

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/82

C12Q 1/68

C12N 15/11

A01H 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380102137.8

[43] 公开日 2005 年 12 月 14 日

[11] 公开号 CN 1708588A

[22] 申请日 2003.10.23

[21] 申请号 200380102137.8

[30] 优先权

[32] 2002.10.29 [33] GB [31] 0225129.6

[86] 国际申请 PCT/EP2003/011725 2003.10.23

[87] 国际公布 WO2004/039986 英 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.26

[71] 申请人 辛根塔参与股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 D·M·埃利斯 D·V·奈格罗特

施 良 F·A·施特科斯基

C·R·托马斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 罗菊华

权利要求书 3 页 说明书 21 页 序列表 30 页

[54] 发明名称 COT102 杀虫棉花

[57] 摘要

本发明涉及抗昆虫转基因棉花植物。特别地，本发明涉及命名为 COT102 的特定事件。本发明也涉及 COT102 事件特有的多核苷酸，包含所述多核苷酸的植物，和检测 COT102 事件的方法。该 COT102 事件显示了包含 2 个表达盒的新基因型。第一个盒子包含用于在植物中表达的适合启动子和适合的聚腺苷酸化信号，该启动子可操作地连接编码 VIP3A 杀虫毒素的基因，该 VIP3A 杀虫毒素可用于控制广谱鳞翅目昆虫害虫。第二个盒子包含当其表达时能用做选择性标记的基因。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:1 的 26 个核苷酸序列的至少 17 个邻接核苷酸。

2、如权利要求 1 所述的多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:1 的 26 个核苷酸序列的至少 18 个邻接核苷酸。

3、如权利要求 1 所述的多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:1 的 26 个核苷酸序列的至少 20 个邻接核苷酸。

4、如权利要求 1 所述的多核苷酸，其包含 SEQ ID NO:1 的序列。

5、一种多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:2 的 26 个核苷酸序列的至少 17 个邻接核苷酸。

6、如权利要求 5 所述的多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:2 的 26 个核苷酸序列的至少 18 个邻接核苷酸。

7、如权利要求 5 所述的多核苷酸，其包含来自 SEQ ID NO:2 的 26 个核苷酸序列的至少 20 个邻接核苷酸。

8、如权利要求 5 所述的多核苷酸，其包含 SEQ ID NO:2 的序列。

9、根据前述任何一个权利要求所述的多核苷酸，其包含 SEQ ID NO:21 的序列。

10、一种抗昆虫的植物，其包含 VIP3A 蛋白质和如权利要求 1 至 9 任一权利要求所述的多核苷酸。

11、如权利要求 10 所述的植物，其是棉花植物。

12、如权利要求 11 所述的一种杀虫棉花植物，其来源于 COT102 事件。

13、一种检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法，该方法包括：

- 获得用于分析的样品；
- 提供该样品的 DNA；
- 提供一对引物，该引物被设计成当如权利要求 1 至 9 任一权利要求所述的多核苷酸是单链时，能结合该多核苷酸；
- 扩增位于该引物结合位点之间的区域；和

- 检测扩增产物的存在;

由此, 扩增产物的存在表明样品来源于 COT102 事件。

14、如权利要求 13 所述的方法, 其中第一个引物具有 SEQ ID NO: 3 的序列, 第二个引物具有 SEQ ID NO: 4 的序列。

15、一种检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法, 该方法包括:

- 获得用于分析的样品;
- 提供探针, 该探针被设计成当如权利要求 1 至 9 任一权利要求所述的多核苷酸是单链时, 能结合所述多核苷酸的互补链;
- 使所述探针和样品杂交; 和
- 检测该探针是否已经杂交;

由此, 探针的杂交表明该样品来源于 COT102 事件。

16、如权利要求 15 所述的方法, 其中探针的序列选自 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7。

17、如权利要求 15 或 16 所述的方法, 其中在严格杂交条件下, 该探针与样品杂交。

18、一种检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法, 该方法包括:

- 获得用于分析的样品;
- 提供抗体, 该抗体被设计成结合如权利要求 10 到 12 任一权利要求所述植物中包含的 VIP 蛋白质;
- 温育所述抗体和样品; 和
- 检测该抗体是否已经结合;

由此, 已经结合的抗体的存在表明该样品来源于 COT102 事件。

19、一种检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法, 该方法包括:

- 获得用于分析的样品;
- 制备样品的蛋白质提取物;
- 提供检测条, 该检测条被设计成检测存在于样品中的 VIP 蛋白质的存在;
- 温育检测条和样品; 和
- 检测 VIP 蛋白质是否存在;

其中，VIP蛋白质的存在表明该样品来源于 COT102 事件。

20、如权利要求 18 或 19 所述的方法，其中 VIP 蛋白质具有 SEQ ID NO: 8 的序列。

21、一种检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法，该方法包括：

- 获得用于分析的样品；
- 使草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 物种的一个或多个昆虫暴露于该样品；
- 使欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 物种的一个或多个昆虫暴露于该样品，做为对照；
- 检测样品是否对每个物种的昆虫具有杀虫作用；和
- 比较该结果和真实的 COT102 生物测定模式。

22、一种试剂盒，其包含用于检测样品中来源于 COT102 事件的植物材料的存在的手段。

23、如权利要求 22 所述的试剂盒，其包含用于检测样品中如权利要求 1 至 9 任一权利要求所述多核苷酸，或者如权利要求 1 至 9 任一权利要求所述多核苷酸编码的蛋白质，或者 VIP 蛋白质的存在的手段。

24、如权利要求 22 或 23 所述的试剂盒，其包含说明书形式的如权利要求 13 至 21 任一权利要求所述一种或多种方法。

COT102 杀虫棉花

技术领域

本发明涉及植物的基因工程，特别是抗昆虫的转基因棉花植物。本发明也涉及检测来源于该植物的材料的方法。

背景技术

植物害虫是世界上重要农作物损失的主要因素。在美国，由于非哺乳动物害虫（包括昆虫）侵袭植物，每年损失约 80 亿美元。除了农田作物损失外，昆虫害虫对于蔬菜和水果种植者，对于观赏花卉的生产者，和对于家宅园丁也是负担。

主要通过化学杀虫剂的广泛应用控制昆虫害虫，该化学杀虫剂具有抑制昆虫生长，妨碍昆虫进食或繁殖，或引起死亡的活性。因此可以达到良好的昆虫害虫控制，但是这些化学药品有时也影响其它有益昆虫。化学杀虫剂广泛应用引起的另一问题是抗药性昆虫品种的出现。通过各种抗药性处理实践已经部分缓解了这种现象，但是对可替代的害虫控制剂存在日益增加的需要。生物害虫控制剂，诸如表达杀虫毒素象 δ -内毒素的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 株系也已经被施用给作物植物，并且取得了满意的结果，提供了化学杀虫剂的可替代物或补充物。已经分离了一些编码这些 δ -内毒素的基因，表明在异源宿主中它们的表达提供了用于经济上重要的昆虫害虫控制的另一种工具。特别地，转基因植物中杀虫毒素如苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) δ -内毒素的表达提供了免受所选择昆虫害虫侵害的有效保护，并且已经商品化了表达这种毒素的转基因植物，使得农民能够减少化学昆虫控制药剂的施用。

最近，鉴定了芽孢杆菌属 (*Bacillus spp.*) 营养生长阶段期间产生的一类新的杀虫蛋白质(营养杀虫蛋白质(VIPs))。美国专利 5,877,012, 6,107,279, 和 6,137,033 描述了从芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 物种分离的

vip3A 毒素基因。VIP3A 毒素具有抗广谱鳞翅目昆虫，包括但不限于草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)，小地老虎 (*Agrotis ipsilon*)，小蔗螟 (*Diatraea saccharalis*) 和南美玉米苗斑螟 (*Elasmopalpus lignosellus*) 的杀虫活性，并且当在转基因植物例如棉花中表达它时，给植物提供了免受昆虫进食损害的保护。

棉类植物棉属 (*Gossypium*) 是锦葵科 (*Malvaceae*) 的成员，包含 39 个物种，其中陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 是最常栽培的物种。也栽培 3 种其它物种：树棉 (*G. arboreum*)，海岛棉 (*G. barbadense*) 和草棉 (*G. herbaceum*)。种植这些栽培品种主要是为了制成纺织品的种子纤维。棉花适于做为纺织纤维，因为成熟的干纤维捻在一起，使得可从中纺出结实的细线。其它产品，诸如棉籽油、油饼和棉籽绒是纤维生产的副产品。

每年，世界上由于昆虫害虫对棉花作物的损害引起了严重的产量损失。有效地控制这些害虫以最小化产量损失具有重要的经济意义。棉花昆虫害虫的例子包括甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)，棉铃象 (*Anthonomus grandis grandis*)，粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)，云纹盲蝽 (*Neurocolpus nubilus*)，棉蚜 (*Aphis gossypii*)，谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*)，切根虫 (粒肤地虎 (*Feltia subterranean*))，豆杂色夜蛾 (*Peridroma saucia*)，小地老虎 (*Agrotis ipsilon*)，欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)，草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)，花蓟马属 (*Frankliniella spp.*)，大豆夜蛾 (*Pseudoplusia includens*)，蝽象 (稻绿蝽 (*Nezara viridula*)，喜绿蝽 (*Acrosternum hilare*)，褐臭蝽 (*Euschistus servus*))，牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris*)，烟蚜夜蛾 (*Heliothis virescens*) 和粉虱 (结翅粉虱 (*Trialeurodes abutilonea*)，甘薯粉虱 (*Bemisia tabaci*))。

现在，棉花植物的转化和再生是非常完善的方法，典型地基于根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导外源 DNA 转移到棉花植物部分中，并且在组织培养中再生所述植物部分为完全可育的转基因棉花植物。

需要产生抗昆虫的棉花植物，以减少由于昆虫害虫对棉花作物的损害造成的产量损失。抗昆虫棉花植物可以减少施用化学杀虫剂的需要，化学

杀虫剂可能对其它有益昆虫和环境是有害的。

发明内容

因此，本发明涉及命名为 COT102 的抗昆虫转基因棉花事件。本发明也涉及检测来源该事件的植物材料的方法。在本申请上下文中“COT102 事件”指这里所述的原始杀虫转基因棉花植物。这里所用的“杀虫”指对昆虫的任何抑制作用，包括但不限于进食减少、生长阻滞、生殖力减弱，麻痹或死亡。“生殖力”包括与繁殖有关的所有方面，诸如繁殖能力、繁殖频率和后代数量。本发明也包括来源于该 COT102 事件的任何植物材料，包括种子。

COT102 事件显示了包含 2 个表达盒的新基因型。第一个盒子包含用于在植物中表达的适合启动子和适合的聚腺苷酸化信号，该启动子可操作地连接编码 VIP3A 杀虫毒素的基因，该 VIP3A 杀虫毒素可用于控制广谱鳞翅目昆虫害虫。尤其可以从植物分离适合的启动子。已经分离和表征了大量植物启动子，包括组成型、开关型和/或组织特异性启动子。适合的启动子可以选自下列非限制性的群组：CaMV35S，FMV35S，遍在蛋白，Act2，NOS，OCS，夜香树属 (*Cestrum*) 黄叶卷曲病毒启动子，Patatin，E9，alcA/alcR 开关，GST 开关，RMS 开关，油质蛋白，Gelvin，核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基，肌动蛋白 7，MR7 启动子 (玉米)，Gos9 (水稻)，GOS2 启动子，MasOcs (或超启动子 (super promoter))，RolD 启动子 (毛根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*))，SuperMAS 启动子和 Suc2 启动子 (拟南芥属 (*Arabidopsis*))。在本发明的一个实施方式中，启动子是来源于拟南芥属 (*Arabidopsis*) 的肌动蛋白启动子 Act2。另外的元件诸如增强子序列也可以掺入表达盒中以加强基因表达水平，例如转录或翻译增强子，诸如烟草蚀刻病毒 (TEV) 翻译激活子 (translation activator)，CaMV35S 增强子和 FMV35S 增强子。做为可替代方案，可能期望包含导向序列，例如以引导 VIP3A 毒素转运到特定细胞区室。例如，如果期望提供细胞外蛋白质，那么可以连接细胞外导向序列和编码 VIP 蛋白质的多核苷酸。其它靶向的例子包括靶向特定的细胞内细胞器或区室，例如利用 ‘KDEL’ 保留序列，靶向内质网。已经分离和表征了大量聚

腺苷酸化信号。植物中起作用的适合聚腺苷酸化信号的例子包括来源于根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂氨酸合酶基因 (nos)，来源于蛋白酶抑制剂基因 II 和来源于 α -微管蛋白基因的聚腺苷酸化信号 (EP-A 652, 286)。在本发明一个实施方式中，聚腺苷酸化信号是来源于根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) nos 基因的聚腺苷酸化信号。

根据本发明，也可以密码子优化或者以其它方式改变编码 VIP3A 蛋白质的多核苷酸，这样一旦该多核苷酸被掺入到植物材料中，例如就可以增强转录。这种密码子优化也可以用于改变任何转化细胞中产生的 RNA 转录物的预测二级结构，或者用于破坏未改变的转录物中存在的隐蔽 RNA 不稳定性元件，因此增加转化细胞中转录物的稳定性和可利用性 (Abler 和 Green (1996) *Plant Molecular Biology* (32), 63-78 页)。

第二个盒子包含当表达时可以用做选择性标记的基因。已经表征了大量选择性标记，包括赋予对抗生素耐受性的一些选择性标记和赋予对除草剂耐受性的其它选择性标记。适合的选择性标记基因的例子包括赋予对潮霉素、卡那霉素或庆大霉素耐受性的选择性标记基因。其它适合的选择性标记包括赋予对除草剂诸如基于草甘膦的除草剂的耐受性或对毒素诸如 eutypine 的抗性的基因。也可以利用其它形式筛选诸如基于激素的筛选系统诸如 Hiroyrasu Ebinuma 等 (1997) *PNAS*, 94 卷, 2117-2121 页的多自动转化 (MAT) 系统；使用已知绿色荧光蛋白、 β -葡糖醛酸酶的可观察的筛选系统和任何其它筛选系统诸如甘露糖异构酶 (Positech™)，木糖异构酶和 2-脱氧葡萄糖 (2-DOG)。在本发明一个实施方式中，选择性标记基因是赋予对潮霉素耐受性的选择性标记基因。其它表达盒可选地包含在 COT102 事件中。例如，这些表达盒可以提供其它的期望益处诸如除草剂抗性。

第一和第二个表达盒可以在相同或不同质粒上被引入植物中。如果第一和第二表达盒存在相同质粒上，并且通过农杆菌属 (*Agrobacterium*) 介导的转化方法被引入到植物中，则它们可以存在于相同或不同 T-DNA 区中。在本发明一个实施方式中，第一和第二个表达盒存在于相同 T-DNA 区上。

根据本发明的第一方面,提供了多核苷酸,其包含来自于 SEQ ID NO: 1 的 26 个核苷酸序列的至少 17 个邻接核苷酸。在一个实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 1 的至少 18 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 1 的至少 20 个邻接核苷酸。在另一实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 1 的至少 22 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 1 的至少 24 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,本发明提供了包含 SEQ ID NO: 1 序列的多核苷酸。

在本发明另一个方面,提供了多核苷酸,其包含来自于 SEQ ID NO: 2 的 26 个核苷酸序列的至少 17 个邻接核苷酸。在一个实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 2 的至少 18 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 2 的至少 20 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 2 的至少 22 个邻接核苷酸。然而,在进一步实施方式中,所述多核苷酸包含来自于 SEQ ID NO: 2 的至少 24 个邻接核苷酸。在再进一步实施方式中,本发明提供了包含 SEQ ID NO: 2 序列的多核苷酸。

在本发明另一方面,提供了包含 SEQ ID NO: 7 序列的上述多核苷酸。在本发明另一方面,提供了包含 SEQ ID NO: 21 序列的上述多核苷酸。

在本发明另一方面,提供了一种包含多核苷酸的植物,该多核苷酸包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 17 个邻接核苷酸。在一个实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 18 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 20 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 22 个邻接核苷酸。在进一步实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 24 个邻接核苷酸。然而,在进一步实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的序列。还是在进一步实施方式中,所述植物还包含 SEQ ID NO: 7 序列。在另一个实施方式中,所述植物包含 SEQ ID NO: 21 序列。在本发明一个实施方式中,所述植物是棉花植物。在进一步实施方式中,所述植物是作

为 COT102 事件的杀虫棉花植物，或者来源于它的植物。

本领域技术人员熟悉植物转化方法。特别地，已经在广泛植物物种中表征了两种主要的技术：通过农杆菌属 (*Agrobacterium*) 的转化和通过直接 DNA 转移的转化。

农杆菌属 (*Agrobacterium*) 介导的转化是用于双子叶植物转化的常用方法。将要引入到植物中的外源 DNA 克隆到双元载体的左和右边界共有序列之间。这是 T-DNA 区。双元载体被转化到农杆菌属 (*Agrobacterium*) 细胞中，随后，该农杆菌属 (*Agrobacterium*) 细胞用于感染植物组织。包含外源 DNA 的载体 T-DNA 区被插入到植物基因组中。标记基因盒和性状基因盒可以存在于相同载体中的相同 T-DNA 区上，不同 T-DNA 区上，或者甚至是不同载体中的不同 T-DNA 区上。在本发明的一个实施方式中，这些盒子存在于相同 T-DNA 区上。

做为可替代方案，直接 DNA 转移可以用于将 DNA 直接引入到植物细胞中。直接转移的一个适合方法可以是利用基因枪，用包含插入用 DNA 的载体轰击植物细胞（粒子介导的生物弹击转化）；另一种确立的方法是 ‘whiskers’，其包括将 DNA 包被到刺穿细胞的碳化硅纤维上。转化植物细胞的其它方法包括原生质体转化（可选地在聚乙二醇存在的情况下）；在包含多核苷酸或载体的介质中超声处理植物组织、细胞或原生质体；多核苷酸或载体显微插入到植物材料中（可选地利用已知的碳化硅 ‘whiskers’ 技术），电穿孔等等。

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诸如潮霉素抗性标记选择具有外源 DNA 的后代。本领域技术人员熟悉适当再生介质的组成。

如这里所述，本发明这方面的植物对来自于实夜蛾属 (*Heliothis sp.*)，*Helicoverpa sp.* 和贪夜蛾属 (*Spodoptera sp.*) 的一个或多个物种的、可能侵袭该植物的昆虫具有杀虫作用。这里所用的“侵袭”指一种或多种昆虫以任何方式的攻击、进食或损害。因此，例如，本发明植物将提供抗害虫昆虫诸如谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*) 侵袭的自卫机制。结果，与相同品种非转基因棉花植物比较，在所述植物栽培期间需要减少数

量的杀虫喷雾剂。并且昆虫害虫造成的产量损失保持在最小水平。

本发明不限于 COT102 事件本身，而是进一步延及包括来源于其的任何植物材料，包括种子，只要它们含有至少一种本发明多核苷酸。本发明包括但不限于来源于与 COT102 事件育种杂交的植物，或者通过常规育种或其它方法由此来源的衍生物。本发明也包括来源于 COT102 事件的植物材料，该植物材料与 COT102 事件比较，可以包含另外的、修饰的或较少的多核苷酸序列，或者显示其它的表型特征。例如，可能期望转化来源于 COT102 事件的植物材料以产生具有另外性状诸如第二昆虫抗性基因的新事件。这个方法称为基因堆积 (gene stacking)。第二个昆虫抗性基因可以编码例如来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)，嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophilus*)，发光杆状菌 (*Photobacterium luminescens*) 物种的杀虫凝集素，杀虫蛋白酶抑制剂和杀虫蛋白质。

优选地，第二个昆虫抗性基因编码来源于细菌苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的 Cry 基因，该 Cry 基因产生具有和 VIP 不同的作用方式或昆虫肠道中的结合位点的毒素用以控制不同的昆虫物种。本发明进一步提供了来源于 COT102 事件的植物材料，该植物材料具有另外的性状诸如除草剂抗性、线虫抗性或真菌抗性。在一个实施方式中，所述另外性状是除草剂抗性。在进一步实施方式中，所述除草剂抗性性状提供了对包含草甘膦酸或农业学上可接受的其盐的除草剂的抗性。还是在进一步实施方式中，由编码 EPSP 合酶或其突变体的基因提供所述的除草剂抗性性状。

本发明进一步提供了控制昆虫的方法，该方法包括在所述昆虫取食地点，提供来源于 COT102 事件的植物材料。本发明进一步提供了控制昆虫的方法，该方法包括在所述昆虫取食地点，提供来源于 COT102 事件的植物材料，并且给所述植物材料施用其它农用化学品诸如除草剂、杀真菌剂和包括其它杀虫蛋白质的其它杀虫化合物。可能的杀虫化合物的例子包括杀虫凝集素、杀虫蛋白酶抑制剂和来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)，嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophilus*) 或发光杆状菌 (*Photobacterium luminescens*) 物种的杀虫蛋白质。可能的化

学药品的例子包括合成除虫菊酯类、氨基甲酸酯类、吡虫啉、有机氯制剂和大分子诸如多杀菌素，阿维菌素或依马菌素。

然而，根据本发明的另一方面，本发明提供了检测来源于 COT12 转基因事件的植物材料的方法，该方法包括获得用于分析的样品；从样品提取 DNA；提供设计用于结合多核苷酸的引物对，该多核苷酸包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 17 个邻接核苷酸；扩增位于引物结合位点之间的区域；并且检测扩增产物的存在。因为可以得到 SEQ ID NOs 1 和 2，所以可以利用分子生物学领域技术人员熟知的参数，设计该检测方法中使用的适合引物对。例如，可以将引物对的 1 个或 2 个引物设计成载体特异性，性状基因特异性，启动子特异性的，或者对插入 DNA 和基因组 DNA 之间连接处序列特异和/或标记特异性的。在一个实施方式中，所述引物序列如 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所描述。

在本发明一个实施方式中，用所述方法扩增的区域（“扩增子”）长度是在 300 和 1000 碱基对之间。在进一步实施方式中，扩增子长度是在 500 和 900 碱基对之间。还是在进一步实施方式中，扩增子长度是 800 碱基对。在进一步实施方式中，利用上述方法，联合序列 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 引物产生了扩增子，并且其长度是 800 碱基对。

可以联合使用以检测 COT102 事件的可替代引物包括对 COT102 事件特异并且产生 962bp 扩增子的 SEQ ID NOs 18 和 19，对 VIP 基因特异并且产生 556bp 扩增子的 SEQ ID NOs 22 和 23，或者对赋予对抗生素潮霉素抗性的基因特异并且产生 367bp 扩增子的 SEQ ID NOs 24 和 25。

根据本发明的这方面，有许多可以使用的扩增方法。基本的原理，本领域技术人员已知的技术，是聚合酶链式反应（PCR）。典型地在利用琼脂糖凝胶电泳大小分离后，通过用溴化乙锭染色和用 UV 光激发可以观察来自于该 PCR 反应的扩增产物。

本发明的一个实施方式利用了 PCR 原理的变型诸如 TaqMan™。这种方法包括用荧光染料标记参与扩增过程的至少一个引物。当未结合时，引物采取检测不到荧光的构象。然而，当引物结合一段 DNA 时，构象改变，并且可以检测到荧光。用这种方式，可以实时监测扩增过程，荧光的强度直

接对应于扩增的水平。本发明的进一步实施方式包括,但不限于 RACE PCR。

本发明的进一步实施方式包括利用多重 PCR (multiplex PCR) 区分纯合 COT102 植物材料和杂合 COT102 植物材料。本领域技术人员称之为接合性测试 (zygosity testing), 并且其包括结合棉花基因组和/或插入 DNA 的特定部分的 3 种 PCR 引物的使用。用在这种接合性测试中的适合引物被描述为 SEQ ID NOs18 到 20。

本发明的另一个方面提供了检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法, 该方法包括获得用于分析的样品; 提供探针, 该探针被设计成当多核苷酸是单链时结合所述多核苷酸的互补序列, 该多核苷酸包含 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 17 个邻接核苷酸; 杂交所述探针和样品; 并且检测该探针是否已经杂交。在一个实施方式中, 所述探针包括 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 序列。在本发明一个实施方式中提供了利用选自 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 的探针, 检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法。在一个实施方式中, 所述探针包含 SEQ ID NO: 5。在进一步实施方式中, 所述探针由 SEQ ID NO: 5 组成。例如, 探针可以是 PCR 产物或限制消化片段。在进一步实施方式中, 可以用荧光、放射性、酶性或其它适合的标记标记这里所述的探针, 以能够检测到杂交。由于本领域技术人员已经从本公开受益, 所以他们将知道如何设计适合的引物。

在本发明进一步实施方式中, 提供了在严格条件下杂交探针和样品, 并且检测探针是否已经杂交的方法。严格杂交条件是本领域技术人员所熟知的, 并且包括, 例如在约 65°C, 在含有 6 x SSC, 0.01% SDS 和 0.25 % 脱脂奶粉的溶液中杂交, 接着在相同的温度, 在含有 0.2 x SSC 和 0.1 % SDS 的溶液中洗涤。

基于杂交原理, 用于检测来源于 COT102 事件的植物材料的适合技术包括但不限于 Southern 印迹, Northern 印迹和原位杂交。本领域技术人员熟悉这些技术。

典型地, 这些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。做为可替代的方

案，通过底物转化实现颜色变化可以检测酶标记的探针。

在本发明的进一步方面，提供了检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法，该方法包括获得用于分析的样品；提供设计的抗体，该抗体可结合植物中所包含的 VIP 蛋白质，该植物包含来源于 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 的至少 17 个邻接核苷酸；温育所述的抗体和样品；检测是否该抗体已经结合。在本发明的一个实施方式中，所述 VIP 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 序列。

基于所述抗体结合，检测来源于 COT102 事件的植物材料的适合方法包括，但不限于 Western 印迹，酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和 SELDI 质谱分析。本领域技术人员熟悉这些免疫学技术。典型的步骤包括：温育样品和结合 VIP 蛋白质的抗体，冲洗以移除未结合的抗体，和检测是否抗体已经结合。许多这种检测方法是基于酶促反应的，例如可以用酶诸如辣根过氧化物酶标记抗体，并且在应用适合的底物后，检测颜色改变。适合的抗体可以是单克隆或多克隆抗体。

在本发明的另一方面，提供了检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法，该方法包括获得用于分析的样品；制备样品的蛋白质提取物；提供设计用来检测样品中 VIP 蛋白质的存在的检测条；温育检测条和样品；和检测 VIP 蛋白质是否存在。在本发明的一个实施方式中，所述 VIP 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 序列。

用于 COT102 的可替代的基于抗体的检测方法利用测量棒 (dipsticks) 或检测条。典型的步骤包括温育检测条和样品，并且观察检测条上存在或不存在有色条带。有色条带表明样品中蛋白质的存在。这种测量棒 (dipsticks) 或检测条检测是蛋白质特异性的，并且可以用于田地中样品的快速检测。

在本发明的进一步方面，提供了检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法，该方法包括获得用于分析的样品；使物种草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (对 VIP3A 敏感) 的一个或多个昆虫暴露于样品；使物种欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的一个或多个昆虫暴露于样品，做为对照；检测是否样品对来源于每个物种的昆虫具有杀虫作用；并且比较该

结果和真实的 COT102 生物测定模式 (bioassay profile)。利用相同条件的昆虫产生真实 COT102 生物测定模式, 其中, 将该昆虫暴露于相同剂量和类型 COT102 植物材料, 并且在将昆虫暴露于 COT102 样品后相同长度的时间检测杀虫作用。草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 是 COT102 阳性对照, 因为它对适合剂量的 VIP3A 敏感, 而欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 是阴性对照, 因为它对适合剂量的 VIP3A 不敏感。

在本发明一个实施方式中, 检测来源于 COT102 事件的植物材料的方法包括但不限于叶片饲喂的生物测定法, 其中用一种或多种害虫昆虫侵袭 COT102 事件或者来源于 COT102 事件的任何植物材料的叶片或其它适合的植物部分。通过在给定时间期间后估测叶片或植物部分的损害, 估测死亡率或对昆虫的另一种杀虫作用可以进行检测。可以用于这种生物测定的可替代植物部分包括棉铃和棉蕾。可以在田地或温室中进行这种生物测定, 并且可以经历天然或人工昆虫侵袭。

在本发明另一方面, 本发明提供了试剂盒 (kit of parts), 其包含用于检测样品中来源于 COT102 事件的植物材料存在的手段 (means)。优选地, 所述试剂盒包含用于检测样品中多核苷酸或上述多核苷酸编码的蛋白质或 VIP 蛋白质存在的手段, 该多核苷酸包含来源于 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 的至少 17 个邻接核苷酸。在本发明的实施方式中, 所述试剂盒可以包含 DNA 扩增检测技术诸如 PCR 或 TaqMan™。在本发明的进一步实施方式中, 所述试剂盒可以包含探针杂交检测技术诸如 Southern 印迹, Northern 印迹或原位杂交。在本发明另一个实施方式中, 所述试剂盒可以包含抗体结合检测技术诸如 Western 印迹, ELISAs, SELDI 质谱分析或检测条。在本发明的进一步实施方式中, 所述试剂盒可以包含昆虫生物测定检测技术诸如叶片饲喂生物测定或死亡率生物测定。在本发明进一步实施方式中, 所述试剂盒可以包含上述检测技术的任意组合。还是在进一步实施方式中, 所述试剂盒可以以说明书形式包含上述一种或多种方法。

实施例

通过下面非限制性实施例结合下面有关序列列表，本发明将更清楚了。

SEQ ID NO 1: 延伸越过下述连接处的多核苷酸序列，在事件 COT102 中，COT102 插入片段 5' 末端在该连接处插入到棉花基因组中。

SEQ ID NO 2: 延伸越过下述连接处的多核苷酸序列，在 COT102 事件中，COT102 插入片段 3' 末端在该连接处插入到棉花基因组中。

SEQ ID NO 3-4: 适于用做 COT102 事件检测引物的多核苷酸序列。

SEQ ID NO 5-7: 适于用做 COT102 事件检测探针的多核苷酸序列。

SEQ ID NO8: VIP3A 毒素蛋白质的氨基酸序列。

SEQ ID NOs 9-17: 适于用做 COT102 事件检测中的 TaqMan 引物的多核苷酸序列。

SEQ ID NOs 18-20: 适于用做通过接合性测试检测 COT102 事件的引物的多核苷酸序列。

SEQ ID NO 21: 表征 COT102 事件的多核苷酸序列。

SEQ ID NOs 22-25: 适于用做 COT102 事件检测引物的多核苷酸序列。

实施例 1: 克隆和转化

1.1 载体克隆

使用从自制载体限制消化和片段连接的标准基因克隆技术构建转化载体 pNOV3001。该载体包含选择性标记盒，该标记盒包含泛素 (UBQ3) 启动子、UBQ3 内含子、编码赋予潮霉素抗性的蛋白质的基因序列和 nos 聚腺苷酸化序列。该载体也包含靶基因表达盒，该表达盒包含肌动蛋白 (Act2) 启动子、Act2 内含子、密码子已经被优化用于玉米中表达的编码 VIP3A 基因的序列和 nos 聚腺苷酸化序列。选择性标记盒和包含 VIP3A 的盒子被克隆到载体 pNOV3001 的 T-DNA 区中，位于左和右边界序列之间。为了进行原核生物筛选，该载体也包含赋予对抗生素，壮观霉素抗性的基因。

利用标准农杆菌属 (*Agrobacterium*) 转化技术，将该载体转化到根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 株系 EHA101 中，并且通过转化细胞对壮观霉素的抗性筛选它们。

1.2 植物转化

通过农杆菌介导的陆地棉栽培品种 Coker312 (*Gossypium hirsutum* L. cv Coker 312) 转化产生 COT102 事件。

利用足以覆盖要消毒种子量的乙醇，在 70% 乙醇中对 Coker 312 种子进行表面消毒 30 秒。用乙醇洗种子，在无菌水中漂洗，并且浸泡在 12%Clorox+吐温 20 溶液中 20 分钟。进行 3 次这种洗涤程序。然后，将种子放置在发芽培养基上 (Stewart 和 Hsu, 1977)，并且允许在 30℃ 萌发 7-10 天。

在适合的抗生素中过夜培养 2ml 含有 pNOV3001 构建体的农杆菌培养物，然后在无菌培养皿中用 MSNH 培养基 (19:1) 稀释。将下胚轴切割成 6-8mm 长，并且放置在稀释的农杆菌溶液中至少 30 秒。从农杆菌溶液中移走下胚轴外植体，在无菌滤纸上吸干以除去过量的细菌。将下胚轴放置在 T2 培养基 (MS 盐, B5 维生素, 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 细胞分裂素, 30g/L 葡萄糖, 2g/L Phytigel-pH 5.8) 上，并且在黑暗中与农杆菌共培养 72 小时。

再一次在无菌滤纸上吸干下胚轴外植体，并且转移到含有 MS2NK 培养基 (MS 盐, B5 维生素, 2mg/L NAA, 0.1 mg/L 细胞分裂素, 30 g/L 葡萄糖, 2 g/L Phytogel, 500 mg/L 头孢噻肟, 10mg/L 潮霉素-pH 5.8) 的平板上。用 parafilm 包裹该平板，并且在 30℃，在光照下温育几个月直到形成愈伤组织。

将愈伤组织分割得尽可能地小，并且放置在含有 10ml 液体 MSNH 培养基 (MS 盐, B5 维生素, 30g/L 葡萄糖-pH 5.8) 的 50ml 锥形瓶中。在 30℃，在光照下，以 110rpm 振荡悬浮的愈伤组织直到可以观察到小白色稍微圆形的细胞簇为止。洗细胞，并且铺在固体 MSNH 培养基 (MS 盐, B5 维生素, 30g/L 葡萄糖, 2 g/L Phytogel -pH 5.8) 平板上。每月检查平板的体细胞胚发育。

从平板挑取成熟的体细胞胚，并且放置在含有 SA 培养基 (Stewart 和 Hsu 盐, 20 g/L 蔗糖, 20 g/L 琼脂-pH 5.8) 的平板上。将胚平板放置在黑暗中大约 14 天。修剪成熟胚的根，并且将胚转移到 SGA 培养基

(Stewart 和 Hsu 盐, 5 g/L 蔗糖, 1.5 g/L Phytigel, 5 g/L 琼脂-pH 6.8)。

第一片真叶出现后, 将年幼的植物移到含有 SGA 培养基的小型罐头瓶中。当植物达到 7-10cm 高度时, 切下顶部, 并且转移到另一个罐头瓶中。当发育出良好的根系时, 将这样生根的插条移植到盆中, 并且在温室中培养。

1.3 转基因学的鉴定和筛选

用 PCR 筛选推定的转基因植物的 VIP3A 基因的存在。利用抗草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 的杀昆虫活性通过昆虫生物测定法鉴定和筛选阳性事件 (参见实施例 7)。通过 TaqMan™ 分析表征杀昆虫品系的拷贝数 (参见实施例 2)。在田间试验中观察来源于 3 个单拷贝 & 2 个双拷贝事件的 T1 种子的昆虫抗性和农艺学性状。根据具有单拷贝转基因、通过 ELISA 鉴定到的良好蛋白质表达 (参见实施例 4)、抗谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*) 的良好杀昆虫活性和田间性能, 选定了两个事件 COT101 和 COT102。在田间试验第二年末, 比较两个事件的结果, COT102 是进步的。

1.4 COT102 序列的证实

从 COT102 事件分离基因组 DNA。利用该基因组 DNA, 利用标准 DNA 测序技术, 测序在 COT102 事件中 DNA 插入位点和棉花基因组 DNA 的连接处。

实施例 2: 用 TaqMan™ 进行 COT102 检测

2.1 DNA 提取

利用 Wizard™ Magnetic 96 DNA 植物系统 (Promega, #FF3760), 根据制造商的说明书, 从叶片组织提取 DNA, 同时在开始该方法前进行下面附加的步骤: 研磨叶片材料后, 向每个孔添加 0.9ml 棉花提取缓冲液 (0.2M Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 0.25M NaCl, 0.1% v/v 2-巯基乙醇, 2.5% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮), 重悬浮植物组织, 以 4,000rpm (2755g) 离心该板 10 分钟。吸取和弃掉上清液后, 添加 300 μl 裂解缓冲液 A (Promega), 并且从这点以后利用制造商的方案。该方法产生了大约 85 μl 纯化的基因组 DNA, 浓度大约是 10ng/μl。

2.2 TaqMan PCR 反应

利用标准反应混合物建立 TaqMan™ PCR 反应, 该反应混合物包含:
 625 μ l 2x 用于 Q-PCR 的 Jumpstart Master Mix (Sigma, #P2893), 补加
 有 15mM MgCl₂ 和 200nM Strata-ROX
 25 μ l 50x FAM 引物/探针混合物
 25 μ l 50x TET 引物/探针混合物
 200 μ l 水。

50x 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 1x TE, 并且在 4°C, 贮藏在琥珀试管中。所使用的适宜引物/探针序列组合的例子是:

<u>引物名称</u>	<u>引物序列 5' -3'</u>	<u>SEQ ID</u>
GhCHI2b-F 正向	GGTCCCTGGATACGGGTGTCA	SEQ ID NO: 9
GhCHI2b-R 反向	TTGAGGGTTGGATCCTTTGC	SEQ ID NO: 10
GhCHI2b-TET 探针	CCAACATCATCAATGGTGGCATCGAAT (5' 标记 = TET, 3' 标记 = TAMRA)	SEQ ID NO: 11
潮霉素-F 正向	CAGGCAGGTCTTGCAACGT	SEQ ID NO: 12
潮霉素-R 反向	CGAGAGCCTGACCTATTGCAT	SEQ ID NO: 13
潮霉素-FAM 探针	ACACCCTGTGCACGGCGGG (5' 标记 = FAM, 3' 标记 = TAMRA)	SEQ ID NO: 14
Vip3-F 正向	ATGAAGACCCTGCGCTACGA	SEQ ID NO: 15
Vip3-R 反向	ACGCCAGTGGCATGTAGA	SEQ ID NO: 16
Vip3-FAM 探针	AGCGAGGCCGAGTACCGCACC (5' 标记 = FAM, 3' 标记 = TAMRA)	SEQ ID NO: 17

将 7 μ l Master Mix 分配到 384 孔 TaqMan™ 测定板的每个孔中。向适合的孔添加 3 μ l DNA 模板。将 3 μ l 拷贝对照稀释系列添加到特定孔中做为对照。利用下面的循环条件，在 ABI7900 (Applied Biosystems) 中进行反应：

步骤	温度	时间
1	50℃	2 分钟
2	95℃	10 分钟
3	95℃	15 秒
4	60℃	1 分钟
5	回到步骤 3, 重复 40 次	

利用 SDS2.0 软件 (Applied Biosystems) 分析数据。

实施例 3: 通过 PCR 进行 COT102 检测

3.1 基因组 DNA 提取

如实施例 2.1 中所述从 COT102 提取基因组 DNA。

3.2 多重 PCR 接合性测定

设计 PCR 引物以结合 COT102 盒插入位点上游的棉花基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO: 18); COT102 盒序列本身 (SEQ ID NO: 19); 和插入 COT102 序列时置换的棉花基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO: 20)。当存在 COT102 插入片段时，引物对 SEQ ID NO: 18 和 19 扩增 962bp 大小的 PCR 片段。对于每个待检测的样品建立如下 50 μ l PCR 反应：

1x JumpState ReadyMix REDTaq PCR (SigmaP-1107)	25 μ l
40 pmole 引物 1 (SEQ ID NO: 18)	4 μ l
40 pmole 引物 2 (SEQ ID NO: 19)	4 μ l
40 pmole 引物 3 (SEQ ID NO: 20)	4 μ l
40 ng 基因组 DNA	4 μ l
ddH ₂ O	9 μ l

在热循环仪中 94℃ 加热 PCR 反应物 2 分钟，接着进行下面的 35 个循环：94℃，30 秒，60℃，30 秒，72℃，1 分钟。通过在 72℃ 加热 5 分钟

完成反应。

3.3 分析

在琼脂糖凝胶上电泳 PCR 反应物，并且用溴化乙锭染色后，在 UV 光下观察 DNA 条带。3 条条带的存在表明样品是 COT102 纯合植物；2 条带（其中一条带是 962bp 大小）表明样品是 COT102 杂合植物；2 条带（没有 962bp 大小的条带）表明样品是纯合野生型棉花植物。

3.4 事件特异性 PCR

设计一种 PCR 引物以结合 VIP3A 基因的 3' 末端 (SEQ ID NO: 3)。设计另一种 PCR 引物以结合 COT102 插入位点 3' 末端下游的侧翼基因组 DNA 序列的互补链 (SEQ ID NO: 4)。利用 COT102 基因组，在 PCR 反应中一起使用这些引物，产生 800bp 片段扩增物。当该引物用在利用 Coker312 未转化棉花基因组 DNA 样品的 PCR 反应中时，没有片段被扩增。

在第二对引物中，设计一种引物以结合潮霉素基因 (SEQ ID NO: 19)，并且设计另一种引物以结合 COT102 插入位点 5' 末端上游的侧翼基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO: 18)。在利用 COT102 基因组 DNA 的 PCR 反应中一起使用这些引物，产生 962bp 片段扩增物。当该引物用在利用 Coker312 未转化棉花基因组 DNA 样品的 PCR 反应中时，没有片段被扩增。

实施例 4: 通过 Southern 印迹进行 COT102 检测

4.1 用于 Southern 印迹的 DNA 提取

利用研钵和研杵，在液氮中研磨大约 5 到 10g 植物组织。在 12.5ml 提取缓冲液 A (0.2M Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 0.25M NaCl, 0.1% v/v β -巯基乙醇, 2.5% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮) 中重悬浮植物组织，以 4,000rpm 离心 10 分钟 (2755g)。弃掉上清液后，在 2.5ml 提取缓冲液 B (0.2M Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 0.5M NaCl, 1% v/v β -巯基乙醇, 2.5% w/v 聚乙烯-吡咯烷酮, 3% 肌氨酸, 20% 乙醇) 中重悬浮沉淀，并且在 37°C 温育 30 分钟。在温育期间，用无菌环混合样品一次。温育后，添加等体积的氯仿/异戊醇 (24:1)，通过倒置轻轻混合，以 4,000rpm 离心 20 分钟。收集

含水层，并且在添加 0.54 体积异丙醇后以 4,000rpm 离心 5 分钟以沉淀 DNA。弃掉上清液，并且在 500 μ l TE 中重悬浮 DNA 沉淀。为了降解任何存在的 RNA，在 37°C，将 DNA 和 1 μ l 30mg/ml RNAase A 温育 30 分钟，以 4,000rpm 离心 5 分钟，并且在 0.5 体积 7.5M 醋酸铵和 0.54 体积异丙醇存在的情况下，通过以 14,000rpm 离心 10 分钟沉淀 DNA。弃掉上清液后，用 500 μ l 70% 乙醇洗沉淀，并且使其干燥后在 100 μ l TE 中重悬浮。

4.2 限制酶消化

利用分光光度计或荧光计定量 DNA（利用 1xTNE 和 Hoechst 染料）。在总体积 50 μ l 中，每次消化利用 8 μ g DNA，制备适宜的酶消化产物。消化包括 *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nco*I, *Sac*I, *Sca*I, *Spe*I 和 *Pst*I 的单独和组合。特别地，*Bam*HI 和 *Eco*RI 双消化用于检测 VIP3A 基因的完整性；*Bam*HI 和 *Eco*RV 双消化用于检测 VIP3A 基因座数和潮霉素基因的完整性；*Bam*HI 单消化用于检测 VIP3A 基因座数量。对于每种酶，在适当的温度下温育过夜消化物。以真空离心蒸发浓缩器（speed vacuum）旋转样品以减少体积到 30 μ l。

4.3 凝胶电泳

向来源于上述 4.2 的每个样品添加溴酚蓝加样染料，并且将每个样品加样到含有溴化乙锭的 0.8% TBE 琼脂糖凝胶上。在 60 伏特下电泳凝胶过夜。

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

4.4 杂交

用 PCR 制备适合的 DNA 探针。在 45 μ l TE 中煮沸 25ng 探针 DNA 5 分钟,放置在冰上 7 分钟,然后转移到 Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633)试管中。向 Rediprime 试管添加 5 μ l P32 标记的 dCTP 后,在 37 $^{\circ}$ C 温育探针 15 分钟。根据制造商的说明书,通过微离心 G-50 柱子 (Amersham Pharmacia Biotech, #27-5330-01) 离心,以移除未掺入的 dNTPs,纯化该探针。利用闪烁计数器测量探针活性。

通过在 65 $^{\circ}$ C 用 20ml 预加温的 Church 预杂交溶液 (500mMNaPO₄, 1mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA) 湿润该 Hybond 膜 30 分钟,预杂交该 Hybond 膜。煮沸标记的探针 5 分钟,并且放置在冰上 10 分钟。向预杂交缓冲液添加适合量的探针 (每 1ml 预杂交缓冲液 1 百万次计数),在 65 $^{\circ}$ C 过夜进行杂交。第二天,弃掉杂交缓冲液,在用 20ml Church 冲洗溶液 1 (40mMNaPO₄, 1mM EDTA, 5% SDS, 0.5% BSA) 漂洗后,在 65 $^{\circ}$ C,在 150ml Church 冲洗溶液 1 中洗膜 20 分钟。用 Church 冲洗溶液 2 (40mMNaPO₄, 1mM EDTA, 1% SDS) 重复该过程 2 次。将该膜暴露于磷光屏或 X 光片以检测探针结合的位置。

实施例 5: 通过 ELISA 进行 COT102 检测

5.1 蛋白质提取

收获用于分析的棉花植物组织,并且在 -70 $^{\circ}$ C 冷冻。将新鲜组织研磨成细粉末,并且称重,放入标记的聚丙烯试管中。对于新鲜组织以 2:1 比率 (提取缓冲液体积: 样品鲜重),或者对于冻干组织以 30:1 比率 (提取缓冲液体积: 样品干重),向样品添加提取缓冲液 (100mM Tris, 100mM 硼酸钠, 5mM MgCl₂, 0.05% 吐温 20, 0.2% 抗坏血酸钠, 水, pH 7.8, 1mM AEBSF, 0.001mM 亮抑酶肽)。利用装配有 PTA 10TS 减少泡沫发生器的 Brinkman PT10/35 Polytron 漩涡样品和匀浆,直到混合物变成液态为止。以 10,000 xg 离心提取物 15 分钟。蛋白质提取物上清液贮藏在 2-8 $^{\circ}$ C。

5.2 ELISA 方法

ELISA 方法使用了下面的标准技术。在乙醇中浸泡 96 孔板 2 小时,

并且空气干燥。用每孔 50 μ l 山羊抗 VIP3A 抗体包被该板，并且在 2-8 $^{\circ}$ C 过夜温育。用 1X ELISA 冲洗缓冲液(100mM Tris, 0.5%吐温-20, 75mM NaCl, pH8.5) 冲洗 3 次后，通过简单地在纸巾上倒置轻拍，干燥该板。向每孔添加 150 μ l 封闭溶液(10mM NaPO₄, 140mM NaCl, 1% BSA, 0.02%叠氮化钠，用单碱价的 NaPi 和二碱价的 NaPi 滴定到 pH7.4)，接着在室温下温育 45 分钟。如上所述冲洗该板 3 次。

VIP3A 标准和蛋白质提取物样品一式三份地施用到该板的适合孔中，每孔 50 μ l 总体积。在 2-8 $^{\circ}$ C 温育该板 1 小时 30 分钟，接着室温下进一步温育 30 分钟。用 ELISA 冲洗溶液冲洗该板 3 次，然后在 35-39 $^{\circ}$ C 与每孔 50 μ l 兔抗 VIP3A 抗体温育 1 小时。用 ELISA 冲洗缓冲液冲洗该板 3 次，并且在室温下与每孔 50 μ l 驴抗兔碱性磷酸酶温育 30 分钟。接着，用 ELISA 冲洗溶液再冲洗 3 次，向每孔添加 50 μ l 磷酸酶底物溶液，并且在室温下温育该板 30 分钟。通过向每孔添加 50 μ l 3M NaOH 终止反应。在 405nm，利用 Ceres 900C 多孔板读数器测量每孔中溶液的吸光度，利用 KC3 曲线拟合软件(Bio-Tek Instruments Inc.) 分析结果。通过参照 VIP3A 蛋白质标准品，计算样品中 VIP3A 的浓度。

实施例 6: 通过测量棒(dip stick)进行 COT102 检测

6.1 蛋白质提取

将约 2cm² 的一片叶片组织放置在含有提取缓冲液的试管中。通过用塑料搅拌器切割和浸解(macerate)组织，从组织提取蛋白质。

6.2 测量棒检测

检测条被放置在试管中，并且温育 5-10 分钟以产生结果。检测条包含抗 VIP3A 抗体结合的第一条带，和对照抗体结合的第二条带。温育后，检测条结果视窗中双红色线表明存在 VIP3A。下边的线表明 Vip3A 蛋白质的存在，而下边的线是对照，表明该检测方法正确地工作。

实施例 7: 通过昆虫生物测定进行 COT102 检测

7.1 叶片生物测定

按如下所述，对草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)，谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*) 和烟蚜夜蛾 (*Heliothis virescens*) 进行叶片测定：用 300 μ l 到 500 μ l 蒸馏水浸泡垫片，并且放置在 Gelman 皿中。从 8 到 12 英寸高的棉花植物切下测量的约 0.5 平方英寸到 0.75 平方英寸之间的叶片，并且放置在垫片上。在每个皿中放置 8 到 10 条昆虫幼虫，用盖子盖住该皿。在 28°C 温育该皿。在侵袭后第 3 和第 6 天，计数每个皿中叶片的损害，并且与对照植物比较。

7.2 棉铃生物测定

用水饱和 4 个吸水垫，并且放置在大塑料杯里面。每个用 100 μ l 蒸馏水浸泡的另外 3 个厚玻璃滤器放置在小玻璃杯中，该小玻璃杯装在大玻璃杯里面。切下 1.25 英寸长的棉铃，浸入在 10mg/ml 到 20mg/ml 制霉菌素 (Nystatin) 中，并且放置在小玻璃杯中滤器上。将 50 条昆虫幼虫放置在棉蕾或棉铃上，并且用盖子盖上大玻璃杯。7 天后，用外加 50 条幼虫再次侵袭棉蕾或棉铃。

在室温下温育该试验大约 3 周。然后切开棉铃以检测损害。将棉铃的损害与对照样品比较。

7.3 冻干叶片生物测定

如下，利用冷冻干燥的叶组织，对烟蚜夜蛾 (*Heliothis virescens*) 进行生物测定：

在摘取叶片时，在干冰上快速冷冻末端叶，并且过夜冻干。在研钵和研杵中将冷冻干燥的组织研磨成细粉末，并且重悬浮在 0.2% 琼脂溶液中以制备 8% (0.08g/ml) 叶粉末悬浮液。将悬浮液覆盖在 96 孔板中人工昆虫饵料上面，并且让其干燥。向每个孔放入单条新生昆虫幼虫，并且密封该板。在 28°C，温育该板。在侵袭后第 6 天，计数幼虫的死亡率，并且与对照样品比较。所获得的结果如下：

品种	% 叶粉末悬浮液	% 幼虫死亡率 (5 次检测的平均值)
Coker312	8	6.7
COT102	8	98.3

序列表

5 <110> SYNGENTA LIMITED

10 <120> COT102 杀虫棉花

<130> 70159

15 <160> 25

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 26

<212> DNA

30 <213> 人工序列

35 <220>

<223> COT102 核苷酸基序

<400> 1

40 ggcaaattatt caggtaaaca aattga
26

45 <210> 2

<211> 26

<212> DNA

50 <213> 人工序列

<220>
<223> COT102 核苷酸基序

5 <400> 2
ctatcagtgt ttaataaata tgggca
26

10 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
15 <213> 人工序列

20 <220>
<223> COT102 核苷酸基序

<400> 3
25 aaggacgtga gcgagatggt
20

<210> 4
30 <211> 20
<212> DNA
35 <213> 人工序列

<220>
40 <223> COT102 核苷酸基序

<400> 4
45 tgtgacaccg atccacctaa
20

<210> 5
50 <211> 290
<212> DNA
<213> 人工序列
55

<220>

5 <223> COT102 核苷酸基序

<400> 5
gacaaggaca gcttgagcga ggtgatctac ggcgacatgg acaagctgct gtgtccggac
60

10
cagagcgagc aaatctacta caccaacaac atcgtgttcc cgaacgagta cgtgatcacc
120

15
aagatcgact tcaccaagaa gatgaagacc ctgcgctacg aggtgaccgc caacttctac
180

20
gacagcagca ccggcgagat cgacctgaac aagaagaagg tggagagcag cgaggccgag
240

25
taccgcaccc tgagcgcgaa cgacgacggc gtctacatgc cactgggctg
290

<210> 6

25 <211> 347

<212> DNA

30 <213> 人工序列

<220>

35 <223> COT102 核苷酸基序

<400> 6
cgccgtgcac aggggtgtcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc cgctgttctg
40 60

cagccggtcg eggaggecat ggatgcgatc gctgcggccg atcttagcca gacgagcggg
120

45
ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggc caatacacta atggcgtgat ttcatatgcg
180

50
cgattgctga tccccatgtg tatcaactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt
240

55
ccgtgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc
300

acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaat
347

<210> 7
 5 <211> 7474
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 10
 <220>
 15 <223> COT102 核苷酸基序
 <400> 7
 gtaaacaat tgacgcttag acaacttaat aacacattgc ggacgttttt aatgtaagcc
 60
 20 atgctggccg cccgggttac ccaattcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga
 120
 taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg
 25 180
 cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgtaattat
 240
 30 tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg
 300
 attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tcggggaaat tcggggatcc
 360
 35 cggtcggcat ctactctatt cctttgccct cggacgagtg ctggggcgtc ggtttccact
 420
 atcggcgagt acttctacac agccatcggc ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg
 40 480
 tgtacgcccg acagtcccgg ctccggatcg gacgattgcg tcgcatcgac cctgcgcca
 540
 45 agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa gctctgatag agttggtcaa gaccaatgcg
 600
 gagcatatac gcccgagacc gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta
 660
 50 gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca eggctccag aagaagatgt tggcgacctc
 720
 gtattgggaa tccccgaaca tcgctctgct ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt
 55 780

gtccgtcagg acattgttgg agccgaaatc cgcgtgcacg aggtgccgga cttcggggca
840

5 gtccctcggcc caaagcatca gtcctatcgag agcctgcgcg acggacgcac tgacgggtgc
900

gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg
960

10 ccatgtagtg tattgaccga ttccttgcg tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct
1020

aagatcggcc gcagcgatcg catccatggc ctccgcgacc ggctgcagaa cagcggggcag
15 1080

ttcggtttca ggcaggtctt gcaacgtgac accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt
1140

20 caggctctcg ctgaatgcc caatgtcaag cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc
1200

aaagtgccga taaacataac gatctttgta gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcgag
1260

25 gacatatcca cgcctccta catcgaagct gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag
1320

ctgcatcagg tcggagacgc tgtcgaactt ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc
30 1380

ggtgagttca ggctttttca tatcttattg cccccctaga gtcgagatcc acctgaaata
1440

35 aaacaataga acaagtagaa accaatcagc gaacatatac caaatcaaaa gccgtaagag
1500

aatcaaaaac aacaccaag agaaacggat ctaaacataa gaaacctaaa acagagagaa
1560

40 tcgaacaaag aaaacacaaa aattgaatag atcgtccttg aaaatcctaa tttcacaatc
1620

aagcaagaaa ttacacagat gtaaacacta cgaatcgata tcttagtaat caggacaaaa
45 1680

tttagaagct ggattgacga aacgaacaat attgtcaaaa gcaatttata caaaagattc
1740

50 aataatccac ataacaaaaa ttggagatca gatcgaatc aaaaacaaaa agaatcagaa
1800

aatatacctt gaaagagaga gtcgcgagag atttgacagag atcgcttttag gctttgggag
1860

55

agattgaaga gtcagaaaaa gacgaaagga tgaattatta tcttcacac gaaggtcttc
1920

5 tttatatcgc aaacccaaaag cccaaaaccg tcttttctat taatgagaat aaaatatctt
1980

tagccaaaac aaaaaaagga agatatcagt tgaggattat tatcacgaaa ctaaaggaag
2040

10 gaatcatatg atacgtgtca tattttccac cgtgcgtttt taaaagaccg actcaagtag
2100

aaacatccta tgggtgggtgtg tggattaggt catccattac atctgcttca ctgacatttt
2160

15 totatttttc tttttgtata tacttttctt caataattt ctttcttttc tatagaagaa
2220

tttaatcaat aaggaaaaag ttcaaaaaag attctttcca ttaagactat gtcttggtta
2280

20 acccaacca ttaagaataa gcaatcataa tatatataga gaatactaat actatatatg
2340

25 agatttttct ttttaattca tgttgattat gatagtttat cttcttgatt taatttatca
2400

atacttggca taaaagattc taatctactc taataaagaa aagaaaaaaa agtatctacc
2460

30 attgactaat taaaataagg aaacttatct accaaatttg agtatttttt agaacaatct
2520

ttttggttta attccaaaac tctaaaccta attgttggga aaaaggacct aatttttaag
35 2580

aaaagttaat aattagaaga tctgtatggt tttttttgat ccaagttttt atttcttttc
2640

40 tctttttttc atgataaaat ctatgttttt ttagtctaca attaaagtaa ttgttattat
2700

tttctttatc tttttttggt gttggtgta attccttttt ttttttttaa cagcaacttc
2760

45 ttataaaaaa aaacagttgg gccttgaatt tatttcaggc ctgcgttatt aagcccagat
2820

aataactcaa aacaaaaaaa atggtgaacc ggaataaacc cgcgagatta aatgccggtt
50 2880

ttcaggtaac atagaagaag aatatatgag gattgaagaa gtattcaaga ggcggaacaa
2940

ttcacaagtc caagagctta aattttctct cactctcttg ctacagactc ggaactcttt
 3000

5 ctcttttgcta aaataagatg ttcaggattt ttgttgcccg acaattcatg tatctcacac
 3060

tctctctctt ctctgttctt actactctgt tacattacca ccaactcaag actttcttcc
 3120

10 acaatggcgt ttatgagact tggctccaaa tccgggtaccg gagctcgaat tcgaagcttg
 3180

catgcctgca gtgatcacca tggctgacaa aatttagaac gaacttaatt atgatctcaa
 3240

15 atacattgat acatatctca tctagatcta gggtatcatt atgtaagaaa gttttgacga
 3300

atatggcacg acaaaatggc tagactcgat gtaattggta tctcaactca acattatact
 20 3360

tataccaaac attagttaga caaaatttaa acaactatct tttatgtatg caagagtcag
 3420

25 catatgtata attgattcag aatcgttttg acgagttcgg atgtagtagt agccattatt
 3480

taatgtacat actaatcgtg aatagtgaat atgatgaaac attgtatctt attgtataaa
 3540

30 tatccataaa cacatcatga aagacacttt ctttcacggt ctgaattaat tatgatataa
 3600

ttctaataga aaacgaatta aattacgttg aattgtatga aatctaattg aacaagccaa
 35 3660

ccacgacgac gactaacgtt gcctggattg actcggttta agttaaccac taaaaaacg
 3720

40 gagctgtcat gtaacacgcg gatcagcag gtcacagtca tgaagccatc aaagcaaaaag
 3780

aactaatcca agggctgaga tgattaatta gtttaaaaat tagttaaacac gagggaaaag
 3840

45 gctgtctgac agccaggtea cgttatcttt acctgtggtc gaaatgattc gtgtctgtcg
 3900

attttaatta tttttttgaa aggccgaaaa taaagttgta agagataaac ccgcctatat
 50 3960

aaattcatat attttctct ccgctttgaa ttgtctcgtt gtcctctca ctttcatcag
 4020

ccgttttgaa tctccggcga cttgacagag aagaacaagg aagaagacta agagagaaag
4080

5 taagagataa tccaggagat tcattctccg ttttgaatct tcctcaatct catccttctc
4140

cgctctttct ttccaaggta ataggaactt tctggatcta ctttatttgc tggatctcga
4200

10 tcttgttttc tcaatttctt tgagatctgg aattcgttta atttggatct gtgaacctcc
4260

actaaatctt ttggttttac tagaatcgat ctaagttgac cgatcagtta gctcgattat
4320

15 agctaccaga atttggcttg accttgatgg agagatccat gttcatgtta cctgggaaat
4380

gatttgata tgtgaattga aatctgaact gttgaagtta gattgaatct gaacactgtc
20 4440

aatgtagat tgaatctgaa cactgtttaa ggtagatga agtttggtga tagattcttc
4500

25 gaaactttag gatttgtagt gtcgtacgtt gaacagaaag ctatttctga ttcaatcagg
4560

gtttatttga ctgtattgaa ctctttttgt gtgtttgag ctcataaaaa ggatccacca
4620

30 tgaacaagaa caacaccaag ctgagcacc gcgccctgcc gagcttcac gactacttca
4680

acggcatcta cggcttcgcc accggcatca aggacatcat gaacatgatc ttcaagaccg
35 4740

acaccggcgg cgacctgacc ctggacgaga tcctgaagaa ccagcagctg ctgaacgaca
4800

40 tcagcggcaa gctggacggc gtgaacggca gcctgaacga cctgatcgcc cagggcaacc
4860

tgaacaccga gctgagcaag gagatcctta agatcgccaa cgagcagaac caggtgctga
4920

45 acgacgtgaa caacaagctg gacgccatca acaccatgct gcgcgtgtac ctgccgaaga
4980

tcaccagcat gctgagcgac gtgatgaagc agaactacgc cctgagcctg cagatcgagt
50 5040

acctgagcaa gcagctgcag gagatcagcg acaagctgga catcatcaac gtgaacgtcc
5100

tgatcaacag caccctgacc gagatcaccc cggcctacca gcgcatcaag tacgtgaacg
5160

5 agaagttcga agagctgacc ttcgccaccg agaccagcag caaggtgaag aaggacggca
5220

gcccggcoga catcctggac gagctgaccg agctgaccga gctggcgaag agcgtgacca
5280

10 agaacgacgt ggacggcttc gagttctacc tgaacacctt ccacgacgtg atggtgggca
5340

acaacctgtt cggccgcagc gccctgaaga ccgccagcga gctgatcacc aaggagaacg
5400

15 tgaagaccag cggcagcgag gtgggcaacg tgtacaactt cctgatcgtg ctgaccgccc
5460

tgcaggccca ggccttcctg accctgacca cctgtcgcaa gctgctgggc ctggccgaca
20 5520

tcgactacac cagcatcatg aacgagcact tgaacaagga gaaggaggag ttccgcgtga
5580

25 acatcctgcc gaccctgagc aacaccttca gcaacccgaa ctacgccaaag gtgaagggca
5640

gcgacgagga cgccaagatg atcgtggagg ctaagccggg ccacgcgttg atcggcttcg
5700

30 agatcagcaa cgacagcatc accgtgctga aggtgtacga ggccaagctg aagcagaact
5760

accaggtgga caaggacagc ttgagcgagg tgatctacgg cgacatggac aagctgctgt
35 5820

gtccggacca gagcgagcaa atctactaca ccaacaacat cgtgttcccc aacgagtacg
5880

40 tgatcaccaa gatcgacttc accaagaaga tgaagaccct gcgctacgag gtgaccgcca
5940

acttctacga cagcagcacc ggcgagatcg acctgaacaa gaagaaggctg gagagcagcg
6000

45 aggccgagta ccgcaccctg agcgcgaacg acgacggcgt ctacatgcca ctgggcgtga
6060

tcagcgagac cttcctgacc ccgatcaacg gctttggcct gcaggccgac gagaacagcc
50 6120

gctgatcac cctgacctgt aagagctacc tgcgcgagct gctgctagcc accgacctga
6180

gcaacaagga gaccaagctg atcgtgccac cgagcggctt catcagcaac atcgtggaga
6240

5 acggcagcat cgaggaggac aacctggagc cgtggaaggc caacaacaag aacgcctacg
6300

tggaccacac cggcggcgtg aacggcacca aggcctgta cgtgcacaag gacggcggca
6360

10 tcagccagtt catcggcgac aagctgaagc cgaagaccga gtacgtgatc cagtacaccg
6420

tgaagggcaa gccatcgatt cacctgaagg acgagaacac cggctacatc cactacgagg
6480

15 acaccaaaa caacctggag gactaccaga ccatcaaaa gcgcttcacc accggcaccg
6540

acctgaaggg cgtgtacctg atcctgaaga gccagaacgg cgacgaggcc tggggcgaca
20 6600

acttcatcat cctggagatc agcccagcgc agaagctgct gagcccggag ctgatcaaca
6660

25 ccaacaactg gaccagcacc ggcagcacca acatcagcgg caacaccctg accctgtacc
6720

agggcggccg cggcatcctg aagcagaacc tgcagctgga cagcttcagc acctaccgcg
6780

30 tgtacttcag cgtgagcggc gacgccaacg tgcgcatccg caactcccgc gaggtgctgt
6840

tcgagaagag gtacatgagc ggcgccaagg acgtgagcga gatgttcacc accaagttcg
35 6900

agaaggaaa cttctacatc gagctgagcc agggcaaaa cctgtacggc ggcccgatcg
6960

40 tgcacttcta cgacgtgagc atcaagtagg agctctagat cccgaattt cccgatcgt
7020

tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt
7080

45 atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg
7140

ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata
50 7200

gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcgggtgc atctatgtta
7260

```

ctagatcggg aattgggtac cgagctcgaa ttcggcgcgc ccaattgatt taaatggccg
7320

ctgcgggccaa ttctgcagc gttgcgggttc tgcagttcc aaacgtaaaa cggcttgtcc
5 7380

cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt
7440

10 cgtttccgc cttcagttta aactatcagt gttt
7474

<210> 8
15 <211> 789
<212> PRT
20 <213> 人工序列

<220>
25 <223> VIP3A 蛋白质基序
<400> 8

30 Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
35 20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
40 35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
50 55 60

45 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80

50 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
55 100 105 110

```

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 5

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140

10

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160

15

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175

20

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190

25

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205

30

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220

35

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240

40

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255

45

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270

50

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr
 275 280 285

55

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320

55

Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala

	325					330						335				
5	Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Ala	Lys	Met	Ile	Val	Glu	Ala	Lys
			340						345					350		
10	Pro	Gly	His	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr
			355					360					365			
15	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp
		370					375					380				
20	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Leu
	385					390					395					400
25	Cys	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Val	Phe
				405						410					415	
30	Pro	Asn	Glu	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Met	Lys
			420						425					430		
35	Thr	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly
		435						440					445			
40	Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Tyr
	450						455					460				
45	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Asp	Gly	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val
	465					470					475					480
50	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Ala
					485					490					495	
55	Asp	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg
			500						505					510		
60	Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile
		515						520					525			
65	Val	Pro	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	Ser	Ile
		530					535					540				

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560

5 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575

10 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590

15 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620

20 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640

25 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655

30 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670

35 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700

40 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720

45 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735

50 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750

55 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
 770 775 780

5
 Asp Val Ser Ile Lys
 785

10 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> 人工序列

20 <220>
 <223> COT102 核苷酸基序
 <400> 9
 25 ggtccctgga tacgggtgca
 20

30 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> 人工序列

40 <220>
 <223> COT102 核苷酸基序
 <400> 10
 45 ttgagggttg gatcctttgc
 20

50 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 55 <213> 人工序列

<220>
 5 <223> COT102 核苷酸基序
 <220>
 <221> modified_base
 10 <222> (1)..(1)
 <223> 5' 端的 TET 标记
 15
 <220>
 <221> modified_base
 20 <222> (27)..(27)
 <223> 3' 端的 TAMRA 标记
 25
 <400> 11
 ccaacatcat caatggtggc atcgaat
 27
 30
 <210> 12
 <211> 19
 35 <212> DNA
 <213> 人工序列
 40
 <220>
 <223> COT102 核苷酸基序
 45 <400> 12
 caggcaggtc ttgcaacgt
 19
 50
 <210> 13
 <211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

5

<220>

<223> COT102 核苷酸基序

10 <400> 13
cgagagcctg acctattgca t
21

15 <210> 14
<211> 19

20 <212> DNA
<213> 人工序列

25 <220>

<223> COT102 核苷酸基序

30 <220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

35 <223> 5' 端的 FAM 标记

40 <220>

<221> modified_base

<222> (19)..(19)

45 <223> 3' 端的 TAMRA 标记

50 <400> 14
acaccctgtg cacggcggg
19

<210> 15
<211> 20
5 <212> DNA
<213> 人工序列

10
<220>
<223> COT102 核苷酸基序

15 <400> 15
atgaagaccc tgcgctacga
20

20 <210> 16
<211> 19
<212> DNA
25 <213> 人工序列

30 <220>
<223> COT102 核苷酸基序

35 <400> 16
acgcccagtg gcatgtaga
19

40 <210> 17
<211> 21
<212> DNA
45 <213> 人工序列

50
<220>
<223> COT102 核苷酸基序
<220>

<221> modified_base
<222> (1)..(1)
5 <223> 5' 端的 FAM 标记

<220>
10 <221> modified_base
<222> (21)..(21)
15 <223> 3' 端的 TAMRA 标记

<400> 17
20 agcgaggccg agtaccgcac c
21

<210> 18
25 <211> 19
<212> DNA
30 <213> 人工序列

<220>
35 <223> COT102 核苷酸基序
<400> 18
40 ccaacctatt cttcctctc
19

<210> 19
45 <211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
50

<220>
55 <223> COT102 核苷酸基序

<400> 19
 gtatatgctc cgcattggt
 19
 5

<210> 20
 <211> 19
 10 <212> DNA
 <213> 人工序列

15
 <220>
 <223> COT102 核苷酸基序

20 <400> 20
 gtgttgcatt agaagatgt
 19

25 <210> 21
 <211> 9356
 30 <212> DNA
 <213> 人工序列

35 <220>
 <223> COT102 核苷酸基序

40 <400> 21
 ctatagggca cgcgtggtcg acggcccggg ctggtgtcga aactactttg taatatacaa
 60
 ccaccttttc agttaaattg catccoctaat tctagccatg ccatgcattt agatattacc
 45 120
 tgaatatttc aatcaaaatc catttccaaa tcatgtaagt accagcacac aaacaattcc
 180
 50 aactaagttc attgatgagc tccactcaac tattttaaag aaaatctacc ccaatcctta
 240
 ctgatgagtg aaagcaccta gcagtgtgaa aagaaaacca aatatgcatt gatccatgga
 300
 55

cagactaata tgcaacacct tagcactaga taaaatgcaa gacttttcac tctaaatag
360

5 accatgttct tctagttaaa attgatgta attgaacca gtgtctotta ctttcgattc
420

tattagaaaa cacacaacaa tgccatacaa actgcatttt tccttgaaaa aagaaaatca
480

10 aacagcaatt gtataaggaa agtggcctta aatatatatt aactgaagat taaatgaaaa
540

cagccaagtg ttcaagtaat tggaaacagc tattccctga ccttaaatat ataaaaaac
600

15 tgtagattaa aggatatcaa cctcatttaa cactcaagat caaacttacc agtaaacaga
660

20 gagtaggctt ccctaacaat acctatatct tgacagttca gaaaattaca gcataacttt
720

ttcacattgt cctaatacaa tttctaaata catcaaactt tggcaactta gaacaaacct
780

25 aataaactgc tccaacttgg gcatggacag caaatgtaga tatggacaac tttgacccaa
840

aattcaaaga taaaggcca aaagtggaac cactactagg gtcttttagt cgtaagtgtg
900

30 gagctgcctt atcctaagtt tcccaaaccc ttttatgctt catttgaggt tagaatctcg
960

35 ggaaggcagg tcttttacaa gcgtagcac aatttagttg catcattggt ggtgccaaac
1020

catttttttc tcaaccaacc tattcttctt ctctgtttta aggtactatt cacagaagaa
1080

40 gataggtagt ttttaaggag aattactatc caacattagc aaatagaaac ccaactatct
1140

gctggcttca aaatgtagcg acagactaat accaaacaaa accatgagat tgtagagaga
1200

45 taccttgggt ttgatatgaa tggccgacgt cctcaaaaga gaaatcttcg tttctacat
1260

aattaacaat gccaaagcaa aagatgagta atttgattt tttgaaaaat aaaccaataa
1320

50 tacaattcaa atatgaaact ttgaaagaaa acactcattg taagatcaaa aaaggcaaat
1380

attcaggtaa acaaattgac gcttagacaa ctttaataaca cattgcggac gtttttaatg
1440

5 tacgccatgc tggccgcccg gggtagccaa ttcccgatct agtaacatag atgacaccgc
1500

gcgcgataat ttatcctagt ttgcgcgcta tattttgttt tctatocgct attaaatgta
1560

10 taattgcggg actcctaatca taaaaacca tctcataaat aacgtcatgc attacatggt
1620

aattattaca tgcttaacgt aattcaacag aaattatatg ataatcatcg caagaccggc
1680

15 aacaggattc aatcctaaga aactttattg ccaaagtgtt gaacgatcgg ggaaattcgg
1740

ggatcccggg eggcactctac tctattcctt tgccctcgga cgagtgcctgg ggcgtcgggt
20 1800

tccactatcg gcgagtactt ctacacagcc atcgggtccag acggccgcgc ttctgcgggc
1860

25 gatttggtga cgcccacag tcccggctcc ggatcggacg attgcgtcgc atcgaccctg
1920

cgcccaagct gcatcatcga aattgccgtc aaccaagctc tgatagagtt ggtcaagacc
1980

30 aatgcggagc atatacgccc ggagccgagg cgatcctgca agctccggat gcctccgctc
2040

gaagtagcgc gtctgtctgt ccatacaagc caaccacggc ctccagaaga agatggtggc
35 2100

gacctcgtat tgggaatccc cgaacatcgc ctgcctccag tcaatgaccg ctggtatgcg
2160

40 gccattgtcc gtcaggacat tgttgaggcc gaaatccgag tgcacgaggt gccggacttc
2220

ggggcagtcc tcggcccaaa gcatcagctc atcgagagcc tgccgcgacgg acgcaactgac
2280

45 ggtgtcgtcc atcacagttt gccagtgata cacatgggga tcagcaatcg cgcataatgaa
2340

atcacgccat gtagtgattt gaccgattcc ttgcgggtccg aatgggcccga acccgctcgt
50 2400

ctggctaaga tcggccgcag cgatcgcate catggcctcc gcgaaccggt gcagaacagc
2460

gggcagttcg gtttcaggca ggtcttgcaa cgtgacaccc tgtgcacggc gggagatgca
2520

5 ataggtcagg ctctcgctga atgcccgaat gtcaagcact tccggaatcg ggagcgcggc
2580

cgatgcaaag tgccgataaa cataacgatc tttgtagaaa ccatcggcgc agctatttac
2640

10 cgcgaggaca tatccacgcc ctctacatc gaagctgaaa gcacgagatt ctctgcacct
2700

cgagagctgc atcaggtcgg agacgctgtc gaacttttcg atcagaaact tctcgacaga
2760

15 cgtcgcggtg agttcaggct ttttcatatc ttattgcccc cctagagtcg agatccacct
2820

gaaataaaac aatagaacaa gtagaaacca atcagcgaac atataccaaa tcaaagccg
2880

20 taagagaaat caaaacaaca ccaaagagaa acggatctaa acataagaaa cctaaaacag
2940

agagaatcga acaaagaaaa cacaaaaatt gaatagatcg tccttgaaaa tcctaatttc
3000

acaatcaagc aagaaattac acagatgtaa acactacgaa tcgatatctt agtaatcagg
3060

30 acaaaattta gaagctggat tgacgaaacg aacaatattg tcaaagcaa tttatacaaa
3120

agattcaata atccacataa caaaaattgg agatcagata cgaatcaaaa acaaaaagaa
3180

35 tcagaaaata taccttgaaa gagagagtcg cgagagattt gcagagatcg ctttaggctt
3240

tgggagagat tgaagagtca gaaaaagacg aaaggatgaa ttattatctt ccacacgaag
3300

40 gtcttcttta tatcgcaaac caaaagccca aaaccgtctt ttctattaat gagaataaaa
3360

45 tatcttttagc caaaacaaaa aaaggaagat atcagttgag gattattatc acgaaactaa
3420

aggaaggaat catatgatac gtgtcatatt ttccaccgtg cgtttttaaa agaccgactc
3480

50 aagtagaaac atcctatggt ggtggttggg ttaggtcatc cattacatct gcttactga
3540

ctttttcta tttttctttt tgtatatact tttcctcaaa taatttcttt cttttctata
 3600

5 gaagaattta atcaataagg aaaaagttca aaaaagattc tttccattaa gactatgtct
 3660

tgggtaacc aaccattaa gaataagcaa tcataatata tatagagaat actaatacta
 3720

10 tatatgagat ttttctttta atttcatggt gattatgata gtttatcttc ttgatttaat
 3780

ttatcaatac ttggcataaa agattctaatt ctactctaatt aaagaaaaga aaaaaagta
 3840

15 tctaccattg actaattaa ataaggaaac ttatctacca aatttgagta ttttttagaa
 3900

caatcttttt ggtttaattc caaaactcta aacctaattg ttgggaaaaa ggacctaatt
 20 3960

tttaagaaaa gttaataatt agaagatctg tatgtttttt tttgatccaa gtttttattt
 4020

25 cttttctctt tttttcatga taaaatctat gtttttttag tctacaatta aagtaattgt
 4080

tattattttc tttatctttt tttgttggtg ttgttaattc cttttttttt ttttaacagc
 4140

30 aacttcttaa aaaaaaaaaac agttgggcct tgaatttatt tcaggcctgc gttattaagc
 4200

ccagataata actcaaaaca aaaaaaatgt tgaaccggaa taaaccgcgc agattaaatg
 35 4260

ccggttttca ggtaacatag aagaagaata tatgaggatt gaagaagtat tcaagaggcg
 4320

40 gaacaattca caagtccaag agcttaaatt tctcctcact cttctgctac agactcggaa
 4380

ctctttctct ttgctaaaat aagatgttca ggatttttgt tgcccgacaa ttcattgtatc
 4440

45 tcacactctc tctcttctct gttcttacta ctctgttaca ttaccaccaa ctcaagactt
 4500

tcttccacaa tggcgtttat gagacttggc tccaaatccg gtaccggagc tcgaattoga
 50 4560

agcttgcattg cctgcagtga tcaccatggt cgacaaaatt tagaacgaac ttaattatga
 4620

tctcaaatac attgatacat atctcatcta gatctagggtt atcattatgt aagaaagttt
4680

5 tgacgaatat ggcacgacaa aatggctaga ctcgatgtaa ttggtatctc aactcaacat
4740

tatacttata ccaaacatta gttagacaaa atttaaacia ctatTTTTTTA tgtatgcaag
4800

10 agtcagcata tgtataattg attcagaatc gttttgacga gttcggatgt agtagtagcc
4860

attatttaat gtacatacta atcgtgaata gtgaatatga tgaaacattg tatcttattg
4920

15 tataaatatc cataaacaca tcatgaaaga cactttcttt cacggtctga attaattatg
4980

atacaattct aatagaaaac gaattaaatt acgttgaatt gtatgaaatc taattgaaca
5040

20 agccaaccac gacgacgact aacgttgcct ggattgactc ggtttaagtt aaccactaaa
5100

25 aaaacggagc tgtcatgtaa cacgcggatc gagcaggatc cagtcatgaa gccatcaaag
5160

caaaagaact aatccaaggg ctgagatgat taattagttt aaaaattagt taacacgagg
5220

30 gaaaaggctg tctgacagcc aggtcacggt atctttacct gtggtcgaaa tgattcgtgt
5280

ctgtcgattt taattatttt tttgaaaggc cgaaaataaa gttgtaagag ataaaccgc
5340

35 ctatataaat tcatatattt tctctctcgc tttgaattgt ctcgttgtcc tctcacttt
5400

40 catcagccgt tttgaatctc cggcgacttg acagagaaga acaaggaaga agactaagag
5460

agaaagtaag agataatcca ggagattcat tctcggtttt gaatcttctt caatctcatc
5520

45 ttcttccgct ctttctttcc aaggtaatag gaactttctg gatctacttt atttgctgga
5580

tctcgatctt gttttctcaa tttccttgag atctggaatt cgtttaattt ggatctgtga
5640

50 acctccacta aatcttttgg ttttactaga atcgatctaa gttgaccgat cagttagctc
5700

gattatagct accagaattt ggcttgacct tgatggagag atccatgttc atgttacctg
 5760

5 ggaaatgatt tgtatatgtg aattgaaatc tgaactgttg aagttagatt gaatctgaac
 5820

actgtcaatg ttagattgaa tctgaacct gttaaggtt agatgaagtt tgtgtataga
 5880

10 ttcttcgaaa ctttaggatt tgtagtgtcg tacgttgaac agaaagctat ttctgattca
 5940

atcagggttt atttgactgt attgaaactct ttttgtgtgt ttgcagctca taaaaaggat
 6000

15 ccaccatgaa caagaacaac accaagctga gcacccgcgc cctgccgagc ttcacgcact
 6060

acttcaacgg catctacggc ttcgccaccg gcatcaagga catcatgaac atgatcttca
 6120

agaccgacac cggcggcgac ctgaccctgg acgagatcct gaagaaccag cagctgctga
 6180

25 acgacatcag cggcaagctg gacggcgtga acggcagcct gaacgacctg atcgcccagg
 6240

gcaacctgaa caccgagctg agcaaggaga tccttaagat cgccaacgag cagaaccagg
 6300

30 tgctgaacga cgtgaacaac aagctggacg ccatcaacac catgctgcgc gtgtacctgc
 6360

cgaagatcac cagcatgctg agcgacgtga tgaagcagaa ctacgccctg agcctgcaga
 6420

tcgagtacct gagcaagcag ctgcaggaga tcagcgacaa gctggacatc atcaacgtga
 6480

40 acgtcctgat caacagcacc ctgaccgaga tcaccccggc ctaccagcgc atcaagtacg
 6540

tgaacgagaa gttcgaagag ctgaccttcg ccaccgagac cagcagcaag gtgaagaagg
 6600

45 acggcagccc ggccgacatc ctggacgagc tgaccgagct gaccgagctg gcgaagagcg
 6660

tgaccaagaa cgacgtggac ggcttcgagt totacctgaa caccttcac gacgtgatgg
 6720

50 tgggcaacaa cctgttcggc cgcagcgcgc tgaagaccgc cagcgagctg atcaccaagg
 6780

agaacgtgaa gaccagcggc agcgaggtgg gcaacgtgta caacttctctg atcgtgctga
 6840

5 cgcacctgca ggcccaggcc ttctgaccc tgaccacctg tcgcaagctg ctgggcctgg
 6900

ccgacatcga ctacaccagc atcatgaacg agcacttgaa caaggagaag gaggagtcc
 6960

10 gcgtgaacat cctgcccacc ctgagcaaca ccttcagcaa cccgaactac gccaaaggta
 7020

agggcagcga cgaggacgcc aagatgatcg tggaggctaa gccgggccac gcgttgatcg
 7080

15 gcttcgagat cagcaacgac agcatcaccg tgctgaaggt gtacgaggcc aagctgaagc
 7140

20 agaactacca ggtggacaag gacagcttga gcgaggtgat ctacggcgac atggacaagc
 7200

tgctgtgtcc ggaccagagc gagcaaatct actacaccaa caacatcgtg ttcccgaacg
 7260

25 agtacgtgat caccaagatc gacttcacca agaagatgaa gaccctgcgc tacgaggtga
 7320

ccgccaaact ctacgacagc agcaccggcg agatcgacct gaacaagaag aaggtggaga
 7380

30 gcagcagaggc cgagtaccgc accctgagcg cgaacgacga cggcgtctac atgccactgg
 7440

35 gcgtgatcag cgagacctc ctgacccccga tcaacggctt tggcctgcag gccgacgaga
 7500

acagccgct gatcacctg acctgtaaga gctacctgcg cgagctgctg ctagccaccg
 7560

40 acctgagcaa caaggagacc aagctgatcg tgccaccgag cggcttcac agcaacatcg
 7620

tggagaacgg cagcatcgag gaggacaacc tggagccgtg gaaggccaac aacaagaacg
 7680

45 cctacgtgga ccacaccggc ggcgtgaacg gcaccaaggc cctgtacgtg cacaaggacg
 7740

gcggcatcag ccagttcatc ggcgacaagc tgaagccgaa gaccgagtac gtgatccagt
 7800

50 acaccgtgaa gggcaagcca tcgattcacc tgaaggacga gaacaccggc tacatccact
 7860

acgaggacac caacaacaac ctggaggact accagacat caacaagcgc ttcaccaccg
7920

5 gcaccgacct gaagggcgtg tacctgatcc tgaagagcca gaacggcgac gaggcctggg
7980

gcgacaactt catcatcctg gagatcagcc cgagcgagaa gctgctgagc ccggagctga
8040

10 tcaacaccaa caactggacc agcaccggca gcaccaacat cagcggcaac accctgacct
8100

tgtaccaggc cggccgcggc atcctgaagc agaacctgca gctggacagc ttcagcacct
8160

15 accgcgtgta cttcagcgtg agcggcgacg ccaacgtgcg catccgcaac tcccgcgagg
8220

tgctgttoga gaagaggtac atgagcggcg ccaaggacgt gagcgagatg ttcaccacca
8280

20 agttcgagaa ggacaacttc tacatcgagc tgagccaggc caacaacctg tacggcggcc
8340

25 cgatcgtgca cttctacgac gtgagcatca agtaggagct ctgatcccc gaatttcccc
8400

gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg
8460

30 atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc
8520

atgacgttat ttatgagatg gggttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac
8580

35 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct
8640

40 atgttactag atcgggaatt gggtagcgag ctgcaattcg gcgcgccccaa ttgatttaa
8700

tgcccgctgc ggccaattcc tgcagcgttg cggttctgtc agttccaaac gtaaaacggc
8760

45 ttgtcccgcg tcatcggcgg gggtcataac gtgactccct taattctccg ctcatgatca
8820

gattgtcgtt tcccgccttc agtttaaact atcagtgttt aataaatatg ggcaatcttt
8880

50 ccctacaccg actgtactgt tactgtaata gactccggcc tagactgatt ctgaattctg
8940

tctgtttact gactgttact ctagtaaggg gattacacac tgagttttag taaactcacc
 9000

5 ccgtttatta actgtgcagg taatcccca ctaggtgg atcgggtgtca cagaaggact
 9060

cggagacgac cacacaactg cacatgtttt tttatttcgt ttatttagtc aagcactttg
 9120

10 gtttttgatt tgggttgat taaggcctct ttattttctt aaccttttat ttgggaaatt
 9180

tatttagtat gcttaatata tgttagaagt agggcacggt tttccaaaac aacaattggc
 9240

15 tttcaaaata tctcgtttcc gtaactgttt aaaagtatgc ttctgcagca aataaggttt
 9300

20 taagggaatt aacgtttcac aagttttaaa tggctagagg ttttgagtag taagaa
 9356

<210> 22

25 <211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

30

<220>

35 <223> COT102 核苷酸基序

<400> 22
 gatcggggtc aggaaggtct
 20

40

<210> 23

<211> 20

45 <212> DNA

<213> 人工序列

50

<220>

<223> COT102 核苷酸基序

55

<400> 23
cagcatcatg aacgagcact
20

5

<210> 24

<211> 20

10 <212> DNA

<213> 人工序列

15

<220>

<223> COT102 核苷酸基序

20 <400> 24
cagcgagagc ctgacctatt
20

25 <210> 25

<211> 20

<212> DNA

30 <213> 人工序列

35 <220>

<223> COT102 核苷酸基序

<400> 25

40 caggacattg ttggagccga
20