉米品种组合, 例如除草剂 (如草甘膦、麦草畏等) 耐受性的转基因玉米品种, 或携带其他抗虫基因的转基因玉米品种。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 DBN9501 一起育种, 可以提供抗多种虫害并抗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。

本发明转基因玉米事件 DBN9501 是对鳞翅目害虫的摄食损伤有抗性的, 并且耐受含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苏云金芽孢杆菌的 Vip3Aa19 蛋白, 其提供了对鳞翅目害虫 (如小地老虎) 摄食损伤的抗性, 并表达链霉菌的草铵膦抗性的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (PAT) 蛋白, 其赋予植物对草铵膦的耐受性。双重性状玉米具有如下优点: 1) 免受由于鳞翅目害虫 (如小地老虎、棉铃虫等) 造成的经济损失, 小地老虎、棉铃虫等是玉米种植区的主要害虫; 2) 施加含草铵膦的农业除草剂给玉米作物用于广谱杂草控制的能力; 3) 玉米产量没有降低。此外, 编码昆虫抗性和草铵膦耐受性性状的转基因连锁在同一 DNA 区段上, 并且存在于转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 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 DBN9501 的植物材料的存在。

序列简述

SEQ ID NO:1 转基因玉米事件 DBN9501 中在插入序列 5'末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列, 其中第 1-11 位核苷酸和第 12-22 为核苷酸分别位于玉米基因组上插入位点的两侧;

SEQ ID NO:2 转基因玉米事件 DBN9501 中在插入序列 3'末端位于插入接合部位附近的一个长度为 22 个核苷酸的序列, 其中第 1-11 位核苷酸和第 12-22 为核苷酸分别位于玉米基因组上插入

- 位点的两侧;
- SEQ ID NO:3 转基因玉米事件 DBN9501 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 768 个核苷酸的序列;
- SEQ ID NO:4 转基因玉米事件 DBN9501 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 1339 个核苷酸的序列;
- 5 SEQ ID NO:5 整个 T-DNA 序列、5'和 3'末端的玉米基因组侧翼序列;
- SEQ ID NO:6 位于 SEQ ID NO:3 上的序列,跨越了左侧边界区域(LB)和 tNos 转录终止序列;
- SEQ ID NO:7 位于 SEQ ID NO:4 上的序列,跨越了 pr35S 转录起始序列和右侧边界区域(RB);
- 10 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;
- 15 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;
- 20 SEQ ID NO:16 Taqman 检测 *Vip3Aa19* 基因的第一引物;
- SEQ ID NO:17 Taqman 检测 *Vip3Aa19* 基因的第二引物;
- SEQ ID NO:18 Taqman 检测 *Vip3Aa19* 基因的探针;
- SEQ ID NO:19 Taqman 检测 *pat* 基因的第一引物;
- SEQ ID NO:20 Taqman 检测 *pat* 基因的第二引物;
- 25 SEQ ID NO:21 Taqman 检测 *pat* 基因的探针;
- SEQ ID NO:22 玉米内源基因 *SSIb* 的第一引物;
- SEQ ID NO:23 玉米内源基因 *SSIb* 的第二引物;
- SEQ ID NO:24 Southern 杂交检测中 *Vip3Aa19* 基因的探针;
- SEQ ID NO:25 Southern 杂交检测中 *pat* 基因的探针;
- 30 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;
- 35 SEQ ID NO:29 位于 T-DNA 上的引物,与 SEQ ID NO:15 方向一致;
- SEQ ID NO:30 位于 T-DNA 上的引物,与 SEQ ID NO:15 方向相反,用作

获得侧翼序列；

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

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

5

附图说明

图 1 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 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，以及用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列相对位置的示意图（相对位置示意图参考 B73 RefGen v3）；

10

图 2 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的重组表达载体 DBN10707 的结构示意图；

图 3 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的转基因玉米事件 DBN9501 在小地老虎自然发生条件下的田间效果图；

15

图 4 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的转基因玉米事件 DBN9501 接种棉铃虫的田间效果图；

图 5 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的转基因玉米事件 DBN9501 在斜纹夜蛾自然发生条件下的田间效果图；

20

图 6 为本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的转基因玉米事件 DBN9501 在甜菜夜蛾自然发生条件下的田间效果图。

具体实施方式

下面通过具体实施例进一步说明本发明用于检测玉米植物 DBN9501 的核酸序列及其检测方法的技术方案。

25

第一实施例、克隆与转化

1.1、载体克隆

使用标准基因克隆技术构建重组表达载体 DBN10707（如图 2 所示）。所述载体 DBN10707 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），可操作地连接到玉米热休克 70 kDa 蛋白内含子（iZmHSP70）上，可操作地连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的 Vip3Aa19 蛋白（cVip3Aa19）上，并可操作地连接到胭脂碱合酶的转录终止子（tNos）上而组成；第二个表达盒由含有玉米泛素基因 1 启动子（prZmUbi1），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，并可操作地连接到胭脂碱合酶的转录终止子（tNos）上而组成。

35

将所述载体 DBN10707 用液氮法转化到农杆菌 LBA4404（Invitrogen，

Chicago, USA; Cat.No: 18313-015) 中, 并且以 4-[羟基(甲基)膦酰基]-DL-高丙氨酸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 DBN10707 中的 T-DNA 转入到玉米染色体组中, 以产生转基因玉米事件 DBN9501。

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 *Vip3Aa19* 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、AS 100 mg/L、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-D 1 mg/L、头孢霉素 250 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 150-250 mg/L), 不添加植物转化体的选择剂(步骤 3: 恢复步骤)。优选地, 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(4-[羟基(甲基)膦酰基]-DL-高丙氨酸)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、头孢霉素 250 mg/L、4-[羟基(甲基)膦酰基]-DL-高丙氨酸 10 mg/L、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、头孢霉素 250 mg/L、4-[羟基(甲基)膦酰基]-DL-高丙氨酸 5 mg/L、植物凝胶 3 g/L, pH 5.8) 上, 温度 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、头孢霉素 250 mg/L、吲哚-3-乙酸 1 mg/L、植物凝胶 3 g/L, pH 5.8) 上, 温度 25°C 下培养至约 10 cm 高, 移至温室培养至结实。在温室中, 每天于温度

28℃下培养 16 h, 再于温度 20℃下培养 8 h。

1.3、转基因事件的鉴定和筛选

一共产生 200 个独立转基因 T₀ 单株。

由于遗传转化、基因插入等均可能对玉米植株造成农艺性状上的影响(例如矮粗、叶片丛生、花叶、叶片对生、吐丝散粉异常或结实差等), 因此将上述 200 个独立的转基因 T₀ 单株送入温室移栽并进行培养, 以鉴定转基因 T₀ 单株在不同时期(苗期-拔节期、拔节期-散粉期和灌浆期-成熟期)的农艺性状表现, 共获得 136 个农艺性状表现正常的转基因 T₀ 单株。

通过 TaqMan™ 分析检测上述 136 个转基因玉米植株是否存在单拷贝的 *Vip3Aa19* 和 *pat* 基因, 且不含载体骨架序列, 共获得 83 个转基因 T₀ 单株; 通过转基因插入位点分析, 共筛选到 28 个 T-DNA 两侧序列完整、T-DNA 没有插入到玉米基因组的重要基因中、基因插入没有产生新的开放阅读框(ORF)的转基因 T₀ 单株; 通过对主要靶标昆虫(如小地老虎、棉铃虫、斜纹夜蛾或甜菜夜蛾)的抗性评价和比较, 共筛选到 13 个昆虫抗性良好的转基因 T₀ 单株; 通过对草铵膦除草剂耐受性的评价和比较, 共筛选到 12 个草铵膦除草剂耐受性良好的转基因 T₀ 单株; 在不同世代、不同地理环境和/或不同背景材料的情况下, 通过对转基因玉米植株的农艺性状、分子生物学、靶标昆虫抗性、草铵膦耐受性等是否可稳定遗传进行筛选, 选定了转基因玉米事件 DBN9501 是优异的, 其具有单拷贝转基因(参见第二实施例)、良好的昆虫抗性、草铵膦除草剂耐受性和农艺性状表现(参见第五实施例和第六实施例)。

第二实施例、用 TaqMan 进行转基因玉米事件 DBN9501 检测

取转基因玉米事件 DBN9501 的叶片约 100 mg 作为样品, 用植物 DNA 提取试剂盒(DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen)提取其基因组 DNA, 通过 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法检测 *Vip3Aa19* 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 1、取转基因玉米事件 DBN9501 的叶片(授粉后) 100 mg, 在研钵中用液氮研成匀浆, 每个样品取 3 个重复;

步骤 2、使用植物 DNA 提取试剂盒(DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen)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 3、用超微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo Scientific)测定上述样品的基因组 DNA 浓度;

步骤 4、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 5、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 *Vip3Aa19* 基因序列：

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

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

探针 1: cgacgatggcgtgtatatgcctcttg 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: gaggggtgttggtggtattg 如序列表中 SEQ ID NO:19 所示；

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

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

PCR 反应体系为：

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) 10 μ L

50 \times 引物/探针混合物 1 μ L

基因组 DNA 3 μ L

双蒸水 (ddH₂O) 6 μ L

所述 50 \times 引物/探针混合物包含 1mM 浓度的每种引物各 45 μ L, 100 μ M 浓度的探针 50 μ L 和 860 μ L 1 \times TE 缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0)，并且在 4 $^{\circ}$ C，贮藏在琥珀试管中。

PCR 反应条件为：

步骤	温度	时间
1	95 $^{\circ}$ C	5 min
2	95 $^{\circ}$ C	30 s
3	60 $^{\circ}$ C	1 min
4	回到步骤 2，重复 40 次	

利用快速实时荧光定量 PCR 系统软件 (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System SDS v2.3, Applied Biosystems) 分析数据，结果表明获得的转基因玉米事件 DBN9501 为单拷贝。

第三实施例、分析转基因玉米事件 DBN9501 的插入位点

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 g 转基因玉米事件 DBN9501 的幼嫩叶片在液氮中研磨成粉后，加入 0.5 mL 于温度 65 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 提取 CTAB 缓冲液 (20 g/L CTAB、1.4 M NaCl、100 mM Tris-HCl、20 mM EDTA (乙二胺四乙酸)，用 NaOH 调 pH 至 8.0)，

充分混匀后,于温度 65°C 抽提 90 min;加入 0.5 倍体积苯酚和 0.5 倍体积氯仿,颠倒混匀;12000 rpm (每分钟转数) 转速下离心 10 min;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 min;12000 rpm 转速下再离心 10 min;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 min;真空抽干或在超净台吹干;DNA 沉淀溶解于适量的 TE 缓冲液中,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 ng/ μ L 之间。用限制性内切酶 *Kpn* I (5'端分析) 和 *Spe* I (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 上述限制性内切酶以及 3 μ L 酶切缓冲液(采用的限制性酶均是 NEB 公司的酶及其配套的缓冲液或通用缓冲液,现称 NEBCutSmart), 酶切 1 h。待酶切结束后,向酶切体系中加入 70 μ L 无水乙醇,冰浴 30 min,12000 rpm 转速下离心 7 min,弃上清,吹干,之后加入 8.5 μ L 双蒸水、1 μ L 10 \times T₄-DNA 连接酶缓冲液 (NEB T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 其具体配方可访问 NEB 网站或参考 <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases>、<https://www.neb.com/products/b0202-t4-dna-ligase-reaction-buffer>) 以及 0.5 μ L T₄-DNA 连接酶在温度 4°C 连接过夜。用一系列嵌套引物进行 PCR 扩增分离 5'端和 3'端基因组 DNA。具体的,分离 5'端基因组 DNA 的引物组合包括 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:26 作为第一引物,SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 作为第二引物,SEQ ID NO:13 作为测序引物。分离 3'端基因组 DNA 引物组合包括 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:29 作为第一引物,SEQ ID NO:30 和 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。

上述 PCR 扩增反应所获得的扩增产物在质量分数为 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳以分离 PCR 扩增产物,随后使用胶回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit, 目录#_28704, Qiagen Inc., Valencia, CA) 从琼脂糖基质分离目的片段。然后对纯化的 PCR 扩增产物测序(例如,使用 ABI PrismTM 377, PE Biosystems, Foster City, CA) 并分析(例如,使用 DNASTAR 序列分析软件, DNASTAR Inc., Madison, WI)。

使用标准 PCR 方法确认 5'和 3'侧翼序列和接合序列。5'侧翼序列和接合序列可使用 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'侧翼序列和接合序列可使用 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:14,组合 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:29 来确认。PCR 反应体系和扩增条件如表 2 和表 3 所示。本领域技术

人员将理解，其它引物序列也可用于确认侧翼序列和接合序列。

PCR 扩增产物的 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可用于鉴定来源于转基因玉米事件 DBN9501 的玉米植物或种子。

5 发现在 SEQ ID NO:5 的核苷酸第 1-384 位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件 DBN9501 插入序列的左边界侧翼(5'侧翼序列)，在 SEQ ID NO:5 的核苷酸第 7785-8559 位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件 DBN9501 插入序列的右边界侧翼(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。

10 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 DBN9501 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 DBN9501 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
15 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 DBN9501 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
20 事件 DBN9501 DNA 的存在。所述 SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO:3 的核苷酸 385-574 位)跨越了 DBN10707 构建体 DNA 序列和 tNos 转录终止序列，所述 SEQ ID NO:7 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 252-451 位)跨越了 pr35S 转录起始序列和 DBN10707 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 DBN9501 的诊断性扩增子。
25

具体地，从转基因插入序列的 5'端产生 PCR 扩增产物，该 PCR 扩增产物为包含来源于转基因玉米事件 DBN9501 的植物材料的基因组中侧翼于 T-DNA 插入序列的 5'端的基因组 DNA 的一部分。这个 PCR 扩增产物包含
30 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'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 T-DNA 插入序列中 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'端产生 PCR 扩增产物，该 PCR 扩增产物包含来源于转基因玉米事件 DBN9501 的植物材料的基因组中侧翼于 T-DNA 插入
35 序列的 3'端的基因组 DNA 的一部分。这个 PCR 扩增产物包含 SEQ ID NO:4。为了进行 PCR 扩增，设计位于 T-DNA 插入序列中 pr35S 转录起始

序列的引物 7 (SEQ ID NO:10), 和与之配对的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)。

5 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 DBN9501 的诊断性扩增子。扩增子的检测可以通过使用 Stratagene Robocycler、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700 或 Eppendorf Mastercycler Gradient 热循环仪等进行, 或通过本领域技术人员已知的方法和设备进行。

表 2、用于转基因玉米事件 DBN9501 的 5'端转基因插入物/基因组接合区域鉴定的 PCR 步骤和反应混合物条件

步骤	试剂	数量	备注
1	无核酸酶的水	添加到终体积 20 μ L	
2	10 \times 反应缓冲液 (与 MgCl ₂)	2.0 μ L	1 \times 缓冲液终浓度, 1.5 mM MgCl ₂ 终浓度
3	dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的 10 mM 溶液	0.2 μ L	每种 dNTP 200 μ M 终浓度
4	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浓度 10 μ M	0.2 μ L	0.1 μ M 终浓度
5	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浓度 10 μ M	0.2 μ L	0.1 μ M 终浓度
6	RNase, 无 DNase (500 μ g/mL)	0.1 μ L	50 ng/反应
7	REDTaq® DNA 聚合酶 (1 单位/ μ L)	1.0 μ L (建议在下一步之前转换吸管)	1 单位/反应
8	提取的 DNA (模板): 待分析样品的叶片	200 ng 基因组 DNA	
	阴性对照	50 ng 非转基因玉米基因组 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 DBN9501 的玉米基因组 DNA	

表 3、热循环仪扩增条件

循环数	设置
1	94°C 3 min
34	94°C 30 s
	64°C 30 s
	72°C 1 min
1	72°C 10 min

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。使用表 3 中的循环参数在 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 反应。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度 (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 DBN9501 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 768 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化玉米基因组 DNA 和非 DBN9501 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 DBN9501 基因组 DNA 的 PCR 反应中时，产生 1339 bp 片段的扩增产物，当其用在未转化玉米基因组 DNA 和非 DBN9501 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 DBN9501 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 DBN9501 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 DBN9501 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 5 μ L	
2	2 \times Universal Master Mix (Applied Biosystems 目录号 4304437)	2.5 μ L	1 \times 终浓度
3	引物 9 (SEQ ID NO:12) 和引物 10 (SEQ ID NO:13) 重悬浮于无核酸酶水中到浓度 10	0.05 μ L	0.25 μ M 终浓度

	μM		
4	引物 11 (SEQ ID NO:14) 重悬浮在 1×TE 缓冲液或无核酸酶水中到浓度 10 μM	0.01 μL	0.15 μM 终浓度
5	<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
6	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 DBN9501 的玉米基因组 DNA	

表 5、接合性测定的热循环仪扩增条件

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

使用表 5 中的循环参数在 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 反应。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度 (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 DBN9501 的存在情况的 DNA。或者扩增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 DBN9501 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 (SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:14) 和诊断转基因

玉米事件 DBN9501 DNA 的存在情况的第二扩增子 (SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13)。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 DBN9501 的存在,且该样品由相对于转基因玉米植物 DBN9501 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。

需要说明的是,转基因玉米事件 DBN9501 的引物对被用于产生对转基因玉米事件 DBN9501 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,其作为反应条件的一个内在标准。对转基因玉米事件 DBN9501 DNA 抽提样品的分析应该包括一个转基因玉米事件 DBN9501 的阳性组织 DNA 抽提物对照,一个来源于非转基因玉米事件 DBN9501 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 或其互补序列、或者 SEQ ID NO:4 或其互补序列的任何引物对,当它们被用于 DNA 扩增反应时分别产生对于来源于转基因事件玉米植物 DBN9501 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 DBN9501 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 DBN9501 为诊断性扩增子的、推定含有转基因玉米事件 DBN9501 的玉米植物或种子 DNA 的提取物,或来源于转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501。

第四实施例、利用 Southern 印迹杂交检测转基因玉米事件 DBN9501

4.1、用于 Southern 印迹杂交的 DNA 提取

利用研钵和研杵,在液氮中研磨大约 5-10 g 叶片组织。在 20 mL CTAB 裂解缓冲液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA pH 8.0、1.4 M NaCl、0.2% v/v β -巯基乙醇、2% w/v CTAB) 中重悬浮 4-5 g 研磨后的叶片组织,在温度 65°C 温育 60 min。在温育期间,每 10 min 将样品颠倒混匀一次。温育后,加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1),轻轻颠倒混匀进行抽提,以转速 4000 rpm 离心 20 min。取水相用等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 重复抽提一次。再次收集水相后加入等体积异丙醇,混匀后在温度 -20°C 放置 1 h 以沉淀 DNA,再以转速 4000 rpm 离心 5 min 得到 DNA 沉淀,然后在 1 mL TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA, pH 8.0) 中重悬浮 DNA 沉淀。为了降解任何存在的 RNA,在温度 37°C 下,将 DNA 和 40 μ L 10 mg/mL RNase A 温育 30 min,以 4000 rpm 离心 5 min,并且在 0.1 倍体积浓度为 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积无水乙醇存在的情况下,以转速 12000 rpm 离心 10 min 沉淀 DNA。弃掉上清液后,用

70% (v/v) 的 1 mL 乙醇洗涤沉淀, 室温干燥后在 1 mL TE 缓冲液中将 DNA 重新溶解。

4.2、限制酶消化

用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度。

在 100 μ L 反应体系中, 每次消化 5 μ g DNA, 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Nde* I 分别消化基因组 DNA, 以 T-DNA 上 *Vip3Aa19* 基因和 *pat* 基因的部分序列作为探针。对于每种酶, 在适当的温度下过夜温育消化物。利用真空离心蒸发浓缩器 (speed Vacuum, Thermo Scientific) 旋转样品以减少体积至 20 μ L。

4.3、凝胶电泳

向来源于本实施例 4.2 中的每个样品添加溴酚蓝上样缓冲液, 并且将每个样品加样到含有溴化乙锭的 0.7% TAE 琼脂糖凝胶上, 在 TAE 电泳缓冲液 (40 mM Tris-醋酸、2 mM EDTA, pH 8.5) 中电泳分离, 在电压 20V 下电泳凝胶过夜。

电泳结束后, 用 0.25 M HCl 处理凝胶 10 min 以使 DNA 脱嘌呤, 然后分别用变性液 (1.5 M NaCl、0.5 M NaOH) 和中和液 (1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl, pH 7.2) 处理凝胶各 30 min。在瓷盘中倒入 5 \times SSC (3 M NaCl、0.3 M 柠檬酸钠, pH 7.0), 搭上一块玻璃板, 然后依次放浸湿的滤纸桥、凝胶、带正电的尼龙膜 (Roche, Cat. No. 11417240001)、三张滤纸、纸塔、重物。在室温下转膜过夜后, 在去离子水中漂洗尼龙膜 2 次, 通过紫外交联仪 (UVP, UV Crosslinker CL-1000) 将 DNA 固定在膜上。

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 或 SEQ ID NO:25, 或者与上述序列部分同源或互补。用 DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒 (Roche, Cat. No. 11585614910) 进行探针的 DIG 标记、Southern 印迹杂交、洗膜等操作, 具体方法参考其产品说明书。最后用 X 光片 (Roche, Cat. No. 11666916001) 检测探针结合的位置。

每个 Southern 上包括两种对照样品: (1) 来自阴性 (未转化的) 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 *Nco* I-消化的 DBN10707 质粒, 其量基于探针长度等价于一个拷贝数, 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 DBN9501 含有 *Vip3Aa19* 基因和 *pat* 基因的单拷贝。利用该 *Vip3Aa19* 基因探针, *Nco* I 和

Ned I 酶解分别产生大小约 11 kb 和 9 kb 的单一一条带；利用该 *pat* 基因探针, *Nco I* 和 *Ned I* 酶解分别产生大小约 8.5 kb 和 1.3 kb 的单一一条带, 这表明 *Vip3Aa19* 基因和 *pat* 基因各一个拷贝存在于玉米植物 DBN9501 中。另外, 对于骨架探针, 未得到杂交条带, 说明在转化过程中未有任何 DBN10707 载体骨架序列进入玉米植物 DBN9501 基因组中。

第五实施例、事件的昆虫抗性检测

5.1、玉米植物 DBN9501 的生物测定

将转基因玉米事件 DBN9501 和野生型玉米植株 (非转基因, NGM) 2 种植株分别对小地老虎 (*Agrotis ypsilon* Rottemberg, BCW)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*, TCW)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*, BAW)、大螟 (*Sesamia inferens*, PSB)、高粱条螟 (*Chilo sacchariphagus*, SGB) 和粟灰螟 (*Chilo infuscatellus*, MSB) 按照如下方法进行生物测定:

分别取转基因玉米事件 DBN9501 和野生型玉米植株 (非转基因, NGM) 2 种植株的新鲜叶片 (V3-V4 时期), 用无菌水冲洗干净并用纱布将叶片上的水吸干, 然后将玉米叶片去除叶脉, 同时剪成约 1 cm×3 cm 的长条状, 取 1-3 片 (根据昆虫食量确定叶片数量) 剪后的长条状叶片放入圆形塑料培养皿底部的滤纸上, 所述滤纸用蒸馏水润湿, 每个培养皿中放 5-10 头人工饲养的初孵幼虫, 虫试培养皿加盖后, 在温度 26-28℃、相对湿度 70%-80%、光周期 (光/暗) 16:8 的条件下放置 3 天后统计结果。统计幼虫发育进度、死亡率和叶片损伤率三项指标, 获得抗性总分 (满分 300 分): 抗性总分=100×死亡率+[100×死亡率+90×(初孵虫数/接虫数)+60×(初孵-阴性对照虫数/接虫数)+10×(阴性对照虫数/接虫数)]+100×(1-叶片损伤率)。其中, 接虫数是指接虫的数量, 即每皿 5 或 10 头 (视害虫的取食量而定); 幼虫发育进度已通过抗性总分公式体现; 叶片损伤率是指被害虫取食的叶片面积占叶片总面积的比例。从转基因玉米事件 DBN9501 和野生型玉米植株 (非转基因, NGM) 分别选 5 株进行测试, 每株重复 6 次。结果如表 6 和表 7 所示。

表 6、转基因玉米事件 DBN9501 的抗虫生物测定结果-死亡率 (%)

昆虫/植株	DBN9501	NGM
BCW	100	17
TCW	100	8
BAW	100	12
PSB	96	5
SGB	80	1
MSB	100	3

表 7、转基因玉米事件 DBN9501 的抗虫生物测定结果-抗性总分 (分)

昆虫/植株	DBN9501	NGM
BCW	300	69
TCW	300	56
BAW	300	71
PSB	288	36
SGB	270	25
MSB	300	33

结果表明：转基因玉米事件 DBN9501 对小地老虎、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、大螟、高粱条螟和粟灰螟均具有较好的抗性，且转基因玉米事件 DBN9501 的试虫死亡率和抗性总分均显著高于 NGM。

5.2、转基因玉米事件 DBN9501 的田间效果

将转基因玉米事件 DBN9501 和野生型玉米植株（非转基因，NGM）2 种植株的种子设为 2 个处理，每个处理按随机区组设计，3 次重复，小区面积为 30 m²（5 m×6 m），行距 60 cm，株距 25 cm，常规栽培管理，全生育期不喷施杀虫剂。不同昆虫接虫试验小区之间有 2 m 的间隔，避免昆虫在不同小区之间的扩散。

（1）小地老虎

仅在小地老虎自然发生较为严重的地区进行自然感虫（自然虫害发生条件：小地老虎造成危害的为第一代幼虫，在环境条件适宜情况易发生，如温度在 16-26℃，相对湿度为 80-90%，土壤含水量 15-20%；此外第一代成虫诱到一定量时，如 20 头以上）。在玉米苗期，材料长至 V2-V3 左右时玉米植株发育至展 2-3 叶期，开始跟踪调查 NGM 中是否发生植株萎蔫，当 NGM 的萎蔫植株根际附近发生多为 4-6 龄高龄幼虫危害时，逐株调查小地老虎对玉米植株的为害率（为害率=被害虫取食的玉米植株数量/总植株数量×100%）。转基因玉米事件 DBN9501 对小地老虎的抗性结果如表 8 所示。

表 8、转基因玉米事件 DBN9501 自然感虫条件下对小地老虎的抗性结果

项目/植株	DBN9501	NGM
为害率%	0	10

结果表明：在小地老虎自然发生条件下，与 NGM 相比，小地老虎对转基因玉米事件 DBN9501 的为害率显著降低，由此说明转基因玉米事件 DBN9501 对小地老虎具有较好的抗性，转基因玉米事件 DBN9501 在小地老虎自然发生条件下的田间效果如图 3 所示。

（2）棉铃虫（*Helicoverpa armigera* Hubner, CBW）

在玉米吐丝期进行人工接虫，接虫 2 次，每小区人工接虫不少于 40 株，在每株玉米花丝中接人工饲养的初孵幼虫约 20 头，接虫 3 天后，第二次接虫，接虫数

量同第一次。在接虫 14-21 天后，逐株调查雌穗被害率、每个雌穗存活幼虫数、雌穗被害长度。通常接虫后 14 天开始调查，若 NGM 的为害级别达到感或高感，则视为有效，若没有达到可适当推迟调查，但接虫后 21 天仍未达到相应级别，则本次接虫视为无效。根据雌穗被害率、存活幼虫数、雌穗被害长度 (cm)，计算各小区玉米穗期棉铃虫对雌穗的为害级别平均值，判断标准如表 9 所示，然后按表 10 的标准判别玉米穗期对棉铃虫的抗性水平。转基因玉米事件 DBN9501 吐丝期对棉铃虫的抗性结果如表 11 所示。

表 9、玉米雌穗受棉铃虫为害程度的分级标准

雌穗被害级别	症状描述
0	雌穗没有受害
1	仅花丝被害
2	穗顶被害 1 cm
3+	穗顶下被害每增加 1 cm，相应的被害级别增加 1 级
...N	

表 10、玉米雌穗对棉铃虫的抗性评价标准

雌穗被害级别平均值	抗性水平
0-1.0	高抗 (HR)
1.1-3.0	抗 (R)
3.1-5.0	中抗 (MR)
5.1-7.0	感 (S)
≥7.1	高感 (HS)

表 11、转基因玉米事件 DBN9501 吐丝期对棉铃虫的抗性结果

项目/植株	DBN9501	NGM
雌穗被害率	58	100
幼虫存活数	0	0.17
雌穗被害长度	1.1	4.9
雌穗被害级别	2.1	5.9
抗性水平	R	S

结果表明：在人工接种的条件下，转基因玉米事件 DBN9501 的雌穗被害率、幼虫存活数、雌穗被害长度和雌穗被害级别显著低于 NGM，由此说明转基因玉米事件 DBN9501 对棉铃虫的抗性水平呈抗 (R) 级别，转基因玉米事件 DBN9501 接种棉铃虫的田间效果如图 4 所示。

(3) 斜纹夜蛾

仅在斜纹夜蛾自然发生较为严重的地区进行自然感虫(自然虫害发生条件：为害盛期在 7-9 月，害虫发育最适温度在 28-30℃)。在初次发生

虫害 10-15 天后，且 NGM 多为 4-6 龄高龄幼虫危害时，逐株调查斜纹夜蛾对玉米植株的为害率（为害率=被害虫取食的玉米植株数量/总植株数量×100%）。转基因玉米事件 DBN9501 对斜纹夜蛾的抗性结果如表 12 所示。

5 表 12、转基因玉米事件 DBN9501 自然感虫条件下对斜纹夜蛾的抗性结果

项目/植株	DBN9501	NGM
为害率%	0	38

10 结果表明：在斜纹夜蛾自然发生条件下，与 NGM 相比，斜纹夜蛾对转基因玉米事件 DBN9501 的为害率显著降低，由此说明转基因玉米事件 DBN9501 对斜纹夜蛾具有较好的抗性，转基因玉米事件 DBN9501 在斜纹夜蛾自然发生条件下的田间效果如图 5 所示。

(4) 甜菜夜蛾

15 试验设计和试验方法基本上与如上所述的评价斜纹夜蛾的抗性一致。不同的是，在初次发现虫害 10-15 天后，且 NGM 多为 4-5 龄高龄幼虫危害时，逐株调查甜菜夜蛾对玉米植株的为害率（为害率=被害虫取食的玉米植株数量/总植株数量×100%）。转基因玉米事件 DBN9501 对甜菜夜蛾的抗性结果如表 13 所示。

表 13、转基因玉米事件 DBN9501 自然感虫条件下对甜菜夜蛾的抗性结果

项目/植株	DBN9501	NGM
为害率%	0	56

20 结果表明：在甜菜夜蛾自然发生条件下，与 NGM 相比，甜菜夜蛾对转基因玉米事件 DBN9501 的为害率显著降低，由此说明转基因玉米事件 DBN9501 对甜菜夜蛾具有较好的抗性，转基因玉米事件 DBN9501 在甜菜夜蛾自然发生条件下的田间效果如图 6 所示。

25 特别值得一提的是，根据中国专利（申请）第 201310289848.6、201310573441.6、201410806573.3、201510259396.6、201610006375.8 号中记载的内容，和本申请转基因玉米事件 DBN9501 的对昆虫的田间效力与其生物测定结果，表明本申请转基因玉米事件 DBN9501 实现了控制害虫的方法和/或用途，具体为大螟、斜纹夜蛾、粟灰螟、高粱条螟和桃蛀螟；也即任何表达 Vip3Aa19 蛋白的转基因玉米植物均可以实现控制大螟、斜纹夜蛾、粟灰螟、高粱条螟和/或桃蛀螟害虫的方法和/或用途。

30 第六实施例、事件的除草剂耐受性检测

本试验选用保试达（Basta）除草剂（有效成分为 18% 的草铵膦铵盐

水剂)进行喷施。采用随机区组设计,3次重复。小区面积为 15 m^2 ($5\text{ m}\times 3\text{ m}$),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 DBN9501 进行如下2种处理:(1)不喷施,在处理(2)喷洒除草剂的同时,喷洒等体积的清水;(2)按 800 g a.i./ha (a.i./ha是指“活性成分每公顷”)剂量在V2-V3叶期喷洒保试达除草剂。需要说明的是,草铵膦除草剂(如Basta)为触杀型除草剂,如田间使用操作不当,如局部积累药液过多,可出现药害状,并非转基因玉米事件 DBN9501 耐受性存在问题;不同含量和剂型的草铵膦除草剂换算成上述等量有效成分草铵膦均适用于以下结论。

分别在使用药后1周和2周调查药害症状,并在收获时测定小区的产量;药害症状分级如表14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($\%$)= $\sum(\text{同级受害株数}\times\text{级别数})/(\text{总株数}\times\text{最高级别})$;其中除草剂受害率是指草铵膦受害率,草铵膦受害率是根据草铵膦处理后2周的药害调查结果而确定的,并由除草剂(草铵膦)受害率判别玉米对除草剂的耐受水平。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($\%$)= $\text{喷施产量}/\text{不喷施产量}$ 。转基因玉米事件 DBN9501 对除草剂耐受性的结果和玉米产量结果如表15所示。

表 14、草铵膦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

表 15、转基因玉米事件 DBN9501 对草铵膦除草剂耐受性的结果和玉米产量结果

项目/植株	DBN9501
草铵膦受害率% (对照)	0%
草铵膦受害率% (800 g a.i./ha)	0%
产量百分率% (800 g a.i./ha)	101.9%

结果说明,在草铵膦除草剂受害率方面:转基因玉米事件 DBN9501 在草铵膦除草剂(800 g a.i./ha)处理下受害率为0;由此,转基因玉米事件 DBN9501 具有良好的草铵膦除草剂耐受性。

在产量方面：转基因玉米事件 DBN9501 在不喷施和喷施 800 g a.i./ha 草铵膦 2 种处理下产量没有明显差异，在喷施草铵膦除草剂后，转基因玉米事件 DBN9501 的产量略有增加，由此，进一步表明转基因玉米事件 DBN9501 具有良好的草铵膦除草剂耐受性。

第七实施例

可由转基因玉米事件 DBN9501 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 DBN9501 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它食品、或者另外作为膨大剂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 所示的来源于转基因玉米事件 DBN9501 的核苷酸序列，其中探针序列或引物序列选自如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中所示的序列或其部分，以诊断转基因玉米事件 DBN9501 的存在。

综上所述，本发明转基因玉米事件 DBN9501 对鳞翅目昆虫具有较好的抗性，同时对草铵膦除草剂具有较高的耐受性，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 DBN9501 的 DNA 分子。

对应于转基因玉米事件 DBN9501 的种子已根据布达佩斯条约于 2019 年 1 月 23 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），分类命名：玉米（*Zea mays*），保藏编号为 CGMCC No.17099。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，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1. 一种核酸序列，其特征在于，具有 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 1-384 位中至少 11 个连续的核苷酸和 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 385-768 位中至少 11 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 1-564 位中至少 11 个连续的核苷酸和 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 565-1339 位中至少 11 个连续的核苷酸；

优选地，所述核酸序列具有 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 1-384 位中 22-25 个连续的核苷酸和 SEQ ID NO:3 或其互补序列第 385-768 位中 22-25 个连续的核苷酸、和/或 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 1-564 位中 22-25 个连续的核苷酸和 SEQ ID NO:4 或其互补序列第 565-1339 位中 22-25 个连续的核苷酸；

优选地，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；

优选地，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。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸序列，其特征在于，所述核酸序列包含 SEQ ID NO:5 或其互补序列。

3. 一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 存在的方法，其特征在于，包括：

使待检测样品与用于扩增目标扩增产物的至少两种引物在核酸扩增反应中接触；

进行核酸扩增反应；和

检测所述目标扩增产物的存在；

所述目标扩增产物包含权利要求 1 或 2 所述核酸序列；优选地，所述目标扩增产物包含 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/或 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

4. 根据权利要求 3 所述检测样品中转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 存在的方法，其特征在于，所述引物包括第一引物和第二引物，所述第一引物选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10；所述第二引物选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11。

5. 一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 存在的方法，其特征在于，包括：

使待检测样品与探针接触，所述探针包含权利要求 1 所述核酸序列；优选地，所述探针包含 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/或 SEQ ID NO:7 或其互补序列；

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。

5 6. 根据权利要求 5 所述检测样品中转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 存在的方法，其特征在于，至少一个所述探针用至少一种荧光基因团标记。

7. 一种检测样品中转基因玉米事件 DBN9501 的 DNA 存在的方法，其特征在于，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权利要求 1 所述核酸序列；优选地，所述标记物核酸分子包括选自以下的至少一种：SEQ ID NO:1 或其互补序列、SEQ ID NO:2 或其互补序列、和/或 SEQ ID NO:6-11 或其互补序列；

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昆虫抗性和/或除草剂耐受性与标记物核酸分子在遗传学上是连锁的。

8. 一种 DNA 检测试剂盒，其特征在于，包括至少一个 DNA 分子，所述 DNA 分子包含权利要求 1 所述核酸序列，其可以作为对于转基因玉米事件 DBN9501 或其后代具有特异性的 DNA 引物之一或探针；优选地，所述 DNA 分子包含 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/或 SEQ ID NO:7 或其互补序列。

9. 一种保护玉米植物免于昆虫侵袭的方法，其特征在于，包括在靶昆虫的膳食中提供至少一种转基因玉米植物细胞，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中包含 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列，摄食所述转基因玉米植物细胞的靶昆虫被抑制进一步摄食所述转基因玉米植物；

25 30 优选地，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中包含 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列；

优选地，所述转基因玉米植物细胞在其基因组中依次包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5 第 553-7491 位核酸序列和 SEQ ID NO:2，或者包含 SEQ ID NO:5 所示的序列。

35 10. 一种保护玉米植物免受由除草剂引起的损伤或控制种植玉米植物的大田中杂草的方法，其特征在于，包括将含有有效剂量草铵膦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 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列, 所述转基因玉米植物对草铵膦除草剂具有耐受性;

优选地, 所述转基因玉米植物在其基因组中包含 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列;

5 优选地, 所述转基因玉米植物在其基因组中依次包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5 第 553-7491 位核酸序列和 SEQ ID NO:2, 或者包含 SEQ ID NO:5 所示的序列。

11. 一种培养对昆虫具有抗性和/或耐受草铵膦除草剂的玉米植物的方法, 其特征在于, 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编码昆虫抗性 Vip3Aa 蛋白的核酸序列和/或编码草铵膦除草剂耐受性 PAT 蛋白的核酸序列、和特定区域的核酸序列, 或者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;

15 用靶昆虫侵袭所述玉米植株和/或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为 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列; 优选地, 所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列。

20 12. 一种产生对昆虫具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法, 其特征在于, 包括将第一玉米植物基因组中包含的编码昆虫抗性 Vip3Aa 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、和特定区域的核酸序列, 或者将所述第一玉米植物基因组中包含的 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列, 引入第二玉米植物, 从而产生大量子代植株; 选择具有所述特定区域的核酸序列的所述子代植株, 且所述子代植株对昆虫具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性; 所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 所示的序列; 优选地, 所述特定区域的核酸序列为 SEQ ID NO:3 和/或 SEQ ID NO:4 所示的序列;

30 优选地, 所述方法包括将转基因玉米事件 DBN9501 与缺少昆虫抗性和/或草铵膦耐受性的玉米植株进行有性杂交, 从而产生大量子代植株, 选择具有所述特定区域的核酸序列的所述子代植株;

用靶昆虫侵袭和/或用草铵膦处理所述子代植株;

35 选择对昆虫具有抗性和/或对草铵膦除草剂具有耐受性的所述子代植株。

13. 一种产生自转基因玉米事件 DBN9501 的农产品或商品，其特征在于，所述农产品或商品为玉米粗粉、玉米面、玉米油、玉米穗丝、玉米淀粉、玉米面筋、玉米饼、化妆品或填充剂。

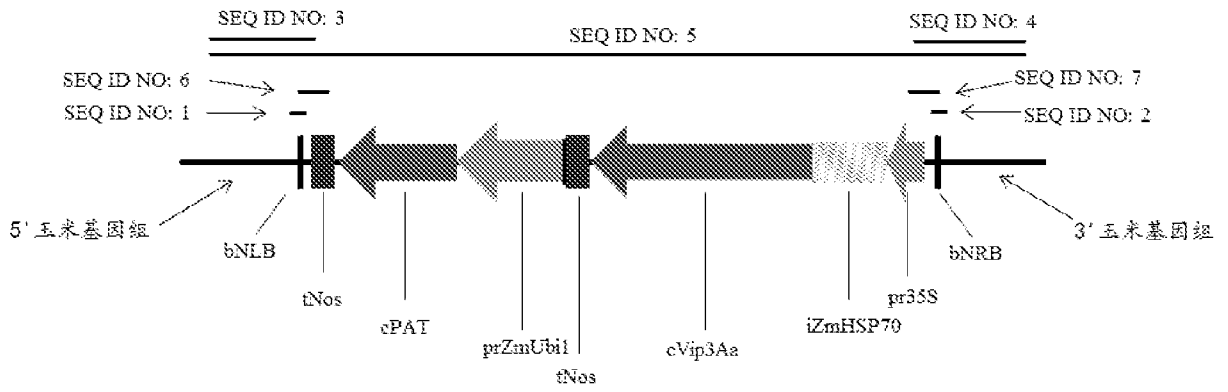


图 1

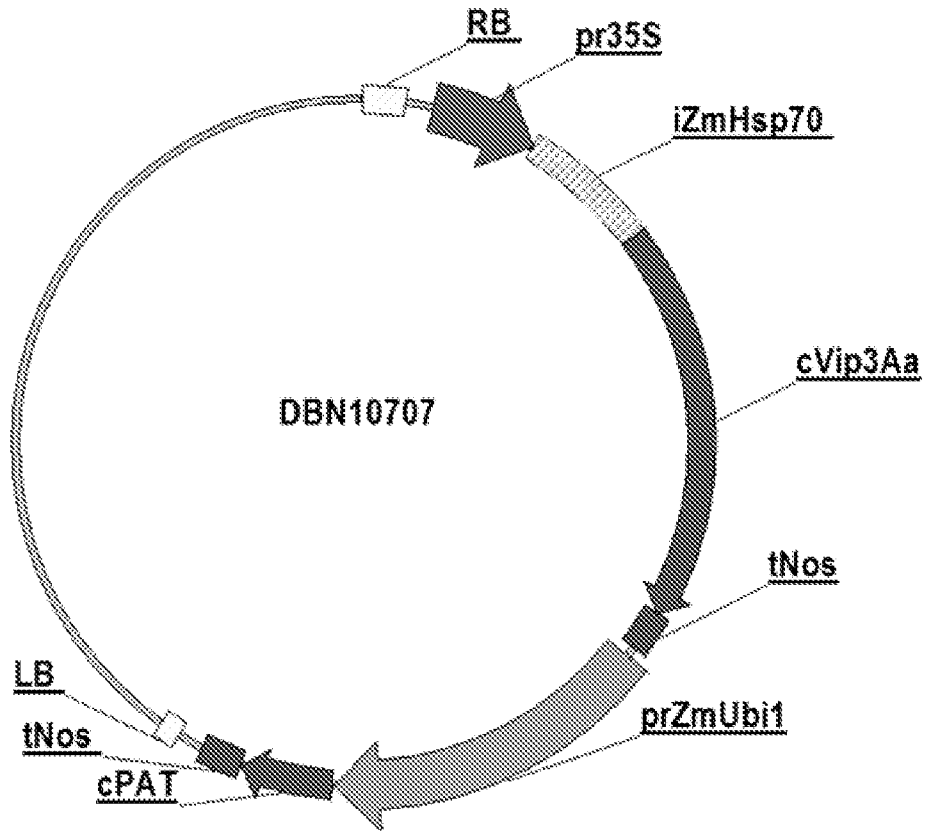
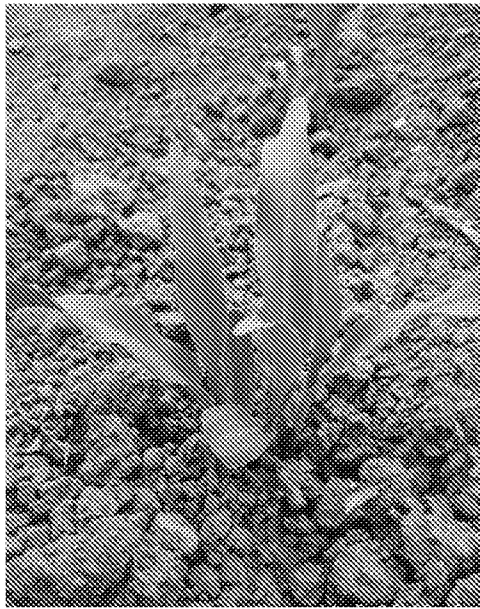


图 2



DBN9501

NGM

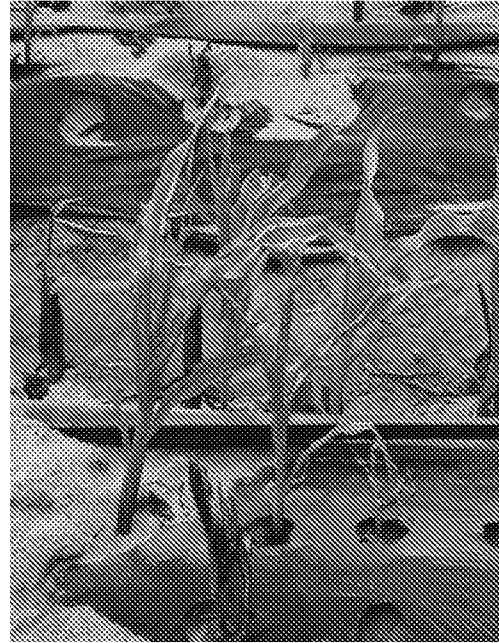
图 3



DBN9501

NGM

图 4



DBN9501

NGM

图 5



DBN9501

NGM

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/076208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/6895(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 1/02(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/46(2018.01)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) C12Q, C12N, 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) CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 玉米, 转基因, 检测, 淀粉, corn, transgenic, test, detect+, dbn9501, Vip3Aa19, pat, starch EMBL+GENBANK+DDBJ+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs: 1-11进行序列检索 (starch EMBL+GENBANK+DDBJ+China Patents Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-11 Sequence Search)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109868273 A (BEIJING DBN TECH GROUP CO., LTD.) 11 June 2019 (2019-06-11) see claims 1-13	1-13
X	CN 101402996 A (NORTHEAST AGRICULTURAL UNIVERSITY) 08 April 2009 (2009-04-08) see claim 1	13
A	CN 103039494 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.) 17 April 2013 (2013-04-17) see entire document	1-13
A	CN 103719136 A (BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. et al.) 16 April 2014 (2014-04-16) see description, paragraphs 10-22, 56, 71, 72, embodiments 2-6	1-13
A	CN 102762725 A (BAYER CROPSCIENCE AG) 31 October 2012 (2012-10-31) see entire document	1-13
A	CN 103140585 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 05 June 2013 (2013-06-05) see entire document	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May 2020		Date of mailing of the international search report 25 May 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王翠云等 (WANG, Cuiyun et al.). "外源基因在转基因玉米中的整合位点分析 (Analysis of the Integration Site of Exogenous Gene in Transgenic Maize)" <i>Biotechnology Bulletin</i> , Vol. 35, No. 3, 31 March 2019 (2019-03-31), ISSN: 1002-5464, pages 1-5, see abstract	1-13
A	张晓婧 (ZHANG, Xiaojing). "一种抗虫抗除草剂转基因玉米的分子特征和遗传稳定性检测 (Molecular Characterization and Inheritance Stability Analysis of An Insect-resistant and Herbicide-tolerant Transgenic Maize)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑 (Chinese Master's Theses Full-text Database, Agricultural Science and Technology)</i> , No. 1., 15 January 2019 (2019-01-15), ISSN: 1674-0246, see entire document	1-13

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:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/076208

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109868273	A	11 June 2019	None			
CN	101402996	A	08 April 2009	None			
CN	103039494	A	17 April 2013	PH	12013000365	A1	29 June 2015
				CN	103421816	B	08 June 2016
				CN	103421816	A	04 December 2013
				PH	12018000128	B1	18 March 2019
				BR	102013031016	A2	22 September 2015
				CN	103509808	B	15 July 2015
				PH	12013000365	B1	29 June 2015
				AR	093799	A1	24 June 2015
				CN	103509808	A	15 January 2014
				US	2014157459	A1	05 June 2014
				PH	12018000128	A1	18 March 2019
CN	103719136	A	16 April 2014	AU	2014350741	A1	02 June 2016
				AU	2014350741	B2	18 January 2018
				WO	2015070778	A1	21 May 2015
				AR	098426	A1	26 May 2016
CN	102762725	A	31 October 2012	MX	2012007358	A	06 November 2012
				CA	2785220	C	04 December 2018
				AU	2010334815	A1	19 July 2012
				EP	2516632	A1	31 October 2012
				AR	079883	A1	29 February 2012
				ES	2668222	T3	17 May 2018
				WO	2011076889	A1	30 June 2011
				US	2011197308	A1	11 August 2011
				CA	2785220	A1	30 June 2011
				UY	33143	A	29 July 2011
				JP	2013515470	A	09 May 2013
				US	8859856	B2	14 October 2014
				JP	5852009	B2	03 February 2016
				EP	2516632	B1	14 February 2018
				AU	2010334815	B2	09 July 2015
				BR	112012015692	A2	25 August 2015
				US	2015159169	A1	11 June 2015
				EA	201290560	A1	30 May 2014
CN	103140585	A	05 June 2013	UA	111592	C2	25 May 2016
				EP	2591110	B1	08 April 2015
				US	2013116170	A1	09 May 2013
				RU	2599446	C2	10 October 2016
				BR	112013000262	A2	24 May 2016
				CN	103140585	B	20 January 2016
				WO	2012006271	A1	12 January 2012
				AU	2011276306	B2	06 August 2015
				EP	2591110	A1	15 May 2013
				CA	2804673	A1	12 January 2012
				ES	2538686	T3	23 June 2015
				RU	2013104932	A	20 August 2014
				ZA	201209636	B	26 August 2015
				PT	2591110	E	13 July 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/076208

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		AR 083434 A1	27 February 2013
		AU 2011276306 A1	07 February 2013
		MX 2012014656 A	07 February 2013
		CL 2013000020 A1	24 May 2013
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/076208

A. 主题的分类 C12Q 1/6895(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 1/02(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/46(2018.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q, C12N, A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED:玉米, 转基因, 检测, 淀粉, corn, transgenic, test, detect+, dbn9501, Vip3Aa19, pat, starch EMBL+GENBANK+DDBJ+中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID N0s: 1-11进行序列检索		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109868273 A (北京大北农生物技术有限公司) 2019年 6月 11日 (2019 - 06 - 11) 参见权利要求1-13	1-13
X	CN 101402996 A (东北农业大学) 2009年 4月 8日 (2009 - 04 - 08) 参见权利要求1	13
A	CN 103039494 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2013年 4月 17日 (2013 - 04 - 17) 参见全文	1-13
A	CN 103719136 A (北京大北农科技集团股份有限公司等) 2014年 4月 16日 (2014 - 04 - 16) 参见说明书10-22, 56, 71, 72段, 实施例2-6	1-13
A	CN 102762725 A (拜尔知识产权有限公司) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 参见全文	1-13
A	CN 103140585 A (先正达参股股份有限公司) 2013年 6月 5日 (2013 - 06 - 05) 参见全文	1-13
<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。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	2020年 5月 11日	国际检索报告邮寄日期 2020年 5月 25日
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 潘俊宇 电话号码 62411108

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	王翠云等. “外源基因在转基因玉米中的整合位点分析” 生物技术通报, 第35卷, 第3期, 2019年 3月 31日 (2019 - 03 - 31), ISSN: 1002-5464, 第1-5页, 参见摘要	1-13
A	张晓婧. “一种抗虫抗除草剂转基因玉米的分子特征和遗传稳定性检测” 中国优秀硕士学位论文全文数据库 (农业科技辑), 第1期, 2019年 1月 15日 (2019 - 01 - 15), ISSN: 1674-0246, 参见全文	1-13

第1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核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 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作为申请一部分的序列列表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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/076208

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	109868273	A	2019年 6月 11日	无			
CN	101402996	A	2009年 4月 8日	无			
CN	103039494	A	2013年 4月 17日	PH	12013000365	A1	2015年 6月 29日
				CN	103421816	B	2016年 6月 8日
				CN	103421816	A	2013年 12月 4日
				PH	12018000128	B1	2019年 3月 18日
				BR	102013031016	A2	2015年 9月 22日
				CN	103509808	B	2015年 7月 15日
				PH	12013000365	B1	2015年 6月 29日
				AR	093799	A1	2015年 6月 24日
				CN	103509808	A	2014年 1月 15日
				US	2014157459	A1	2014年 6月 5日
				PH	12018000128	A1	2019年 3月 18日
CN	103719136	A	2014年 4月 16日	AU	2014350741	A1	2016年 6月 2日
				AU	2014350741	B2	2018年 1月 18日
				WO	2015070778	A1	2015年 5月 21日
				AR	098426	A1	2016年 5月 26日
CN	102762725	A	2012年 10月 31日	MX	2012007358	A	2012年 11月 6日
				CA	2785220	C	2018年 12月 4日
				AU	2010334815	A1	2012年 7月 19日
				EP	2516632	A1	2012年 10月 31日
				AR	079883	A1	2012年 2月 29日
				ES	2668222	T3	2018年 5月 17日
				WO	2011076889	A1	2011年 6月 30日
				US	2011197308	A1	2011年 8月 11日
				CA	2785220	A1	2011年 6月 30日
				UY	33143	A	2011年 7月 29日
				JP	2013515470	A	2013年 5月 9日
				US	8859856	B2	2014年 10月 14日
				JP	5852009	B2	2016年 2月 3日
				EP	2516632	B1	2018年 2月 14日
				AU	2010334815	B2	2015年 7月 9日
				BR	112012015692	A2	2015年 8月 25日
				US	2015159169	A1	2015年 6月 11日
				EA	201290560	A1	2014年 5月 30日
CN	103140585	A	2013年 6月 5日	UA	111592	C2	2016年 5月 25日
				EP	2591110	B1	2015年 4月 8日
				US	2013116170	A1	2013年 5月 9日
				RU	2599446	C2	2016年 10月 10日
				BR	112013000262	A2	2016年 5月 24日
				CN	103140585	B	2016年 1月 20日
				WO	2012006271	A1	2012年 1月 12日
				AU	2011276306	B2	2015年 8月 6日
				EP	2591110	A1	2013年 5月 15日
				CA	2804673	A1	2012年 1月 12日
				ES	2538686	T3	2015年 6月 23日
				RU	2013104932	A	2014年 8月 20日
				ZA	201209636	B	2015年 8月 26日
				PT	2591110	E	2015年 7月 13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/076208

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)
		AR 083434 A1	2013年 2月 27日
		AU 2011276306 A1	2013年 2月 7日
		MX 2012014656 A	2013年 2月 7日
		CL 2013000020 A1	2013年 5月 24日