



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116640761 B

(45) 授权公告日 2023.09.22

(21) 申请号 202310890063.8

CN 104427861 A, 2015.03.18

(22) 申请日 2023.07.20

CN 104830847 A, 2015.08.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 113302199 A, 2021.08.24

申请公布号 CN 116640761 A

CN 113373174 A, 2021.09.10

(43) 申请公布日 2023.08.25

US 2012046169 A1, 2012.02.23

(83) 生物保藏信息

US 2014329676 A1, 2014.11.06

CCTCC NO:P202313 2023.05.25

US 2014338072 A1, 2014.11.13

WO 2023107943 A1, 2023.06.15

(73) 专利权人 隆平生物技术(海南)有限公司

Yann Devos等.Bt-maize event MON 88017

地址 572000 海南省三亚市崖州区崖州湾

expressing Cry3Bb1 does not cause harm to

科技城雅布伦产业园三号楼二楼206

non-target organisms.Transgenic

号

Res..2012,第21卷(第6期),第1191-1214页.

(72) 发明人 吕玉平 李树秀 石小堰 王强

王蕊等.转cry1Ab和epsps基因玉米

林黎彦 陈佳宇

C0030.3.5对土壤固氮细菌丰度和群落结构的影

(74) 专利代理机构 北京知汇林知识产权代理事

务所(普通合伙) 11794

响.环境科学.2018,第39卷(第08期),第3885-

专利代理师 周敏毅

3893页.

Miao-miao LIU等.抗虫抗草甘膦转基因玉

米分子的特征及功能评价(英文).Journal of

(51) Int.Cl.

G12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

Zhejiang University-Science B(Biomedicine

& Biotechnology).2018,第19卷(第08期),第

610-619页.

审查员 李素荣

(56) 对比文件

CN 112831584 A, 2021.05.25

权利要求书1页 说明书33页

序列表(电子公布) 附图3页

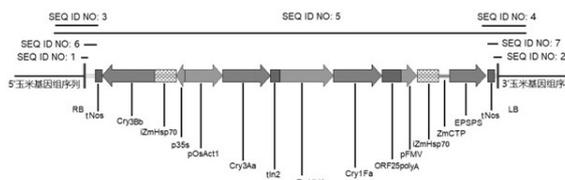
(54) 发明名称

转基因玉米事件LP018-1及其检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种核酸序列,其包含选自序列 SEQ ID NO:1-7或其互补序列中的一种或多种,所述核酸序列来源于转基因玉米事件LP018-1,包含所述事件的种子的代表性样本已以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏.本发明的转基因玉米事件LP018-1不仅对鳞翅目、鞘翅目等害虫的摄食具有良好抗性,并且能够耐受含草甘膦的农业除草剂.该双重性状的玉米植株具有如下优点:免受由于鳞翅目、鞘翅目等害虫造成的经济损失;可耐受常用商业化除草剂草甘膦的玉米作物;不降低玉米产量;增强育种效率,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.同时本发明提供的检测方法能够快速、准确、稳定的鉴定出来源于转基因玉米事件LP018-1植物材料的存在。



CN 116640761 B

1. 一种用于转基因玉米事件LP018-1检测的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子的序列如SEQ ID NO:1-2、SEQ ID NO:3-4或SEQ ID NO:5所示的一组或多组,所述核酸分子来源于转基因玉米事件LP018-1,所述转基因玉米事件LP018-1的玉米种子已以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏于中国典型培养物保藏中心。

2. 一种保护玉米植物免于昆虫侵袭的方法,其特征在于,包括在靶标昆虫的膳食中提供转基因玉米植物细胞;摄食所述转基因玉米植物细胞的靶标昆虫被抑制进一步摄食所述转基因玉米植物;所述昆虫为鳞翅目或鞘翅目昆虫;所述转基因玉米植物的玉米种子已以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏于中国典型培养物保藏中心。

3. 一种保护玉米植物免任由草甘膦除草剂引起的损伤的方法,其特征在于,种植转基因玉米植物;施加有效剂量草甘膦除草剂;所述转基因玉米植物的玉米种子已以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏于中国典型培养物保藏中心。

4. 一种控制种植玉米植物的大田中杂草的方法,其特征在于,包括将有效剂量草甘膦除草剂施加到种植转基因玉米植物的大田中;所述转基因玉米植物的玉米种子已以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏于中国典型培养物保藏中心。

## 转基因玉米事件LP018-1及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,涉及转基因植物及其产品的检测方法,具体涉及对昆虫具有抗性且耐受草甘膦除草剂施用的转基因玉米事件LP018-1和用于检测转基因玉米LP018-1的核酸序列及方法。

### 背景技术

[0002] 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(例如玉米螟、棉铃虫、草地贪夜蛾等)和鞘翅目(西方玉米根虫、北方玉米根虫和墨西哥玉米根虫等)的抗性。玉米对鳞翅目和鞘翅目昆虫的抗性可以通过转基因的方法使鳞翅目和鞘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,特别是耐受草甘膦除草剂。玉米对草甘膦除草剂的耐受性可以通过转基因的方法使草甘膦除草剂耐受型基因(如*epsps*)在玉米植物中表达而获得。

[0003] 除了功能基因本身,调控元件的选择及其顺序排布对于获得良好的转化事件是至关重要的,并且其技术效果是难以预料的。另外外源基因在植物体内的表达受其插入玉米染色体组位置的影响,可能是由于染色质结构(如异染色质)或转录调节元件(如增强子)接近整合位点。为此,通常需要筛选大量的事件才有可能鉴定出可以商业化的事件(即导入的目标基因得到最优表达的事件)。例如,在植物和其他生物体中已经观察到导入基因的表达量在事件间可能有很大差异;在表达的空间或时间模式上可能也存在差异,如在不同植物组织之间转基因的相对表达存在差异,这种差异表现在实际的表达模式可能与导入的基因构建体中的转录调节元件所预期的表达模式不一致。因此,通常需要产生成百上千个不同的事件并从这些事件中筛选出具有以商业化为目的所预期的转基因表达量和表达模式的单一事件。这样的转化事件具有优异的鳞翅目害虫(如亚洲玉米螟、草地贪夜蛾和棉铃虫等)、鞘翅目害虫(西方玉米根虫、北方玉米根虫和墨西哥玉米根虫等)和草甘膦除草剂抗性且不影响玉米产量,可采用常规育种方法通过杂交将转基因性状回交到其他遗传背景中。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和性状表现。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,具备稳定的鳞翅目害虫(如亚洲玉米螟、草地贪夜蛾和棉铃虫等)、鞘翅目害虫(西方玉米根虫、北方玉米根虫和墨西哥玉米根虫等)和草甘膦除草剂抗性,使这些品种免受主要鳞翅目和鞘翅目害虫的为害,并具有广谱的杂草防控能力,同时能很好的适应当地的生长条件。

[0004] 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,否则上述这种方法不能用于区别

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T-DNA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,具体地说是包含于侧翼序列的第一引物和包含插入序列的第二引物。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种转基因玉米事件LP018-1以及用于检测玉米植物LP018-1事件的核酸序列及其检测方法,可以准确快速的鉴定生物样品中是否包含特定的转基因玉米事件LP018-1的DNA分子。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了一种核酸序列,其包含选自序列SEQ ID NO:1-7(即SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7)或其互补序列中的一种或多种。在一些实施方式中,所述核酸序列来源于包含转基因玉米事件LP018-1的植物、种子或细胞,包含所述事件的种子的代表性样本已于2023年5月25日以保藏编号CCTCC NO:P202313保藏在中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号武汉大学校内,武汉大学保藏中心,邮编430072),分类命名:玉米(*Zea mays* L.)。在一些实施方式中,所述核酸序列是诊断转基因玉米事件LP018-1的存在的扩增子。

[0007] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了一种核酸序列,其包含SEQ ID NO:3或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、和/或SEQ ID NO:4或其互补序列中至少11个连续的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸序列包括SEQ ID NO:1或其互补序列、和/或SEQ ID NO:2或其互补序列。在一些实施方式中,所述核酸序列包括SEQ ID NO:3或其互补序列、和/或SEQ ID NO:4或其互补序列。在一些实施方式中,所述核酸序列包括SEQ ID NO:5或其互补序列。

[0008] 所述SEQ ID NO:1或其互补序列为转基因玉米事件LP018-1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LP018-1的存在。所述SEQ ID NO:2或其互补序列为转基因玉米事件LP018-1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LP018-1的存在。

[0009] 本发明提供的核酸序列可以为所述SEQ ID NO:3或其互补序列中转基因插入序列的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸(第一核酸序列),或者为所述SEQ ID NO:3或其互补序列中5'侧翼玉米基因组DNA区域的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸(第二核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或互补于包含完整的所述SEQ ID NO:1的所述SEQ ID NO:3的一部分。当第一核酸序列和第二核酸序列一起使用时,这些核酸序列在产生扩增产物的DNA扩增方法中包括DNA引物对。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LP018-1或其后代的存在。本领域技术人员熟知,第一和第二核酸序列不必仅仅由DNA组成,也可包括RNA、DNA和RNA的混合物,或者DNA、RNA或其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,本发明中所述探针或引物应该是至少大约11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个连续核苷酸的长度,其可以选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所述的核苷酸。当选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的核苷酸时,所述探针和引物可以为长度是大约17个到50个或更多的连续核苷酸。所述SEQ ID NO:3或其互补序列为转基因玉米事件LP018-1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1129个核苷酸的序列,所述SEQ ID NO:3或其互补序列由643个核苷酸的玉米侧翼基因组DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸1-643)、369个核苷酸的pLP018构建体DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸644-1012)和117个核苷酸的tNos终止子的3'末端DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸1013-1129)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LP018-1的存在。

[0010] 所述核酸序列可以为所述SEQ ID NO:4或其互补序列中转基因插入序列的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸(第三核酸序列),或者为所述SEQ ID NO:4或其互补序列中3'侧翼玉米基因组DNA区域的任何部分的至少11个或者更多个连续核苷酸(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的SEQ ID NO:2或所述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,这些核酸序列在产生扩增产物的DNA扩增方法包括DNA引物对。使用DNA引物对在DNA扩增方法中产生的扩增产物是包括SEQ ID NO:2的扩增产物时,可以诊断转基因玉米事件LP018-1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LP018-1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825个核苷酸的序列,所述SEQ ID NO:4或其互补序列由53个核苷酸的tNos(胭脂碱合成酶)转录终止子序列(SEQ ID NO:4的核苷酸1-53)、183个核苷酸的pLP018构建体DNA序列(SEQ ID NO:4的核苷酸54-236)和589个核苷酸的玉米整合位点侧翼基因组DNA序列(SEQ ID NO:4的核苷酸237-825)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LP018-1的存在。

[0011] 所述SEQ ID NO:5或其互补序列为表征转基因玉米事件LP018-1的长度为16725个核苷酸的序列,其具体包含的基因组和遗传元件如表1所示。包含所述SEQ ID NO:5或其互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LP018-1的存在。

[0012] 表1、SEQ ID NO:5包含的基因组及遗传元件

表 1、SEQ ID NO:5 包含的基因组及遗传元件

遗传元件	长度	位于 SEQ ID NO:5 上的位置
5' 基因组	643bp	1-643
RB	369bp	644-1012
tNos	253bp	1013-1265
<i>Cry3Bb</i>	1962bp	1272-3233
iZmHSP70	806bp	3246-4051
p35s	322bp	4052-4373
pOsAct1	1411bp	4382-5799
<i>Cry3Aa</i>	2457bp	5800-7596
tIn2	344bp	7597-7944
pZmUbi1	1993bp	7962-9954
<i>Cry1Fa</i>	1818bp	9961-11778
ORF25PolyA	713bp	11785-12497
pFMV	595bp	12506-13100
iZmHSP70	806bp	13106-13911
ZmCTP	415bp	13912-14326
EPSPS	1368bp	14327-15694
tNos	253bp	15701-15953
LB	183bp	15954-16136
3' 基因组	598bp	16137-16725

[0013]

[0014] 所述核酸序列或其互补序列可用于DNA扩增法中以产生扩增产物,通过所述扩增产物的检测诊断生物样品中转基因玉米事件LP018-1或其后代的存在;所述核酸序列或其互补序列可用于核苷酸检测法中,以检测生物样品中转基因玉米事件LP018-1或其后代的存在。

[0015] 本发明提供一种DNA引物对,包含第一引物和第二引物,其中,所述第一引物和所述第二引物各自包含SEQ ID NO:5的片段或其互补序列,且当与含有转基因玉米事件LP018-1的DNA一起用于扩增反应时,产生检测样品中转基因玉米事件LP018-1的扩增产物。

[0016] 在一些实施方式中,所述第一引物选自SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:12;所述第二引物选自SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述扩增产物包括SEQ ID NO:3或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、或者SEQ ID NO:4或其互补序列中至少11个连续的核苷酸。

[0018] 进一步地,所述扩增产物包括SEQ ID NO:1或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸、或者SEQ ID NO:2或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸。

[0019] 更进一步地,所述扩增产物包括SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:6或其互补序列、或者SEQ ID NO:7或其互补序列。

[0020] 在上述技术方案中,所述引物包括至少一种所述核酸序列。具体地,所述引物包括

第一引物和第二引物,所述第一引物选自SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:12,所述第二引物选自SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13;或者所述第一引物选自SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:15,所述第二引物选自SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14。

[0021] 本发明还提供一种DNA探针,其包含SEQ ID NO:5的片段或其互补序列,所述DNA探针在严格杂交条件下与包含选自SEQ ID NO:1-7或其互补序列的核酸序列的DNA分子杂交,并在严格杂交条件下不与不含选自SEQ ID NO:1-7或其互补序列的核酸序列的DNA分子杂交。

[0022] 在一些实施方式中,所述DNA探针包含选自SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:6或其互补序列和SEQ ID NO:7或其互补序列的序列。

[0023] 在一些实施方式中,所述DNA探针用荧光基团标记。

[0024] 在一些实施方式中,所述探针包括SEQ ID NO:3或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、或者SEQ ID NO:4或其互补序列中至少11个连续的核苷酸;进一步地,所述探针包括SEQ ID NO:1或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸、或者SEQ ID NO:2或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸。

[0025] 本发明还提供一种标记物核酸分子,其包含SEQ ID NO:5的片段或其互补序列,所述标记物核酸分子在严格杂交条件下与包含选自SEQ ID NO:1-7或其互补序列的核酸序列的DNA分子杂交,并在严格杂交条件下不与不含选自SEQ ID NO:1-7或其互补序列的核酸序列的DNA分子杂交。

[0026] 在一些实施方式中,所述标记物核酸分子包含选自SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:6或其互补序列和SEQ ID NO:7或其互补序列的序列。

[0027] 在一种实施方式中,所述标记物核酸分子包括SEQ ID NO:3或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、或者SEQ ID NO:4或其互补序列中至少11个连续的核苷酸;

[0028] 在一些实施方式中,所述标记物核酸分子包括SEQ ID NO:1或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸、或者SEQ ID NO:2或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸。

[0029] 进一步地,本发明提供一种检测样品中包含转基因玉米事件LP018-1的DNA存在的方法,包括:

[0030] (1) 使待检测样品与所述DNA引物对在核酸扩增反应中接触;

[0031] (2) 进行核酸扩增反应;

[0032] (3) 检测扩增产物的存在;

[0033] 所述扩增产物包括选自序列SEQ ID NO:1-7或其互补序列的核酸序列,即表示检测样品中包含转基因玉米事件LP018-1的DNA存在。

[0034] 本发明还提供一种检测样品中包含转基因玉米事件LP018-1的DNA存在的方法,包括:

[0035] (1) 使待检测样品与所述DNA探针,和/或所述标记物核酸分子接触;

[0036] (2) 使所述待检测样品与所述探针和/或所述标记物核酸分子在严格杂交条件下杂交;

[0037] (3)检测所述待检测样品与所述探针和/或所述标记物核酸分子的杂交情况。

[0038] 所述严格条件可为在 $6\times\text{SSC}$  (柠檬酸钠)、 $0.5\%$  SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液中,在 $65^{\circ}\text{C}$ 下杂交,然后用 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%$  SDS和 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%$  SDS各洗膜1次。

[0039] 其中,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。

[0040] 本发明还提供一种DNA检测试剂盒,包括:产生诊断转基因玉米事件LP018-1的扩增子的DNA引物对,对SEQ ID NO:1-7具有特异性的探针或者对SEQ ID NO:1-7具有特异性的标记物核酸分子。具体而言,所述检测试剂盒包括本发明所述的探针、引物对或者标记物核酸分子。

[0041] 在一些实施方式中,本发明提供了一种DNA检测试剂盒,包括至少一个DNA分子,所述DNA分子包括SEQ ID NO:3的同源序列或其互补序列中至少11个连续的核苷酸、或者SEQ ID NO:4的同源序列或其互补序列中至少11个连续的核苷酸,其可以作为对于转基因玉米事件LP018-1或其后代具有特异性的DNA引物或探针。

[0042] 进一步地,所述DNA分子包括SEQ ID NO:1或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸、或者SEQ ID NO:2或其互补序列中第1-11位或第12-22位连续核苷酸。

[0043] 更进一步地,所述DNA分子包括SEQ ID NO:1的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:2的同源序列或其互补序列、SEQ ID NO:6的同源序列或其互补序列、或者SEQ ID NO:7的同源序列或其互补序列。为实现上述目的,本发明还提供了一种植物细胞,包含编码昆虫抗性Cry3Aa、Cry3Bb和Cry1Fa蛋白的核酸序列,编码草甘膦除草剂耐受性EPSPS蛋白的核酸序列和特定区域的核酸序列,所述特定区域的核酸序列包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。

[0044] 本发明提供的序列包括下表2中列出的序列:

[0045] 表2、本发明相关序列

[0046]

序列号 (SEQ ID NO)	序列说明
1	RB 端跨 junction 序列 (含部分 T-DNA RB 端序列和基因组序列, 22bp)
2	LB 端跨 junction 序列 (含部分 T-DNA LB 端序列和基因组序列, 22bp)
3	插入序列的 5' 末端位于插入结合部位附近的核苷酸序列, 对于 T-DNA 来讲就是 RB 端 (含有基因组为 643bp 序列, T-DNA 为 486bp)
4	插入序列的 3' 末端位于插入结合部位附近的核苷酸序列, 对于 T-DNA 来讲就是 LB 端 (含有基因组为 589bp 序列, T-DNA 为 236bp)
5	T-DNA 全长序列 (含 LB 和 RB 端各约 200 和 300bp 序列, 含基因组序列, 两端延伸了各 600bp)
6	位于 SEQ ID NO:3 内部的序列, LP018 T-DNA 序列
7	位于 SEQ ID NO:4 内部的序列, LP018 T-DNA 序列
8	扩增 SEQ ID NO:3 的第一引物, 引物 11
9	扩增 SEQ ID NO:3 的第二引物, 引物 12
10	扩增 SEQ ID NO:4 的第一引物, 引物 13
11	扩增 SEQ ID NO:4 的第二引物, 引物 14
12	5' 侧翼基因组上的引物, 引物 15
13	与序列 12 配对的位于 T-DNA 上的引物, 引物 16
14	3' 侧翼基因组上的引物, 引物 17
15	与序列 14 配对的位于 T-DNA 上的引物, 引物 18
16	Taqman 检测 Cry3Bb 引物 1
17	Taqman 检测 Cry3Bb 引物 2
18	Taqman 检测 Cry3Bb 探针 1
19	Taqman 检测 Cry3Aa 引物 3

[0047]

20	Taqman 检测 Cry3Aa 引物 4
21	Taqman 检测 Cry3Aa 探针 2
22	Taqman 检测 Cry1Fa 引物 5
23	Taqman 检测 Cry1Fa 引物 6
24	Taqman 检测 Cry1Fa 探针 3
25	Taqman 检测 EPSPS 引物 7
26	Taqman 检测 EPSPS 引物 8
27	Taqman 检测 EPSPS 探针 4
28	玉米内源基因 Ubiquitin 第一引物 9
29	玉米内源基因 Ubiquitin 第二引物 10
30	Southern 杂交检测中 Cry3Bb 的探针 5
31	Southern 杂交检测中 Cry3Aa 的探针 6
32	Southern 杂交检测中 Cry1Fa 的探针 7
33	Southern 杂交检测中 EPSPS 的探针 8
34	位于 T-DNA 上的引物 19, 与 SEQ ID NO: 13 方向一致
35	位于 T-DNA 上的引物 20, 与 SEQ ID NO: 13 方向相反
36	位于 T-DNA 上的引物 21, 与 SEQ ID NO: 13 方向相反
37	位于 T-DNA 上的引物 22, 与 SEQ ID NO: 15 方向一致
38	位于 T-DNA 上的引物 23, 与 SEQ ID NO: 15 方向相反
39	位于 T-DNA 上的引物 24, 与 SEQ ID NO: 15 方向相反

[0048] 本发明还提供一种保护玉米植物免于昆虫侵袭的方法,包括在靶标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基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2;或者所述转基因玉米植物基因组中包含SEQ ID NO:5所示序列;摄食所述转基因玉米植物细胞的靶标昆虫被抑制进一步摄食所述玉米植物。

[0049] 本发明还提供一种保护玉米植物免受由除草剂引起的损伤的方法,种植至少一种转基因玉米植物,所述转基因玉米植物基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2;或者所述转基因玉米植物基因组中包含SEQ ID NO:5所示序列。在一些实施方式中,所述方法包括将有效剂量草甘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包含转基因玉米事件LP018-1。

[0050] 本发明还提供一种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甘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基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2;或者所述转基因玉米植物基因组中包含SEQ ID NO:5所示序列。

[0051] 本发明还提供一种培养对昆虫具有抗性的玉米植物的方法,包括:种植至少一粒玉米种子,所述玉米种子的基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2;或者所述玉米种子的基因组中包含SEQ ID NO:5所示序列;

[0052] 使所述玉米种子长成玉米植株;

[0053] 用靶标昆虫侵袭所述玉米植株,和/或用有效剂量草甘膦除草剂喷洒所述玉米植株,收获与其他非所述玉米种子的植株相比具有减弱的植物损伤的植株。

[0054] 在一些实施方式中,本发明提供一种培养对昆虫具有抗性的且耐受草甘膦除草剂的玉米植物的方法,包括:

[0055] 种植至少一粒玉米种子,所述玉米种子的基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2;或者所述玉米种子的基因组中包含SEQ ID NO:5所示序列;

[0056] 使所述玉米种子长成玉米植株;

[0057] 用有效剂量草甘膦除草剂喷洒所述玉米植株,收获与其他非所述玉米种子的植株相比具有减弱的植物损伤的植株,所述具有减弱的植物损伤的植株对昆虫的摄食损伤也有抗性。

[0058] 在一些实施方式中,本发明还提供一种产生对昆虫具有抗性的玉米植株的方法,包括向所述玉米植株的基因组中引入转基因玉米事件LP018-1,选择对昆虫的摄食具有减弱的植物损伤的玉米植株。在一些实施方式中,该方法包括:将对昆虫具有抗性的转基因玉米事件LP018-1第一亲本玉米植株与缺少昆虫抗性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;用靶标昆虫侵袭所述子代植株;选择与其他不具有转基因玉米事件LP018-1的植株相比具有减弱的植物损伤的所述子代植株。

[0059] 在一些实施方式中,本发明还提供一种产生对草甘膦除草剂具有耐受性的玉米植株的方法,包括向所述玉米植株的基因组中引入转基因玉米事件LP018-1,选择耐受草甘膦的玉米植株。在一些实施方式中,所述方法包括:将对草甘膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件LP018-1第一亲本玉米植株与缺少草甘膦耐受性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;用草甘膦除草剂处理所述子代植株;选择耐受草甘膦的所述子代植株。

[0060] 在一些实施方式中,本发明还提供一种产生对昆虫具有抗性且耐受草甘膦除草剂施用的玉米植株的方法,包括:向所述玉米植株的基因组中引入转基因玉米事件LP018-1,选择耐受草甘膦和具有昆虫抗性的玉米植株。在一些实施方式中,所述方法包括将耐受草甘膦和具有昆虫抗性的转基因玉米事件LP018-1第一亲本玉米植株与缺少草甘膦耐受性和/或昆虫抗性的第二亲本玉米植株有性杂交,从而产生大量子代植株;用草甘膦处理所述子代植株;选择耐受草甘膦的所述子代植株,耐受草甘膦的所述子代植株对昆虫的摄食损伤也有抗性。

[0061] 本发明还提供一种产生自转基因玉米事件LP018-1的组合物,所述组合物为玉米粉、玉米面、玉米油、玉米穗丝或玉米淀粉。在一些实施方式中,所述组合物可为玉米粉、玉米面、玉米油、玉米淀粉、玉米面筋、玉米饼、化妆品或填充剂等农产品或商品。如果在所述组合物中检测到足够的表达量,所述组合物预期含有能够诊断转基因玉米事件LP018-1材料在所述组合物中存在的核酸序列。具体而言,所述组合物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。

[0062] 可采用本发明的基于探针或引物对的检测方法和/或试剂盒以检测生物样品中诸如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的转基因玉米事件LP018-1核酸序列,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,以诊断转基因玉米事件LP018-1的存在。

[0063] 综上所述,本发明转基因玉米事件LP018-1具有抗虫耐除草剂双重性状,具有如下优点:1) 免受由于鳞翅目害虫(如玉米种植区的主要害虫亚洲玉米螟、草地贪夜蛾和棉铃虫等)和鞘翅目害虫(西方玉米根虫、北方玉米根虫和墨西哥玉米根虫等)造成的经济损失;2) 施加含草甘膦的农业除草剂给玉米作物用于广谱杂草控制的能力;3) 玉米产量未降低。具体而言,本发明的事件LP018-1对靶标害虫抗性达到中抗或高抗水平,最高可使害虫死亡率达100%;对草甘膦除草剂耐受性高,在草甘膦除草剂施用量为四倍推荐剂量的情况下,仍可保护植物使其受害率低至0%;且含有该事件的植物农艺性状表现优良,产量百分率可高达101%。此外,编码昆虫抗性和草甘膦耐受性性状的基因连锁在同一DNA区段上,并且存在于转基因玉米事件LP018-1基因组的单一基因座上,这一点提高了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提供的引物或探针序列可产生鉴定为转基因玉米事件LP018-1或其后代的扩增产物,能够快速、准确、稳定的鉴定出来源于转基因玉米事件LP018-1的植物材料的存在。

[0064] 术语

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 所述“包含”是指“包括但不限于”。所述“加工品”是指植物、种子等原料经加工处理得到的产物,例如组合物等。

[0068] 术语“植物”包括整株植物、植物细胞、植物器官、植物原生质体、植物可以从中再生的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物丛(*plant clumps*)和植物或植物部分中完整的植物细胞,所述植物部分例如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、茎秆、根、根尖、花药等。应理解为本发明范围内的转基因植物的部分包括但不限于植物细胞、原生质体、组织、愈伤组织、胚以及花、茎、果实、叶和根,以上植物部分源自事先用本发明的DNA分子转化的并因此至少部分地由转基因细胞组成的转基因植物或其子代。

[0069] 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”。

[0070] “侧翼DNA”可以包含天然存在于例如植物的生物体中的基因组或通过转化过程引入的外源(异源)DNA,例如与转化事件相关的片段。因此,侧翼DNA可以包括天然和外源DNA的组合。在本发明中,“侧翼区”或“侧翼序列”或“基因组边界区”或“基因组边界序列”是指至少3、5、10、11、15、20、50、100、200、300、400、1000、1500、2000、2500或5000碱基对或更长的序列,其位于最初外源插入DNA分子的直接上游或下游并且与最初外源插入DNA分子相邻。当该侧翼区位于下游时,其也可以称为“左边界侧翼”或“3'侧翼”或“3'基因组边界区”或“基因组3'边界序列”等。当该侧翼区位于上游时,其也可以称为“右边界侧翼”或“5'侧翼”或“5'基因组边界区”或“基因组5'边界序列”等。

[0071] 引起外源DNA的随机整合的转化程序会导致含有不同侧翼区的转化体,所述不同侧翼区是每个转化体所特异性含有的。当重组DNA通过传统杂交被引入植物时,其侧翼区通常不会改变。转化体也会含有异源插入物DNA和基因组DNA的段之间或两段基因组DNA之间或两段异源DNA之间的独特的接合。“接合”是两个具体的DNA片段连接的点。例如,接合存在于插入物DNA连接侧翼DNA的位置。接合点还存在于转化的生物体中,其中两个DNA片段以修饰自天然生物体中发现的方式的连接在一起。“接合DNA”是指包含接合点的DNA。

[0072] 本发明提供了称为LP018-1的转基因玉米事件及其后代,所述转基因玉米事件LP018-1即为玉米植物LP018-1,其包括转基因玉米事件LP018-1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LP018-1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LP018-1的产物,例如玉米粉、玉米面、玉米油、玉米浆、玉米穗丝、玉米淀粉和留在玉米作物田间的生物量。

[0073] 本发明转基因玉米事件LP018-1包含DNA构建体,当其在植物细胞内表达时,所述转基因玉米事件LP018-1获得对昆虫的抗性和对草甘膦除草剂的耐受性。

[0074] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA构建体包含四个串联的表达盒,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,可操作性的连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的Cry3Bb蛋白(Cry3Bb)的核酸序列,所述的Cry3Bb蛋白具有鞘翅目昆虫抗性;第二个表达盒由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,所述启动子可操作性的连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性Cry3Aa蛋白(Cry3Aa)的核酸序列,所述的Cry3Aa具有鞘翅目昆虫抗性;第三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Cry1Fa蛋白的核酸序列,所述Cry1Fa蛋白的核酸序列主要对鳞翅目昆虫具有抗性。第四个表达盒包含用于在植物中表达的适合的启动子和适合的多聚腺苷酸化信号序列,所述启动子可操作地连接编码5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的基因,所述EPSPS蛋白的核酸序列对草甘膦除草剂具有耐受性。进一步地,所述启动子可以为从植物分离的适合启动子,包括组成型、诱导型和/或组织特异性启动子,所述适合启动子包括但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV)p35S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) t35S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 $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)基因的多聚腺苷酸化信号序列。

[0075] 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/转运肽核酸编码序列。所述增强子可以增强基因的表达水平,所述增强子包括但不限于,烟草蚀刻病毒(TEV)翻译激活因子、CaMV35S增强子和FMV35S增强子。所述信号肽/转运肽可以引导EPSPS蛋白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。

[0076] 所述cry3Bb、cry3Aa和cry1Fa基因可以是从小苏云金芽胞杆菌(*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cry3Bb、cry3Aa和cry1Fa基因的核酸序列,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。

[0077] 在本发明的一些实施方式中,包含转基因玉米事件LP018-1的玉米细胞、种子或植物在其基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第655-16125位核酸序列和SEQ ID NO:2,或者包含SEQ ID NO:5。

[0078] 所述“鳞翅目”,学名Lepidoptera,包括蛾、蝶两类昆虫,是农林害虫最多的一个目,如玉米螟、棉铃虫、东方黏虫、草地贪夜蛾、二点委夜蛾、桃蛀螟等。

[0079] 所述“鞘翅目”,学名Coleoptera,是昆虫纲中乃至动物界种类最多、分布最广的第1大目。种类繁多,系统复杂。这个类群的前翅角质化、坚硬、无翅脉,称为“鞘翅”。玉米的主要害虫包括西方玉米根虫、北方玉米根虫和墨西哥玉米根虫等。

[0080] 所述5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)基因可以是从小苏云金芽胞杆菌CP4菌株中分离得到的,且可以通过优化密码子或者以其它方式改变编码EPSPS基因的多核苷酸,以达到增加转化细胞中转录物的稳定性和可利用性的目的。所述5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)基因也可以作为选择性标记基因。

[0081] 所述“草甘膦”是指N-磷酰甲基甘氨酸和它的盐,用“草甘膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草甘膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草甘膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草甘膦的除草剂制剂处理包含了来源于转基因玉米事件LP018-1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LP018-1的植物材料的生长或产量。

[0082] 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,农杆菌介导转化法、基因枪转化法和花粉管通道转化法。

[0083] 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。

[0084] 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)。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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构建体具体的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具体的在植物细胞内表达。

[0088] 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”指包括异源DNA的原始转化体和该转化体的后代。术语“事件”还指转化体和含有异源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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 培养对鳞翅目和鞘翅目昆虫具有抗性且对草甘膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件LP018-1,可通过以下步骤: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LP018-1及其后代的玉米植物组成,该转基因玉米事件LP018-1及其后代是通过利用本发明的对鳞翅目和鞘翅目昆虫具有抗性且对草甘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和鞘翅目昆虫的抗性和/或对草甘膦除草剂具有耐

受性;然后选择对鳞翅目和鞘翅目昆虫的侵袭具有抗性和/或对草甘膦除草剂具有耐受性的子代植株,可以培育出对鳞翅目和鞘翅目昆虫具有抗性且对草甘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具有鳞翅目和鞘翅目昆虫抗性和/或草甘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,然后通过用鳞翅目和鞘翅目昆虫侵袭、施加草甘膦除草剂或通过性状相关的分子标记物(如包含转基因玉米事件LP018-1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,从而产生对鳞翅目和鞘翅目昆虫具有抗性且对草甘膦除草剂具有耐受性的玉米植物。

[0093] 还应理解的是,两种不同的转基因植物也可以杂交以产生含有两个独立的、分离式添加的外源基因的后代。适当后代的自交可以得到对两个添加的外源基因来说都是纯合子的后代植株。如前所述的对亲本植株的回交和与非转基因植物的异型杂交也是可以预期的,无性繁殖也是同样的。

[0094] 术语“探针”是一段分离的核酸分子,其上面可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LP018-1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LP018-1或种子还是来源于转基因玉米事件LP018-1的植物或种子或提取物。本发明的探针不仅包括脱氧核糖核酸或核糖核酸,还包括特异性地与目标DNA序列结合并可用于检测该目标DNA序列的存在的聚酰胺及其他探针材料。

[0095] 术语“引物”是一段分离的核酸分子,其通过核酸杂交,退火结合到互补的目标DNA链上,在引物和目标DNA链之间形成杂合体,然后在聚合酶(例如DNA聚合酶)的作用下,沿目标DNA链延伸。本发明的引物对涉及其在目标核酸序列扩增中的应用,例如,通过聚合酶链式反应(PCR)或其他常规的核酸扩增方法。

[0096] 设计和使用引物和探针的方法是本领域众所周知的。包含SEQ ID NO:1-7的全长或片段的DNA分子可用作检测转基因玉米事件LP018-1的引物和探针,并且可以由本领域技术人员使用本文提供的序列容易地设计。

[0097] 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。

[0098] 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LP018-1的植物材料中分离相应的DNA分子,并确定该DNA分子的核酸序列。所述DNA分子包含转基因插入序列和玉米基因组侧翼区域,所述DNA分子的片段可以用作引物或探针。

[0099] 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LP018-1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向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。

[0100] 如本发明使用的,基本同源的序列是一段核酸分子,该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进DNA杂交的适合的严格条件,例如,大约在45°C条件下用 $6.0\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)处理,然后在50°C条件下用 $2.0\times$ SSC洗涤,这些条件对本领域技术人员是公知的。例如,在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 $2.0\times$ SSC、50°C到高度严格条件的约 $0.2\times$ 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。具体的,本发明的一个核酸分子可以在中度严格条件下,例如在约 $2.0\times$ 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。更具体的,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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 如本发明使用的,“经过扩增的DNA”、“扩增产物”或“扩增子”是指作为核酸模板一部分的目标核酸序列的核酸扩增产物。例如,为了确定玉米植物是否由含有本发明转基因玉米事件LP018-1通过有性杂交方式产生,或采集自田间的玉米样品是否包含转基因玉米事件LP018-1,或玉米提取物,例如粗粉、粉或油是否包含转基因玉米事件LP018-1,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LP018-1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LP018-1也是诊断性的。扩增子的长度范围可以是引物对的结合长度加上一个核苷酸碱基对,优选加上约五十个核苷酸碱基对,更优选加上约两百五十个核苷酸碱基对,最优选加上约四百五十个核苷酸碱基对或更多。

[0104] 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。

[0105] 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22kb的基因组DNA和42kb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LP018-1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LP018-1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。

[0106] 基于DNA扩增方法的DNA检测试剂盒可含有DNA引物分子,它们在适当的反应条件下特异性杂交到目标DNA上并扩增诊断性扩增子。试剂盒可提供基于琼脂糖凝胶的检测方法或者现有技术已知的检测诊断性扩增子的许多方法。含有与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的玉米基因组区的任何部分同源或互补的、以及与SEQ ID NO:5的转基因插入区的任何部分同源或互补的DNA引物的试剂盒是本发明所提供的。特别地,鉴别在DNA扩增方法中有用的引物对是SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其扩增与转基因玉米事件LP018-1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。

[0107] 这些方法所产生的扩增子可以通过多种技术进行检测。其中一个方法是Genetic Bit Analysis,该方法设计了一个跨越插入DNA序列和相邻的侧翼基因组DNA序列的DNA寡核苷酸链。将该寡核苷酸链固定在一个微孔板的微孔内,在对目标区域进行PCR扩增后(在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物),单链PCR产物可与固定的寡核苷酸链进行杂交,并且作为单碱基延伸反应的模板,该延伸反应使用了DNA聚合酶和为下一个预期的碱基特定标记的ddNTPs。可以通过荧光或ELISA类方法得到结果。信号代表了插入/侧翼序列的存在,其说明扩增、杂交和单碱基延伸反应是成功的。

[0108] 另一种方法是Pyrosequencing(焦磷酸测序)技术。该方法设计了一个跨越插入DNA序列和相邻的基因组DNA结合部位的寡核苷酸链。将该寡核苷酸链和目标区域的单链PCR产物(在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物)进行杂交,然后和DNA聚合酶、ATP、硫酰基酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、腺苷-5'-磷硫酸盐和萤光素一起进行温育。分别加入dNTPs,测量产生的光信号。光信号代表了插入/侧翼序列的存在,其说明扩增、杂交、和单碱基或多碱基延伸反应是成功的。

[0109] 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ddNTPs一起进行温育。单碱基延伸会导致插入ddNTPs。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。

[0110] Taqman被描述为一种检测和定量分析DNA序列存在的方法,该方法在制造商所提供的使用说明中有详细介绍。现简要举例说明如下,设计一个跨越插入DNA序列和相邻的基因组侧翼结合部位的FRET寡核苷酸探针。该FRET探针和PCR引物(在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物)在热稳定聚合酶和dNTPs存在下进行循环反应。FRET探针的杂交导致FRET探针上荧光部分和淬灭部分的分裂以及荧光部分的释放。荧光信号的产生代表了插入/侧翼序列的存在,其说明扩增和杂交是成功的。

[0111] 基于杂交原理,用于检测来源于转基因玉米事件LP018-1的植物材料的适合技术还可以包括Southern印迹杂交、Northern印迹杂交和原位杂交。特别地,所述适合技术包括温育探针和样品,洗涤以移除未结合的探针和检测探针是否已经杂交。所述的检测方法取决于探针所附标记的类型,例如,通过X光片曝光和显影可以检测放射性标记的探针,或通过底物转化实现颜色变化可以检测酶标记的探针。

[0112] Tyangi等(自然生物技术(Nat.Biotech.)14:303-308,1996)介绍了分子标记在序列检测中的应用。简要说明如下,设计一个跨越插入DNA序列和相邻的基因组侧翼结合部位的FRET寡核苷酸探针。该FRET探针的独特结构导致其含有二级结构,该二级结构能够在近距离内保持荧光部分和淬灭部分。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。

[0113] 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。

[0114] 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LP018-1的DNA,还可以用于培育含有转基因玉米事件LP018-1的DNA的玉米植物。所述试剂盒可以含有DNA引物或探针,其同源于或互补于SEQ ID NO:1、2、3、4或5的至少一部分,或含有其它DNA引物或探针,其同源于或互补于DNA的转基因遗传元件中所含的DNA,这些DNA序列可以用于DNA扩增反应,或作为DNA杂交方法中的探针。

[0115] 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LP018-1侧翼基因组区域;来自农杆菌的右侧边界区域(RB)的一部分插入序列;第一个表达盒由花椰菜花叶病毒(CaMV) p35S启动子,可操作地连接到玉米热激蛋白基因HSP70蛋白内含子(iZmHSP70)上,可操作性的连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的Cry3Bb蛋白(Cry3Bb)上,可操作性的连接到胭脂合酶的转录终止子(tNos)上而组成;第二个表达盒由含有水稻pOsAct1启动子,可操作性的

连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性基因Cry3Aa (Cry3Aa) 上,可操作地连接到来自玉米In基因(tIn2)终止子上而组成;第三个表达盒由玉米polyubiquitin-1基因的pZmUbi1启动子,可操作性地连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的Cry1Fa蛋白 (Cry1Fa) 上,并可操作地连接到来自根瘤农杆菌pTi15955的ORF25PolyA终止子;第四个表达盒由玄参花叶病毒(pFMV) pFMV启动子,可操作地连接到玉米热激蛋白内含子(iZmHsp70)和玉米ZmCTP转运肽上,可操作地连接到土壤杆菌属CP4菌株的草甘膦耐受性的5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)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;来自农杆菌的左侧边界区域(LB)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LP018-1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LP018-1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LP018-1中侧翼玉米基因组的DNA区域的任何部分。

[0116] 转基因玉米事件LP018-1可以与其他转基因玉米品种组合,例如除草剂(如草铵膦、麦草畏等)耐受性的玉米,或携带其他抗虫基因的转基因玉米品种(如金龟子、蛴螬、双斑萤叶甲等)。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LP018-1一起育种,可以提供抗多种害虫并耐受多种除草剂的改良杂种转基因玉米品种。这些品种相比于非转基因品种和单性状的转基因品种可以表现出产量提升等更优异的特征。

[0117] 本发明提供了转基因玉米事件LP018-1,用于检测包含该事件的玉米植物的核酸序列及其检测方法,转基因玉米事件LP018-1对鳞翅目和鞘翅目害虫的摄食损伤有抗性的,并且耐受含草甘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Cry3Bb、Cry3Aa和Cry1Fa蛋白,其提供了对鳞翅目(如亚洲玉米螟、草地贪夜蛾)和鞘翅目(如西方玉米根虫、北方玉米根虫)害虫摄食损伤的抗性;且其表达土壤杆菌属菌株CP4的草甘膦抗性的5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)蛋白,其赋予植物对草甘膦的耐受性。

## 附图说明

[0118] 图1为本发明用于检测玉米植物LP018-1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结合部位的结构示意图;

[0119] 图2为本发明用于检测玉米植物LP018-1的核酸序列及其检测方法的重组表达载体pLP018的结构示意图;

[0120] 图3 为本发明的包含转基因玉米事件LP018-1的转基因玉米对鳞翅目害虫离体抗性效果图;

[0121] 图4为本发明的包含转基因玉米事件LP018-1的转基因玉米在心叶期进行亚洲玉米螟田间人工接虫效果图;

[0122] 图5为本发明的包含转基因玉米事件LP018-1的转基因玉米在草地贪夜蛾自然发生条件下的田间效果图;

[0123] 图6为本发明的包含转基因玉米事件LP018-1的转基因玉米在喷施4倍剂量草甘膦除草剂的田间推荐喷施浓度的田间效果图。

## 具体实施方式

[0124] 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LP018-1的核酸序列及其检测方法的技术方案。

[0125] 实施例1 克隆与转化

[0126] 1.1、载体克隆

[0127] 使用标准的基因克隆技术构建重组表达载体pLP018(如图2所示)。所述载体pLP018包含4个串联的转基因表达盒,第一个表达盒由花椰菜花叶病毒(CaMV)p35S启动子,可操作地连接到玉米热激蛋白基因HSP70蛋白内含子(iZmHSP70)上,可操作性的连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的Cry3Bb蛋白(Cry3Bb)上,可操作性的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水稻pOsAct1启动子,可操作性的连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性基因Cry3Aa(Cry3Aa)上,可操作地连接到来自玉米In基因(tIn2)终止子上而组成;第三个表达盒由玉米polyubiquitin-1基因的pZmUbi1启动子,可操作性地连接到苏云金芽孢杆菌的昆虫抗性的Cry1Fa蛋白(Cry1Fa)上,并可操作地连接到来自根瘤农杆菌pTi15955的ORF25PolyA终止子;第四个表达盒由玄参花叶病毒(FMV)pFWV启动子,可操作地连接到玉米热激蛋白内含子(iZmHsp70)和玉米ZmCTP转运肽上,可操作地连接到土壤杆菌属CP4菌株的草甘膦耐受性的5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)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。将所述载体pLP018用液氮法转化到农杆菌LBA4404(Invitrogen,Chicago,USA;Cat.No:18313-015)中,并且以5-烯醇-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)为选择标记对转化细胞进行筛选。

[0128] 1.2、植物转化

[0129] 采用常规的农杆菌侵染法进行转化,将无菌培养的玉米(AX808品种)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pLP018中的T-DNA转入到玉米染色体组中,以产生转基因玉米事件。

[0130] 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cry3Bb、cry3Aa和cry1Fa基因的核酸序列和epsps基因的核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,幼胚具体的浸入农杆菌悬浮液(OD660=0.4-0.6,侵染培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖68.5g/L、葡萄糖36g/L、乙酰丁香酮(AS)40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L,pH5.3)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)。具体的,幼胚在侵染步骤后在固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖20g/L、葡萄糖10g/L、乙酰丁香酮(AS)100mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、琼脂8g/L,pH5.8)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4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、植物凝胶3g/L,pH 5.8)中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素(头孢霉素),不添加植物转化体的选择剂(步骤3:恢复步骤)。具体的,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(N-(磷羧甲基)甘氨酸)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)。具体的,幼胚在有选择剂的筛选固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、N-(磷羧甲基)甘氨酸0.25mol/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、植物凝胶3g/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),具体的,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。

[0131] 筛选得到的抗性愈伤组织转移到MS分化培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、6-苄基腺嘌呤2mg/L、N-(磷羧甲基)甘氨酸0.125mol/L、植物凝胶3g/L, pH=5.8)上,25℃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2.15g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、吡啶-3-乙酸1mg/L、琼脂8g/L, pH=5.8)上,25℃下培养至约10cm高,移至温室培养至结实。在温室中,每天于28℃下培养16小时,再于20℃下培养8小时。

[0132] 1.3、转基因事件的鉴定和筛选

[0133] 一共产生3000个独立转基因T0单株。经过多代的农艺性状筛选、抗虫性筛选、拷贝数筛选等手段,获得农艺性状表现良好,对玉米螟、草地贪夜蛾等害虫高抗以及高抗草甘膦,且为单拷贝的LP018-1。

[0134] 实施例2 用TaqMan进行转基因玉米事件LP018-1检测

[0135] 取转基因玉米事件LP018-1的叶片约100mg作为样品,用Qiagen的DNeasyPlant Maxi Kit提取其基因组DNA,通过Taqman探针荧光定量PCR方法检测cry3Bb、cry3Aa、cry1Fa和epsps的拷贝数。同时以野生型玉米植株(非转基因,转化受体)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。

[0136] 具体方法如下:

[0137] 步骤1、取转基因玉米事件LP018-1的叶片100mg,在研钵中用液氮研成匀浆,每个样品取3个重复;

[0138] 步骤2、使用Qiagen的DNeasy Plant Mini Kit提取上述样品的基因组DNA,具体方法参考其产品说明书;

[0139] 步骤3、用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)测定上述样品的基因组DNA浓度;

[0140] 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80-100ng/ $\mu$ l;

[0141] 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:

[0142] 以下引物和探针用于检测cry3Bb基因序列:

[0143] 引物1: CACCTTTGTAACGCCAGGTA,如序列表中SEQ ID NO:16所示;

[0144] 引物2: CTATCGCCAACACCGATGTG,如序列表中SEQ ID NO:17所示;

[0145] 探针1: ACCTTCCATTCGGCCAGGCA,如序列表中SEQ ID NO:18所示;

[0146] 以下引物和探针用来检测cry3Aa基因序列:

[0147] 引物3: CAGGGCTCCAGAACAATGT,如序列表中SEQ ID NO:19所示;

[0148] 引物4: GCGCGGCTGGGTTCTT,如序列表中SEQ ID NO:20所示;

[0149] 探针2: AGGACTACGTTTCTGCGCTGTCCAGCT,如序列表中SEQ ID NO:21所示;

[0150] 以下引物和探针用来检测cry1Fa基因序列:

[0151] 引物5: GCTATGTCCAGTCCCCAACCT,如序列表中SEQ ID NO:22所示;

- [0152] 引物6:CAAGCTGCTAACCTGCACTTGT,如序列表中SEQ ID NO:23所示;
- [0153] 探针3:CCCAAACGACACAGCGTCGCG,如序列表中SEQID NO:24所示;
- [0154] 以下引物和探针用来检测epsps基因序列:
- [0155] 引物7:GCAAATCCTCTGGCCTTTCC,如序列表中SEQ ID NO:25所示;
- [0156] 引物8:TGAAGGACCGGTGGGAGAT,如序列表中SEQ ID NO:26所示;
- [0157] 探针4:CGTCCGCATTCCCGGCGA,如序列表中SEQ ID NO:27所示;
- [0158] PCR反应体系为

[0159]	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10μL
	50×引物/探针混合物	1μL
	基因组 DNA	3μL
	水 (ddH <sub>2</sub> O)	6μL

[0160] 所述50×引物/探针混合物包含1mM浓度的每种引物各45μL,100μM浓度的探针50μL和860μL 1×TE缓冲液,并且在4℃,贮藏在琥珀试管中。

[0161] PCR反应条件为

步骤	温度	时间
[0162] 21	95℃	5 分钟
22	95℃	30 秒
23	60℃	1 分钟
24	回到步骤 22, 重复 40 次	

[0163] 利用SDS2.3软件 (AppliedBiosystems) 分析数据,获得单拷贝的转基因玉米事件LP018-1。

[0164] 实施例3 转基因玉米事件LP018-1检测

[0165] 3.1、基因组DNA提取

[0166] DNA提取按照常规采用的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法:取2克幼嫩的转基因玉米事件LP018-1的叶片在液氮中研磨成粉后,加入0.5mL于温度65℃预热的DNA提取CTAB Buffer[20g/L CTAB,1.4M NaCl,100mM Tris-HCl,20mM EDTA(乙二胺四乙酸)],用NaOH调pH至8.0,充分混匀后,于温度65℃抽提90min;加入0.5倍体积苯酚,0.5倍体积氯仿,颠倒混匀;12000rpm(每分钟转数)转速下离心10min;吸取上清液,加入1倍体积异丙醇,轻柔晃动离心管,于温度-20℃静置30min;12000rpm转速下再离心10min;收集DNA到管底;弃上清液,用0.5mL体积浓度为70%的乙醇,洗涤沉淀;12000rpm转速下离心5min;真空抽干或在超净台吹干;DNA沉淀溶解于适量的TE缓冲液(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 8.0)中,保存在温度-20℃条件下。

[0167] 3.2、侧翼DNA序列的分析

[0168] 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80-100ng/μL之间。用选择出的限制性内切酶SpeI、PstI、BssHII(5'端分析)和SacI、KpnI、XmaI、NheI(3'端分析)分别酶切基因组DNA。每个酶切体系中加入26.5μL基因组DNA,0.5μL上述选择出的限制性内切酶以及3μL酶切缓冲液,适当温度下酶切1小时。待酶切结束后,向酶切体系中加入70μL无水乙醇,冰浴30min,转速12000rpm离心7min,弃上清,吹干,之后加入8.5μL双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)、1μL 10× T4 Buffer以及0.5μL T4连接酶在温度4℃连接过夜。用一系列嵌套引

物进行PCR扩增分离5'和3'转基因/基因组DNA。具体的,分离5'转基因/基因组DNA引物组合包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:34作为第一引物,SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36作为第二引物,SEQ ID NO:13作为测序引物。分离3'转基因/基因组DNA引物组合包括SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:37作为第一引物,SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39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。

[0169] 所获得的扩增子在2.0%琼脂糖凝胶上电泳以分离PCR反应物,随后使用QIAquick Gel提取试剂盒(目录#\_28704,Qiagen Inc.,Valencia,CA)从琼脂糖基质分离目的片段。然后对纯化的PCR产物测序(例如,ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA)并分析(例如,DNASTAR序列分析软件, DNASTAR Inc., Madison, WI)。

[0170] 使用标准PCR方法确认5'和3'侧翼序列和接点序列。5'侧翼序列和接点序列可使用SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:12,组合SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:34来确认。3'侧翼序列和接点序列可使用SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14,组合SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:37来确认。PCR反应体系和扩增条件如表3和表4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点序列。

[0171] PCR产物的DNA测序提供了可以用于设计其他DNA分子的DNA,所述其他DNA分子作为引物和探针用于来源于转基因玉米事件LP018-1的玉米植物或种子的鉴定。

[0172] 发现在SEQ ID NO:5的核苷酸1-643位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件LP018-1插入序列的右边界侧翼(5'侧翼序列),在SEQ ID NO:5的核苷酸16137-16725位显示的为玉米基因组序列在转基因玉米事件LP018-1插入序列的左边界侧翼(3'侧翼序列)。5'接合序列在SEQ ID NO:1中列出,3'接合序列在SEQ ID NO:2中列出。

### [0173] 3.3、PCR接合性测定

[0174] 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LP018-1的DNA是诊断性的。SEQ ID NO:1的结合序列由转基因玉米事件LP018-1的T-DNARB区插入位点和玉米基因组DNA插入位点一侧各11bp组成,SEQ ID NO:2的结合序列由转基因玉米事件LP018-1的T-DNALB区插入位点和玉米基因组DNA插入位点另一侧各11bp组成。更长或更短的多核苷酸接合序列可以从SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中选择。接合序列(5'连接区域SEQ ID NO:1,和3'连接区域SEQ ID NO:2)作为DNA探针或作为DNA引物分子在DNA检测方法中是有用的。接合序列SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7也是转基因玉米事件LP018-1中新的DNA序列,其也可以作为DNA探针或作为DNA引物分子检测转基因玉米事件LP018-1DNA的存在。所述SEQ ID NO:6(SEQ ID NO:3的核苷酸644-1129位)跨越了LP018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1-236位)跨越了tNos转录终止序列和LP018构建体DNA序列。

[0175] 此外,通过使用来自SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的至少一条的引物来产生扩增子,所述引物用于PCR方法中时产生转基因玉米事件LP018-1的诊断性扩增子。

[0176] 具体地,从转基因插入序列的5'末端产生PCR产物,该PCR产物为包含来源于转基因玉米事件LP018-1的植物材料的基因组中侧翼于T-DNA插入序列的5'末端的基因组DNA的一部分。这个PCR产物包含SEQ ID NO:3。为了进行PCR扩增,设计与侧翼于转基因插入序列的5'末端的基因组DNA序列杂交的引物11(SEQ ID NO:8),和与之配对的位于转基因tNos转录终止序列的引物12(SEQ ID NO:9)。

[0177] 从转基因插入序列的3'末端产生PCR产物,该PCR产物包含来源于转基因玉米事件LP018-1的植物材料的基因组中侧翼于T-DNA插入序列的3'末端的基因组DNA的一部分。这个PCR产物包含SEQ ID NO:4。为了进行PCR扩增,设计与侧翼于转基因插入序列的3'末端的基因组DNA序列杂交的引物14(SEQ ID NO:11),和与之配对的位于插入物的3'末端的tNos转录终止序列的引物13(SEQ ID NO:10)。

[0178] 表3和表4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LP018-1的诊断性扩增子。扩增子的检测可以通过使用StratageneRobocycle、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700或Eppendorf MastercyclerGradien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。

[0179] 表3、用于转基因玉米事件LP018-1的5'转基因插入物/基因组接合区域鉴定的PCR步骤和反应混合物

步骤	试剂	数量	备注
1	无核苷酸酶的水	添加到终体积 20 $\mu$ L	
2	10*反应缓冲液 (与 MgCl <sub>2</sub> )	2.0 $\mu$ L	1*缓冲液终浓度, 1.5mM MgCl <sub>2</sub> 终浓度
3	dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的 10mM 溶液	0.4 $\mu$ L	每种 dNTP 200 $\mu$ M 终浓度
4	事件引物 11 (SEQ ID NO:8 悬浮在 1*TE 缓冲液或无核苷酸酶水中到 10 $\mu$ M 的浓度)	0.2 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M 终浓度
5	事件引物 12 (SEQ ID NO:9 悬浮在 1*TE 缓冲液或无核苷酸酶水中到 10 $\mu$ M 的浓度)	0.2 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M 终浓度
[0180]	6 RNase, 无 DNase(500ng/mL)	0.1 $\mu$ L	50ng/反应
	7 REDTaq DNA 聚合酶 (1 单位/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ L(建议在下一步之前转换吸管)	1 单位/反应
	提取的 DNA (模板): 待分析样品的叶片	200ng 基因组 DNA	
	阴性对照	50ng 非转基因玉米基因组 DNA	
	阴性对照	无模板 DNA (DNA 重悬浮在其中的溶液)	
	阳性对照	50ng 包含 LP018-1 的玉米基因组 DNA	

[0181] 表4、Perkin-Elmer9700热循环仪条件

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

[0183] 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4循环参数在StratageneRobocycler (Stratagene,La Jolla,CA)、MJ Engine (MJ R-Biorad,Hercules,CA)、Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer,Boston,MA)或 Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf,Hamburg,Germany)热循环仪上进行PCR。MJ Engine或 Eppendorf Mastercycler Gradient热循环仪应当在计算的模式下运行。Perkin-Elmer9700热循环仪运行时要将变温速率(ramp speed)设定为最大值。

[0184] 实验结果表明:引物11和12 (SEQ ID NO:8和9),当其用在转基因玉米事件LP018-1基因组DNA的PCR反应中时,产生1129bp片段的扩增产物,当其用在未转化玉米基因组DNA和非LP018-1玉米基因组DNA的PCR反应中时,没有片段被扩增;引物13和14 (SEQ ID NO:10和11),当其用在转基因玉米事件LP018-1基因组DNA的PCR反应中时,产生825bp片段的扩增产物,当其用在未转化玉米基因组DNA和非LP018-1玉米基因组DNA的PCR反应中时,没有片段被扩增。

[0185] PCR接合性测定还可用于鉴定来源于转基因玉米事件LP018-1的材料是纯合子或是杂合子。将引物15 (SEQ ID NO:12)、引物16 (SEQ ID NO:13)和引物17 (SEQ ID NO:14),或将引物16 (SEQ ID NO:13)、引物17 (SEQ ID NO:14)和引物18 (SEQ ID NO:15)用于扩增反应以产生转基因玉米事件LP018-1的诊断性扩增子。表5和表6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LP018-1的诊断性扩增子。

[0186] 表5、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 $\mu$ L	
2	2*Universal Master Mix(Applied Biosystems 目录号 4304437)	5 $\mu$ L	1*终浓度
3	引物 15 (SEQ ID NO:12) 和引物 16 (SEQ ID NO:13) 和引物 17 (SEQ ID NO:14) (重悬浮于无核酸水中到 10 $\mu$ M 的浓度)	0.3 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M 终浓度
[0187] 4	REDTaq DNA 聚合酶 (1 单位/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L (建议在下一步之前转换吸管)	1 单位/反应
5	提取的 DNA (模板): 待分析样品的叶片	200ng 基因组 DNA	
	阴性对照	50ng 非转基因玉米基因组 DNA	
	阴性对照	无模板 DNA (DNA 重悬浮在其中的溶液)	
	阳性对照	50ng 包含 LP018-1 的玉米基因组 DNA	

[0188] 表6、接合性测定Perkin-Elmer9700热循环仪条件

循环数	设置
1	95 $^{\circ}$ C 10 分钟
10	95 $^{\circ}$ C 15 秒
	64 $^{\circ}$ C 1 分钟 (-1 $^{\circ}$ C/循环)
25	95 $^{\circ}$ C 15 秒
	54 $^{\circ}$ C 1 分钟
1	10 $^{\circ}$ C 浸没

[0190] 使用表6循环参数在StratageneRobocycler (Stratagene, La Jolla, CA)、MJ Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA)、Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) 或 Eppendorf MastercyclerGradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) 热循环仪上进行PCR。MJ Engine或Eppendorf Mastercycler Gradient热循环仪应当在计算的模式下运行。Perkin-Elmer 9700热循环仪运行时要将变温速率(ramp speed)设定为最大值。

[0191] 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LP018-1的存在情况的DNA。或者反应将由含有来源于玉米基因组的DNA的生物样品产生两个不同的DNA扩增子,所述来源于玉米基因组的DNA相对于转基因玉米事件LP018-1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

基因组基因座的第一扩增子和诊断转基因玉米事件LP018-1 DNA的存在情况的第二扩增子。仅产生对应于针对杂合基因组描述的第二扩增子的单个扩增子的玉米DNA样品,可诊断确定该样品中转基因玉米事件LP018-1的存在,且该样品由相对于转基因玉米植物LP018-1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。

[0192] 需要说明的是,转基因玉米事件LP018-1的引物对被用于产生对转基因玉米事件LP018-1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11和12(SEQ ID NO: 8 和9),和引物13和14(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9和10(SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29)被包括在内,作为反应条件的一个内在标准。对转基因玉米事件LP018-1DNA抽提样品的分析应该包括一个转基因玉米事件LP018-1的阳性组织DNA抽提物对照,一个来源于非转基因玉米事件LP018-1的阴性DNA抽提物对照和一个不含有模板玉米DNA抽提物的阴性对照。除了这些引物对之外,还可以使用来自SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4、或其互补序列的任何引物对,当它们被用于DNA扩增反应时分别产生对于来源于转基因事件玉米植物LP018-1的组织为诊断性的包含SEQ ID NO:1或 SEQ ID NO:2的扩增子。表3-表6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LP018-1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LP018-1为诊断性的扩增子的、推定含有包含转基因玉米事件LP018-1的玉米植物或种子DNA的提取物,或来源于转基因玉米事件LP018-1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LP018-1。

[0193] 实施例4 通过Southern印迹杂交进行转基因玉米事件LP018-1检测

[0194] 4.1、用于Southern印迹杂交的DNA提取

[0195] 利用T3、T4代纯合的转化事件进行Southern印迹分析。利用研钵和研杵,在液氮中研磨大约5到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 $\beta$ -巯基乙醇,2.5%w/v聚乙烯-吡咯烷酮)中重悬浮植物组织,以4000rpm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 $\beta$ -巯基乙醇,2.5%w/v聚乙烯-吡咯烷酮,3%肌氨酰胺,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4000rpm离心20分钟。收集含水层,并且在添加0.54体积异丙醇后以4000rpm离心5分钟以沉淀DNA。弃掉上清液,并且在500 $\mu$ 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 $\mu$ L 30mg/mL RNAaseA温育30分钟,以4000rpm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14000rpm离心10分钟沉淀DNA。弃掉上清液后,用500 $\mu$ L质量分数为70%的乙醇洗沉淀,并且使其干燥后在100 $\mu$ L TE中重悬浮。

[0196] 4.2、限制酶消化

[0197] 利用分光光度计或荧光计定量检测DNA浓度(利用1 $\times$ TAE和GelRED染料)。在100 $\mu$ L反应体系中,每次消化5 $\mu$ g DNA。用限制性内切酶MfeI和HindIII分别消化基因组DNA,以T-DNA上cry3Bb、cry3Aa、cry1Fa和epsps的部分序列作为探针。对于每种酶,在适当的温度下温育过夜消化物。利用真空离心蒸发浓缩器(speed vacuum)旋转样品以减少体积至30 $\mu$ L。

[0198] 4.3、凝胶电泳

[0199] 向来源于本实施例4.2中的每个样品添加溴酚蓝加样染料,并且将每个样品加样

到含有溴化乙锭的0.7%琼脂糖凝胶上,在TBE电泳缓冲液中电泳分离,在20伏特下电泳凝胶过夜。

[0200] 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印迹杂交如下:在盘中放置20张厚的干燥印迹纸,其上再放置4张薄的干燥印迹纸。在0.4M NaOH中,预先湿润1张薄印迹纸,并且放置在该纸堆上,接着放置1张在0.4M NaOH中预先湿润的Hybond-N+转移膜(Amersham Pharmacia Biotech,#RPN303B)。凝胶置放在上部,确保在凝胶和膜之间没有气泡。3张另外预先浸泡的印迹纸被放置在凝胶上部,并且用0.4M 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,将DNA转移到膜上。在室温下进行大约4小时的DNA转移。转移后,在 $2 \times$ SSC中漂洗Hybond膜10秒,DNA通过UV交联与膜结合。

[0201] 4.4、杂交

[0202] 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:30,SEQIDNO:31,SEQIDNO:32和SEQ ID NO:33,或者与上述序列部分同源或互补。将25ng探针DNA在45 $\mu$ L TE中煮沸5分钟,在冰上放置7分钟,然后转移到Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech,#RPN1633)试管中。向Rediprime试管添加5 $\mu$ L  $^{32}$ P标记的dCTP后,在37 $^{\circ}$ C温育探针15分钟。根据制造商的说明书,通过微离心G-50柱子(Amersham Pharmacia Biotech,#27-5330-01)离心,以移除未掺入的dNTPs,纯化该探针。利用闪烁计数器测量探针活性。通过在65 $^{\circ}$ C用20mL预加温的Church预杂交液(500mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,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,并且在冰上放置10分钟。向预杂交缓冲液添加适量探针(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,用20mL Church冲洗溶液1(40mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,1mM EDTA,5% SDS,0.5% BSA)漂洗后,在65 $^{\circ}$ C下,在150mL Church冲洗溶液1中洗膜20分钟。用Church冲洗溶液2(40mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,1mM EDTA,1%SDS)重复该过程2次。将该膜暴露于磷屏或X光片以检测探针结合的位置。

[0203] 每个Southern上包括两种对照样品:(1)来自阴性(未转化的)的分离子的DNA,其用于鉴定任何可与元件-特异性探针杂交的内源玉米序列;(2)来自阳性分离子的DNA,其中引入了HindIII消化的pLP018,其量基于探针长度等价于一个拷贝数,以说明在检测玉米基因组内的单个基因拷贝时,该实验的灵敏度。

[0204] 杂交数据提供了确证的证据支持TaqMan<sup>TM</sup> PCR分析,即玉米植物LP018-1含有cry3Bb、cry3Aa、cry1Fa和epsps基因的单拷贝。利用该cry3Bb探针,MfeI和HindIII酶解分别产生大小约11.8kb和38.0kb的单一条带;利用cry3Aa探针,MfeI和HindIII酶解分别产生大小约11.8kb和38.0kb的单一条带;利用cry1Fa探针,MfeI和HindIII酶解分别产生大小约11.7kb和38.0kb的单一条带;利用该epsps探针,MfeI和HindIII酶解分别产生大小约11.7kb和38.0kb的单一条带。这表明cry3Bb、cry3Aa、cry1Fa和epsps各一个拷贝存在于玉米转化事件LP018-1中。

[0205] 实施例5昆虫抗性检测

[0206] 5.1、玉米植物LP018-1的生物测定

[0207] 将转基因玉米事件LP018-1和野生型玉米植株(非转基因,转化受体对照(CK-))2种植株分别对亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)

和棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)按照如下方法进行生物测定:

[0208] 分别取转基因玉米事件LP018-1和野生型玉米植株(非转基因,转化受体对照(CK-))2种植株的新鲜叶片(V3-V4时期),用无菌水冲洗干净并用吸水纸将叶片上的水吸干,然后将玉米叶片去除叶脉,同时剪成约1cm×3cm大小的长条状,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,每个培养皿中接入10头人工饲养的初孵幼虫,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5天后统计结果。统计死亡率(死亡率=(死虫数/供试虫数)×100%)对抗性水平进行鉴定,结果如表7和图3所示。

[0209] 表7、转基因玉米事件LP018-1的离体抗虫生物测定结果-死亡率(%)

昆虫/植株	LP018-1	CK-
[0210] 亚洲玉米螟	100	2
棉铃虫	80	3
草地贪夜蛾	100	1

[0211] 5.2、转基因玉米事件LP018-1的田间抗虫效果测定

[0212] (1) 玉米螟

[0213] 采用活体接虫法对转基因玉米事件LP018-1进行田间主要靶标害虫亚洲玉米螟的抗性鉴定。在玉米4-6叶期和吐丝期(雌穗吐丝3-5 cm)接虫,每个时期接虫2次,每次50头,两次接虫间隔时间为一周。心叶期接虫14 d后,逐株调查玉米植株中上部叶片被亚洲玉米螟的取食情况,记录亚洲玉米螟食叶级别。吐丝期接虫后,在收获前调查雌穗被害程度及植株被害情况,包括玉米雌穗被害长度、蛀孔数量、蛀孔隧道长度、存活幼虫龄期和存活数量。根据“亚洲玉米螟对玉米心叶为害程度的分级标准(表8)”和“玉米心叶期对亚洲玉米螟抗性的评价标准(表9)”评价转基因玉米事件LP018-1心叶期对亚洲玉米螟的抗性,结果见图4和表12。吐丝期对果穗进行剖穗调查,根据“玉米穗期受亚洲玉米螟为害程度的分级标准(表10)”和“玉米穗期对亚洲玉米螟抗性的评价标准(表11)”评价转基因玉米事件LP018-1吐丝期对亚洲玉米螟的抗性,统计结果见表13。结果表明,在心叶期,转基因玉米事件LP018-1的食叶级别平均值显著低于转化受体对照(CK-);在吐丝期,转基因玉米事件LP018-1的雌穗被害率、幼虫存活数、隧道长度和雌穗被害级别均显著低于转化受体对照(CK-)。总的来说,在心叶期和吐丝期,转基因玉米事件LP018-1对亚洲玉米螟均具有良好抗性。

[0214] 表8、亚洲玉米螟对玉米心叶为害程度的分级标准

食叶级别	症状描述
1	叶片无被害, 或仅叶片上有针刺状 ( $\leq 1\text{mm}$ ) 虫孔
2	仅个别叶片上有少量弹孔大小 ( $\leq 5\text{mm}$ ) 虫孔
3	少数叶片有弹孔大小 ( $\leq 5\text{mm}$ ) 虫孔
4	个别叶片上缺刻 ( $\leq 10\text{mm}$ )
5	少数叶片上有缺刻 ( $\leq 10\text{mm}$ )
6	部分叶片上有缺刻 ( $\leq 10\text{mm}$ )
7	个别叶片部分被取食, 少数叶片上有大片缺刻 ( $\leq 10\text{mm}$ )
8	少数叶片被取食, 部分叶片上有大片缺刻 ( $\leq 10\text{mm}$ )
9	大部分叶片被取食

[0216] 表9、玉米心叶期对亚洲玉米螟抗性的评价标准

心叶期食叶级别平均值	抗性水平
1.0-2.9	高抗 (HR)
3.1-4.9	抗 (R)
5.0-6.9	中抗 (MR)
7.0-8.9	感 (S)
9.0	高感 (HS)

[0218] 表10、玉米穗期受亚洲玉米螟为害程度的分级标准

雌穗被害级别	症状描述
1	雌穗没有受害
2	花丝被害 $< 50\%$
3	大部花丝被害 $\geq 50\%$ ; 有幼虫存活, 龄期 $\leq 2$ 龄
4	穗尖被害 $\leq 1\text{cm}$ ; 有幼虫存活, 龄期 $\leq 3$ 龄
5	穗尖被害 $\leq 2\text{cm}$ ; 或有幼虫存活, 龄期 $\leq 4$ 龄; 隧道长度 $\leq 2\text{cm}$
6	穗尖被害 $\leq 3\text{cm}$ ; 或有幼虫存活, 龄期 $> 4$ 龄, 隧道长度 $\leq 4\text{cm}$
7	穗尖被害 $\leq 4\text{cm}$ ; 隧道长度 $\leq 6\text{cm}$
8	穗尖被害 $\leq 5\text{cm}$ ; 隧道长度 $\leq 8\text{cm}$
9	穗尖被害 $> 5\text{cm}$ ; 隧道长度 $> 8\text{cm}$

[0220] 表11、玉米穗期对亚洲玉米螟的抗性评价标准

	雌穗被害级别平均值	抗性类型
	1-2.0	高抗 (HR)
[0221]	2.1-3.0	抗 (R)
	3.1-5.0	中抗 (MR)
	5.1-7.0	感 (S)
	≥7.1	高感 (HS)

[0222] 表12、转基因玉米事件LP018-1心叶期对亚洲玉米螟的抗性结果

	项目/植株	LP018-1	CK-
[0223]	食叶级别平均值	1.80	8.35
	抗性水平	高抗	高感

[0224] 表13、转基因玉米事件LP018-1吐丝期对亚洲玉米螟的抗性结果

	项目/植株	LP018-1	CK-
	雌穗被害率 (%)	40	100
	幼虫存活数	0	15
[0225]	隧道长度 (cm)	0	2.50
	雌穗被害级别	1.70	5.65
	抗性水平	高抗	感

[0226] (2) 棉铃虫

[0227] 在玉米吐丝期对转基因玉米事件LP018-1进行人工接虫,共接虫2次,在每株玉米花丝中接人工饲养的初孵幼虫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,若阴性对照材料(CK-)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14所示,然后按表15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LP018-1吐丝期接种对棉铃虫的抗性结果如表16所示。结果表明,转基因玉米事件LP018-1对棉铃虫具有较高的抗性水平,且转基因玉米事件LP018-1的雌穗被害率、幼虫存活数、雌穗被害长度和雌穗被害级别均显著低于转化受体对照(CK-)。

[0228] 表14、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	雌穗没有被害
1	仅花丝被害
2	穗顶被害 1cm
3+	穗顶下被害每增 1cm, 相应的被害级别增加 1 级
...N	

[0230] 表15、玉米雌穗对棉铃虫的抗性评价标准

雌穗被害级别平均值	抗性类型
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)

[0232] 表16、转基因玉米事件LP018-1吐丝期对棉铃虫的抗性结果

项目/植株	LP018-1	CK-
雌穗被害率 (%)	56	100
幼虫存活数	3	18
隧道长度 (cm)	2.75	4.2
雌穗被害级别	3.75	5.2
抗性水平	中抗	感

## [0234] (3) 草地贪夜蛾

[0235] 在2022年3月份于海南省三亚市崖州区转基因玉米种植基地进行草地贪夜蛾的田间自然感虫试验。在初次发生虫害10-15天后,且转化受体对照(CK-)多为4-6龄高龄幼虫为害时,逐株调查草地贪夜蛾对玉米植株的为害率。转基因玉米事件LP018-1对草地贪夜蛾的抗性结果如表17所示,田间抗性效果见图5。结果表明,在草地贪夜蛾自然发生条件下,与对照(CK-)相比,草地贪夜蛾对转基因玉米事件LP018-1的为害率显著降低,由此说明转基因玉米事件LP018-1对草地贪夜蛾具有较高的抗性。

[0236] 表17、转基因玉米事件LP018-1在自然感虫条件下对草地贪夜蛾的抗性结果

项目/植株	LP018-1	CK-
被害率 (%)	0	100

## [0238] (4) 西方玉米根虫

[0239] 通过美洲合作单位的鉴定,在玉米V2期,将西方玉米根虫卵置于评估试验地块中,

转基因与对照(CK-)均做相同的处理,待玉米长到V10期,将评估区域的植株的根挖出,洗涤,逐株调查玉米根虫危害植株根部情况,转基因玉米事件LP018-1对玉米根虫的抗性结果如表18所示,结果表明,与对照(CK-)相比,玉米根虫对转基因玉米事件LP018-1的为害率显著降低,由此说明转基因玉米事件LP018-1对玉米根虫具有较高的抗性。

[0240] 表18、转基因玉米事件LP018-1在自然感虫条件下对草地贪夜蛾的抗性结果

[0241]	项目/植株	LP018-1	CK-
	被害率(%)	3	60

[0242] 实施例6玉米转化事件的除草剂耐受性检测

[0243] 本试验选用农达除草剂(41%草甘膦异丙铵盐水剂)进行喷施。采用随机区组设计,3次重复。小区面积为15m<sup>2</sup>(5m×3m),行距60cm,株距25cm,常规栽培管理,小区之间有1m的宽隔离带。将转基因玉米事件LP018-1与转化受体对照(CK-)分别进行如下2种处理:1)喷施清水;2)按3360 g a.e./ha(推荐用量4倍)剂量在V3叶期喷洒农达除草剂,然后在V8期按相同剂量再次喷洒农达除草剂。需要说明的是,不同含量和剂型的草甘膦除草剂换算成等量草甘膦酸的形式适用于以下结论。分别在用药后1周和2周调查药害症状并在收获时测定小区的产量。药害症状分级如表19所示。用除草剂受害率作为评价指标评估转化事件除草剂耐受性的指标,具体地,除草剂受害率(%) =  $\Sigma$ (同级受害株数×级别数)/(总株数×最高级别);其中除草剂受害率是指草甘膦受害率,草甘膦受害率是根据草甘膦处理后2周的药害调查结果而确定的。每个小区的玉米产量是称量各小区中间3行的玉米粒总产量(重量),不同处理间的产量差异以产量百分率的形式进行度量,产量百分率(%) = 喷施草甘膦产量/喷施清水产量。转基因玉米事件LP018-1对除草剂耐受性的结果如图6和表20所示。

[0244] 表19、草甘膦除草剂对玉米药害程度的分级标准

药害级别	症状描述
0级	无药害,与清水对照生长一致;
1级	微见药害症状,局部颜色变化,药害斑点占叶面积10%以下;
[0245] 2级	轻度抑制生长或失绿,药害斑点占叶面积1/4以下;
3级	对生长发育影响较大,叶畸形或植株矮化或药害斑点占叶面积1/2以下
4级	对生长发育影响大,叶严重畸形或植株明显矮化或叶枯斑3/4以下;
5级	药害极重,植株死亡或药害斑点占叶面积3/4以上。

[0246] 表20、转基因玉米事件LP018-1对草甘膦除草剂耐受性的结果和玉米产量结果

	项目/植株	LP018-1	CK
[0247]	对照处理（喷施清水）受害率（%）	0	0
	草甘膦受害率（%）（3360 g a.e./ha）	0	100
	产量百分率%（3360 g a.e./ha）	101	0

[0248] 结果表明,在除草剂(草甘膦)受害率方面:1)转基因玉米事件LP018-1在草甘膦除草剂(3360 g a.e./ha)处理下受害率基本为0,由此,转基因玉米事件LP018-1具有良好的草甘膦除草剂耐受性。

[0249] 在产量方面:转基因玉米事件LP018-1在喷施清水和喷施3360 g a.e./ha草甘膦2种处理下产量没有明显差异,在喷施草甘膦除草剂后,转基因玉米事件LP018-1的产量相比于喷施清水略有提高,由此,进一步表明转基因玉米事件LP018-1具有良好的草甘膦除草剂耐受性。

[0250] 综上所述,通过TaqMan<sup>TM</sup>分析(参见实施例2)检测再生的转基因玉米植株是否存在cry3Bb、cry3Aa、cry1Fa和epsps基因,并表征昆虫抗性和草甘膦除草剂耐受性品系的拷贝数。根据目的基因的拷贝数、良好的昆虫抗性、草甘膦除草剂耐受性和农艺性状表现(参见实施例5和实施例6),通过筛选,选定的事件LP018-1是优异的,其具有单拷贝转基因、良好的昆虫抗性、草甘膦除草剂耐受性和农艺性状表现。

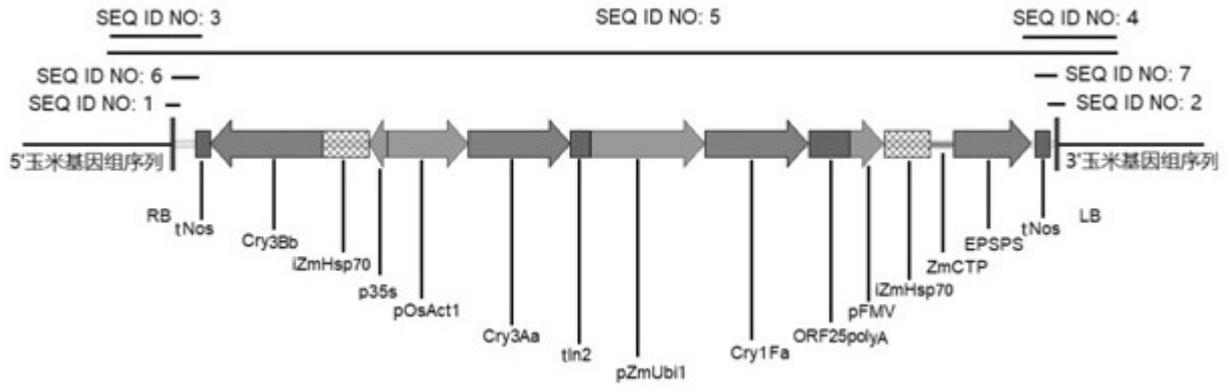


图1

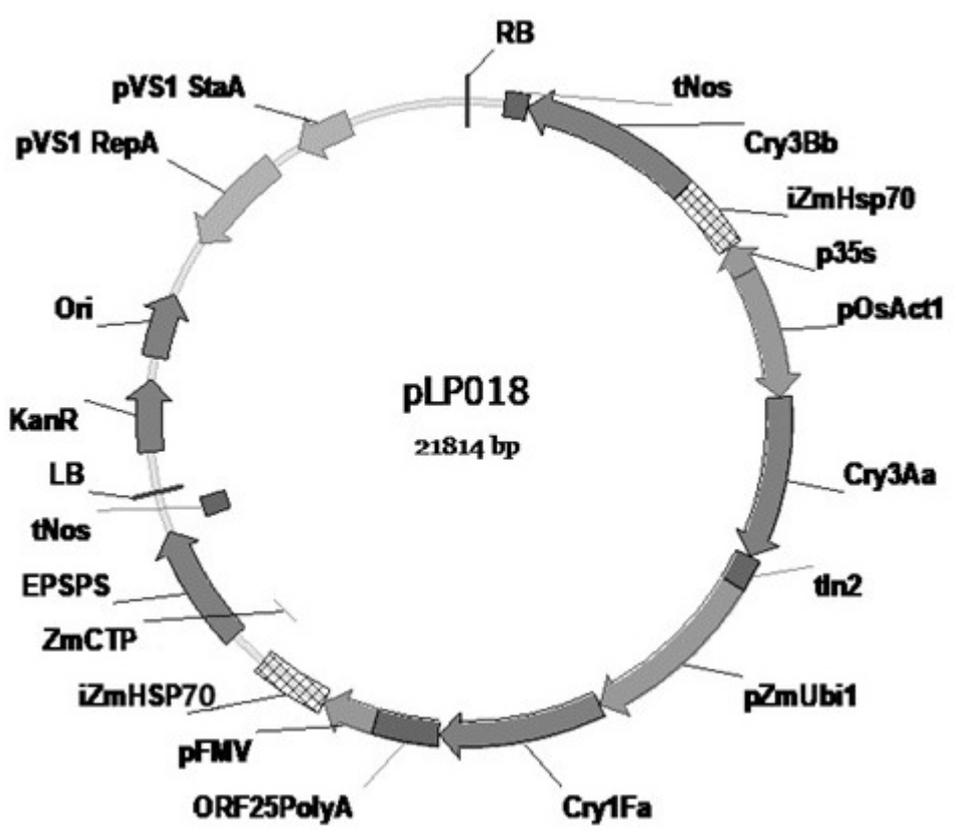


图2

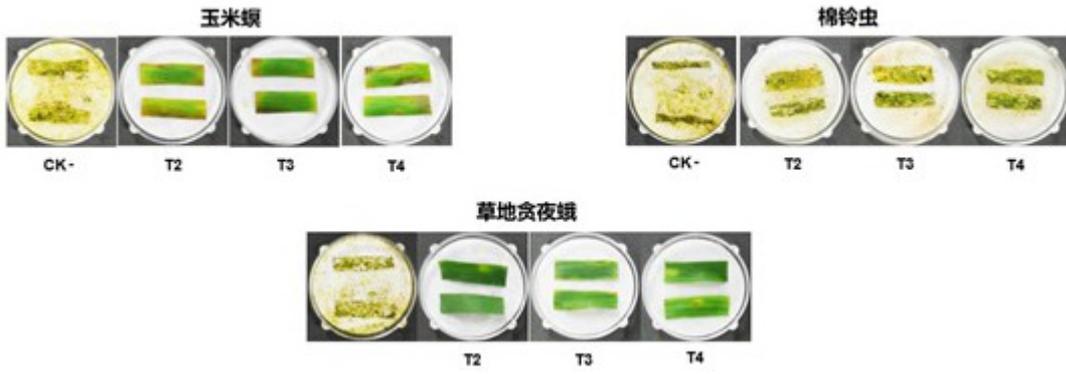


图3



图4

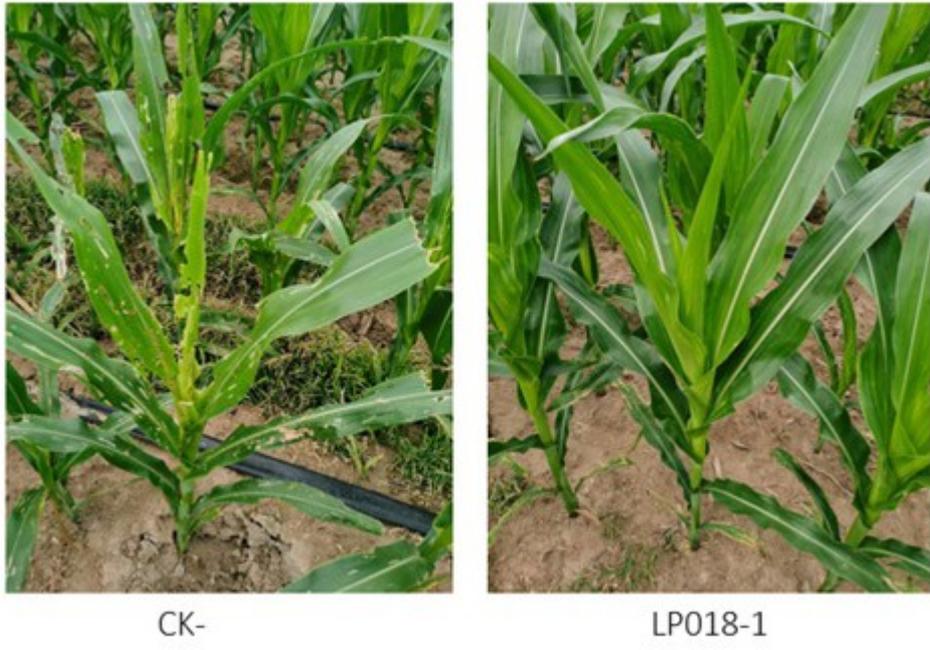


图5

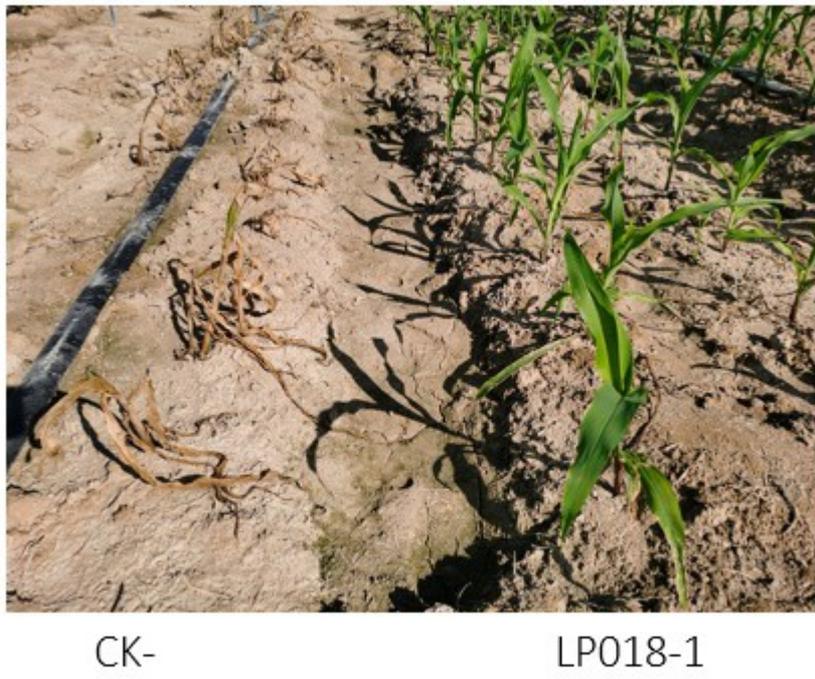


图6