



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112430684 B

(45) 授权公告日 2024.04.05

(21) 申请号 202011498142.7

(22) 申请日 2020.12.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112430684 A

(43) 申请公布日 2021.03.02

(73) 专利权人 湖北省农业科学院粮食作物研究所
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街瑶苑特1号

(72) 发明人 李三和 游艾青 刘凯 阚雯俊
周雷 徐华山 李培德 杨国才
陈志军 刘凯

(74) 专利代理机构 咸宁鸿信专利代理事务所
(普通合伙) 42249
专利代理师 汪彩彩

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 111206031 A, 2020.05.29
WO 2020166478 A1, 2020.08.20

CN 103667309 A, 2014.03.26

Yan Zhao 等. Allelic diversity in an NLR gene BPH9 enables rice to combat planthopper variation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 第113卷(第45期), 12850-12855.

Yang Wang 等. Marker assisted pyramiding of Bph6 and Bph9 into elite restorer line 93-11 and development of functional marker for Bph9. Rice. 2017, 第10卷51.

Bingliang Wan 等. Development of elite rice restorer lines in the genetic background of R022 possessing tolerance to brown planthopper, stem borer, leaf folder and herbicide through marker-assisted breeding. Euphytica. 2013, 第195卷 129-142.

吴比 等. 中国水稻遗传育种历程与展望. 遗传. 2018, (10), 55-71.

审查员 李梦华

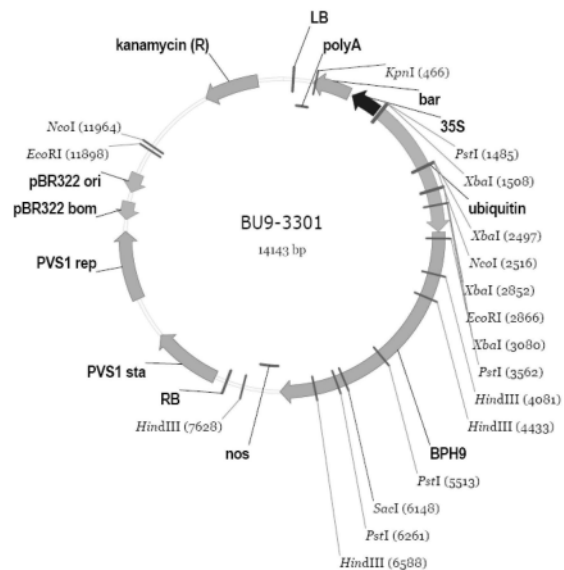
权利要求书1页 说明书24页
序列表8页 附图4页

(54) 发明名称

一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法,所述水稻植物的核酸序列包括SEQ ID NO:1所示序列或其互补序列、或者SEQ ID NO:2所示序列或其互补序列。本发明水稻植物H23对褐飞虱和草铵膦除草剂具有较好的抗性,且检测方法可以准确快速地鉴定生物样品中是否包含转基因水稻事件H23的DNA分子。



1. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子的序列为如下任意一种:
 - i) SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:6所示序列,或其互补序列;
 - ii) SEQ ID NO:5所示序列,或其互补序列。
2. 用于检测水稻转化事件H23的探针,其特征在于,所述探针为SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6所示序列或其互补序列。
3. 用于检测水稻转化事件H23的引物对,其特征在于,所述引物对为如下任意一种:
 - i) SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示序列的引物对,或SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8互补序列的引物对;
 - ii) SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10所示序列的引物对,或SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10互补序列的引物对;
 - iii) SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示序列的引物对,或SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10互补序列的引物对。
4. 用于检测水稻转化事件H23的试剂盒或微阵列,其特征在于,所述试剂盒或微阵列包含权利要求2所述的探针和/或权利要求3所述的引物对。
5. 检测水稻转化事件H23的方法,其特征在于,包括利用以下任一项来检测待测样品中是否存在所述水稻转化事件H23:
 - i) 权利要求2所述的探针;
 - ii) 权利要求3所述的引物对;
 - iii) 权利要求2所述的探针和权利要求3所述的引物对;
 - iv) 权利要求4所述的试剂盒或微阵列。
6. 对水稻进行育种的方法,其特征在于,所述方法为以下步骤:
 - 1) 获得含有权利要求1所述核酸分子的水稻;
 - 2) 将步骤1)所获得的水稻通过花粉培养、未受精胚培养、加倍培养、细胞培养、组织培养、自交或杂交或以上的组合得到水稻植物、种子、植物细胞、后代植物或植物部分;
 - 3) 对步骤2)所获得的后代植物进行除草剂和/或褐飞虱的抗性鉴定,并利用权利要求5所述的方法来检测其中是否存在所述转化事件H23。
7. 一种保护水稻植物免受由除草剂引起的损伤的方法,其特征在于,将含有有效剂量草铵膦除草剂施加到种植至少一种转基因水稻植物的大田中,所述转基因水稻植物的基因组中包含SEQ ID NO:5;所述转基因水稻植物具有对草铵膦除草剂的抗性。
8. 一种保护水稻植物免受由褐飞虱引起的损伤的方法,其特征在于,在有褐飞虱为害的地区种植至少一种转基因水稻植物,所述转基因水稻植物的基因组中包含SEQ ID NO:5;所述转基因水稻植物具有对褐飞虱的抗性。

一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域。具体的说,涉及一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法,特别是涉及一种抗褐飞虱和草铵膦除草剂施用的转基因水稻事件H23和用于检测生物样品中是否包含特定转基因水稻事件H23的核酸序列及其检测方法。

背景技术

[0002] 田间杂草与作物竞争水、肥、光及生长空间,直接影响农作物产量与质量。同时许多杂草又是作物病原菌及害虫的中间寄主,是作物增产的重要生物限制因子之一。据联合国粮食与农业组织统计,全球因杂草导致的粮食生产损失每年高达950亿美元,相当于损失了3.8亿吨小麦,约合2009年全球小麦产量的半数以上。在950亿美元的经济损失中,贫困的发展中国家承受了大约700亿美元(FAO.The lurking menace of weeds[J/OL].(<http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/>),2009-08-11.)。因此,有效地控制田间杂草是促进粮食增产的重要措施之一。在我国,危害水稻的杂草种类有40多种,其中危害较大的杂草有10多种。在一般年份杂草可使水稻减产10-20%,严重时更高达30-50%。另外,随着我国农村人口往城市迁移速度的加快,水稻种植的规模化和机械化是一个可预见的趋势,这使得传统的人工除草方式变得不现实。当前,市场上广泛应用的选择性除草剂施用量大,残留期长、容易影响下茬作物的正常生长。草铵膦等灭生性除草剂具有高效、低毒、易降解、无残留等特点。但它们除草没有选择性,不能直接用在作物的生长期。通过转基因技术培育耐该类灭生性除草剂的水稻可以克服这一难题。在水稻生长期喷施1-2次就能有效解决杂草问题,减少了除草剂的用量及投入成本。因此,耐除草剂转基因水稻具有非常广阔的应用价值和市场潜力。

[0003] 利用抗虫水稻品种本身的抗虫性是控制褐飞虱种群最经济、最有效的方法之一。选育和应用抗虫品种可减少投入、简单操作、不伤害天敌,对环境无污染,能与其他技术协调使用(刘光杰,沈君辉,寒川一成.中国水稻抗虫性的研究及其应用:回顾与展望[J].中国水稻科学,2003,(z1):1-6.)。由于分子克隆技术的发展,不少抗褐飞虱主效基因被成功克隆,这为研究抗性基因杀虫机理以及应用抗性基因培育抗虫品种提供了便利。利用转基因的方法相比传统育种的优势在于利用合适的调控元件控制抗性基因表达水平,从而达到更好的抗虫性效果。

[0004] 已知外源基因在植物体内的表达受到它们的染色体位置的影响,可能是由于染色质结构(如异染色质)或转录调节元件(如增强子)接近整合位点。为此,通常需要筛选大量的事件才有可能鉴定出可以商业化的事件(即导入的目标基因得到最优表达的事件)。例如,在植物和其他生物体中已经观察到导入基因的表达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根据导入的基因构建体中的转录调节元件所预期的表达模式不一致。因此,通常需要产生成百上千个不同的事件并从这些事件中筛选出具有以商业化为目的所预期的转基因表达量和表达模式的单一事件。具有预期的转基因表

达量和表达模式的事件可用于采用常规育种方法通过有性异型杂交将转基因渗入到其他遗传背景中。通过这种杂交方式产生的后代保持了原始转化事件的转基因表达特征。应用这种策略模式可以确保在许多品种中具有可靠的基因表达,而这些品种能很好地适应当地的生长条件。

[0005] 能够检测特定事件的存在以确定有性杂交的后代是否包含目的基因将是有益的。此外,检测特定事件的方法还将有助于遵守相关法规,例如来源于重组农作物的食物在投入市场前需要获得正式批准和进行标记。通过任何熟知的多核苷酸检测方法检测转基因的存在都是可能的,例如聚合酶链式反应(PCR)或利用多核苷酸探针的DNA杂交。这些检测方法通常集中于常用的遗传元件,例如启动子、终止子、标记基因等。因此,除非与插入的转基因DNA相邻的染色体DNA(“侧翼DNA”)的序列是已知的,上述这种方法就不能够用于区别不同的事件,特别是那些用相同的DNA构建体产生的事件。所以,目前常利用跨越了插入的转基因和侧翼DNA的接合部位的一对引物通过PCR来鉴定转基因特定事件,具体地说是包含侧翼序列的第一引物和包含插入序列的第二引物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法,转基因水稻事件H23对褐飞虱和草铵膦除草剂具有较好的抗性,且检测方法可以准确快速地鉴定生物样品中是否包含特定转基因水稻事件H23的DNA分子。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2所示序列,或其互补序列。

[0008] 进一步地,所述核酸序列包含SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:6所示序列,或其互补序列。

[0009] 更进一步地,所述核酸序列包含SEQ ID NO:5所示序列或其互补序列。

[0010] 另一方面,本发明提供了用于检测水稻转化事件的探针,其特征在于,包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示序列或其片段或其变体或其互补序列。

[0011] 本发明还提供了用于检测水稻转化事件的引物对,其特征在于,所述引物对包括特异性识别SEQ ID NO:5所示序列第1-620位核苷酸序列的一条引物和特异性识别SEQ ID NO:5所示序列第621-11510位核苷酸序列的一条引物;和/或特异性识别SEQ ID NO:5所示序列第621-11510位核苷酸序列的一条引物和特异性识别SEQ ID NO:5所示序列第11511-12149位核苷酸序列的一条引物。

[0012] 在一些实施方案中,所述引物对的扩增产物包含上述用作探针的序列。

[0013] 在一些实施方案中,上述引物对为SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9所示的序列或其互补序列;或者SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示的序列或其互补序列;或者SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所示的序列或其互补序列;或者SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15所示的序列或其互补序列。

[0014] 本发明还提供了用于检测水稻转化事件的试剂盒或微阵列,其特征在于,包含上述的探针和/或上述的引物对。

[0015] 本发明还提供了检测水稻转化事件的方法,其特征在于,包括利用上述的探针或

上述的引物对或上述的探针和引物对或上述的试剂盒或微阵列来检测待测样品中是否存在所述转化事件。

[0016] 本发明还提供了对水稻进行育种的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

[0017] 1) 获得包含上述核酸分子的水稻;

[0018] 2) 将步骤1)所获得的水稻通过花粉培养、未受精胚培养、加倍培养、细胞培养、组织培养、自交或杂交或以上的组合得到水稻植物、种子、植物细胞、后代植物或植物部分;以及任选地,

[0019] 3) 对步骤2)所获得的后代植物进行除草剂和/或褐飞虱的抗性鉴定,并利用上述的方法来检测其中是否存在所述转化事件。

[0020] 所述SEQ ID NO:1或其互补序列为转基因水稻事件H23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水稻插入位点的上游侧翼基因组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水稻事件H23的存在。所述SEQ ID NO:2或其互补序列为转基因水稻事件H23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序列和水稻插入位点的下游基因组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水稻事件H23的存在。

[0021] 本发明中,所述核酸序列可以为所述SEQ ID NO:3或其互补序列中转基因插入序列的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸(第一核酸序列)和所述SEQ ID NO:3或其互补序列中5'上游侧翼水稻基因组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或SEQ ID NO:3的扩增产物时,可以诊断转基因水稻事件H23或其后代的存在。

[0022] 所述SEQ ID NO:3或其互补序列为转基因水稻事件H23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908个核苷酸的序列,所述SEQ ID NO:3或其互补序列由1140个核苷酸的水稻上游侧翼基因组DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸1-620)、57个核苷酸的BU9-3301构建体DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸621-677)和231个核苷酸的耐草铵磷基因的第一表达盒的5'末端DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸678-908)组成,包含所述SEQ ID NO:3或其互补序列即可鉴定为转基因水稻事件H23的存在。

[0023] 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)和所述SEQ ID NO:4或其互补序列中3'下游侧翼水稻基因组DNA区域的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸(第四核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或互补于包含完整的所述SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的所述SEQ ID NO:6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扩增方法中包括DNA引物组。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或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的扩增产物时,可以诊断转基因水稻事件H23或其后代的存在。

[0024] 所述SEQ ID NO:4或其互补序列为转基因水稻事件H23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1219个核苷酸的序列,所述SEQ ID NO:4或其互补序列由530个核苷酸的不完整bar基因表达盒的3'末端DNA序列(SEQ ID NO:4的核苷酸1-530)、50个核苷酸的BU9-3301构建体右边界DNA序列(SEQ ID NO:4的核苷酸531-580)和639个核苷酸的水稻整合位点下游侧翼基因组DNA序列(SEQ ID NO:4的核苷酸581-1219)组成,包含所述SEQ ID NO:4或其互补序列即可鉴定为转基因水稻事件H23的存在。

[0025] 所述SEQ ID NO:5或其互补序列为表征转基因水稻事件H23的长度为12149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水稻事件H23的存在。

[0026] 表1SEQ ID NO:5包含的基因组及遗传元件

	遗传元件	SEQ ID NO: 5 上的位置 ¹	长度 ¹
	上游侧翼基因组序列	1-620	620
	间隔序列	621-677	57
	polyA	678-880	203
	间隔序列	881-885	5
	bar	886-1437	552
	间隔序列	1438-1481	44
	35S	1482-1907	426
	间隔序列	1908-1954	47
[0027]	ubiquitin	1955-3921	1967
	间隔序列	3922-3928	7
	BPH9	3929-7549	3621
	间隔序列	7550-7585	36
	nos	7586-7897	312
	间隔序列	7898-10880	2983
	bar	10881-11252	372
	间隔序列	11253-11257	5
	polyA	11258-11460	203
	间隔序列	11461-11510	50
	下游侧翼基因组序列	11511-12149	639

[0028] 1:单位bp。

[0029] 本领域技术人员熟知的,第一和第二核酸序列或第三和第四核酸序列不必仅仅由DNA组成,也可包括RNA、DNA和RNA的混合物,或者DNA、RNA或其它不作为一种或多种聚合酶模板的核苷酸或其类似物的组合。此外,本发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、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10中所述的核苷酸。当选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的核苷酸时,所述探针和引物可以为长度是至少大约21个到大约50个或更多的连续核苷酸。

[0030] 本发明还提供了一种保护水稻植物免受由除草剂引起的损伤的方法,其特征在于,包括将含有有效剂量草铵膦除草剂施加到种植至少一种转基因水稻植物的大田中,所述转基因水稻植物在其基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第678-7897位核酸序列和SEQ ID NO:2,或者所述转基因水稻植物的基因组中包含SEQ ID NO:5;所述转基因水稻植物具有对草铵膦除草剂的抗性。

[0031] 本发明还提供了一种保护水稻植物免受由褐飞虱引起的损伤的方法,其特征在于,包括在有褐飞虱为害的地区种植至少一种转基因水稻植物,所述转基因水稻植物在其基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第678-7897位核酸序列和SEQ ID NO:2,或者所述转基因水稻植物的基因组中包含SEQ ID NO:5;所述转基因水稻植物具有对褐飞虱的抗性。

[0032] 本发明还提供了一种提高水稻对褐飞虱和草铵膦除草剂抗性的方法,其特征在于,包括将以下表达盒导入水稻的基因组中:

[0033] 表达耐草铵膦基因的第一表达盒,如SEQ ID NO:5的第678-1907位核苷酸所示序列;

[0034] 表达抗褐飞虱基因的第二表达盒,如SEQ ID NO:5的第1955-7897位核苷酸所示序列。

[0035] 本发明用于检测水稻植物的核酸序列及其检测方法中,以下定义和方法可以更好地定义本发明和指导本领域的普通技术人员实施本发明,除非另作说明,根据本领域普通技术人员的常规的用法来理解术语。

[0036] 所述“水稻”是指水稻(*Oryza sativa*),包括所有可与水稻繁殖的植物品种,包括野生稻种以及那些属于稻属的允许物种间繁殖的植物。

[0037] 所述“包含”是指“包括但不限于”。

[0038] 术语“植物”包括整株植物、植物细胞、植物器官、植物原生质体、植物可以从再生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。

[0039] 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”。

[0040] “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,“侧翼序列”或“侧翼基因组序列”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。当该侧翼区位于上游时,其也可以称为“上游基因组侧翼”或“5'侧翼”或“5'基因组侧翼区”或“基因组5'侧翼序列”等。当该侧翼区位于下游时,其也可以称为“下游基因组侧翼”或“3'侧翼”或“3'基因组侧翼区”或“基因组3'侧翼序列”等。

[0041] 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事件,所述不同侧翼区是每个转化事件所特异性含有的。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。转化事件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。

[0042] 本发明提供了称为H23的转基因水稻事件及其后代,所述转基因水稻事件H23即为水稻植物H23,其包括转基因水稻事件H23的植物和种子及其植物细胞或其可再生部分,所述转基因水稻事件H23的植物部分,包括但不限于细胞、花粉、胚珠、花、芽、根、茎、穗、花序、叶和来自水稻植物H23的产物,例如稻米、稻草、稻壳或稻种和留在水稻作物田间的生物量。

[0043] 本发明转基因水稻事件H23包含了一个DNA构建体,当其在植物细胞内表达时,所述转基因水稻事件H23获得对褐飞虱和/或草铵膦除草剂的抗性。所述DNA构建体包含一个表达盒,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水稻BPH9蛋白的基因BPH9,所述BPH9蛋白的核酸序列对褐飞虱具有抗性。所述DNA构建体包含另一个表达盒,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膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)的基因bar,所述PAT蛋白的核酸序列对草铵膦除草剂具有抗性。进一步地,所述启动子可以为从植物分离的适合启动子,包括组成型、诱导型和/或组织特异性启动子,所述适合启动子包括但不限于,花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S启动子、玄参花叶病毒(FMV) 35S启动子、泛素蛋白(Ubiquitin)启动子、肌动蛋白(Actin)启动子、土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶(NOS)启动子、章鱼碱合成酶(OCS)启动子、夜香树属(*Cestrum*) 黄叶卷曲病毒启动子、马铃薯块茎储藏蛋白(Patatin)启动子、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCO)启动子、谷胱甘肽硫转移酶(GST)启动子、E9启动子、GOS启动子、alcA/alcR启动子、毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) RolD启动子和拟南芥属(*Arabidopsis thaliana*) Suc2启动子。所述多聚腺苷酸化信号序列可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列,所述适合多聚腺苷酸化信号序列包括但不限于,来源于土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶(NOS)基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S终止子、来源于蛋白酶抑制剂II(PINII)基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白(α -tubulin)基因的多聚腺苷酸化信号序列。

[0044] 此外,所述表达盒还可以包括其他的遗传元件,所述遗传元件包括但不限于,增强子和信号肽/转运肽。所述增强子可以增强基因的表达水平,所述增强子包括但不限于,烟草蚀刻病毒(TEV)翻译激活因子、CaMV35S增强子和FMV35S增强子。所述信号肽/转运肽可以引导EPSPS蛋白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。

[0045] 所述“草铵膦”是指能够抑制植物氮代谢途径中的谷氨酰胺合成酶的膦酸类除草剂,用“草铵膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草铵膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂处理包含了来源于转基因水稻事件H23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水稻事件H23的植物材料的

生长或产量。

[0046] 所述DNA构建体采用转化方法被引入到植物中,所述转化方法包括但不限于,农杆菌(*Agrobacterium*)介导转化法、基因枪转化法和花粉管通道转化法。

[0047] 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。

[0048] 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)。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] DNA构建体是DNA分子互相连接起来的组合,该组合提供了一个或多个表达盒。DNA构建体优选地是能够在细菌细胞内自我复制,而且含有不同的限制性内切酶位点的质粒,所含的限制性内切酶位点用于导入提供功能性基因元件,即启动子、内含子、前导序列、编码序列、3'终止子区域和其他序列的DNA分子。DNA构建体中所含有的表达盒包括提供信使RNA的转录所必需的基因元件,所述表达盒可以设计为在原核细胞或真核细胞中表达。本发明的表达盒被设计为最优选地在植物细胞内表达。

[0052] 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的原始转化事件和该转化事件的后代。术语“事件”还指转化事件和含有异源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,来自于转化事件亲本的插入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”还指来自原始转化事件的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(例如原始转化事件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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 培养对褐飞虱和草铵膦除草剂具有抗性的转基因水稻事件H23, 通过以下步骤: 首先使第一亲本水稻植物与第二亲本水稻植物有性杂交, 从而产生了多样的第一代子代植株, 所述第一亲本水稻植物由培育自转基因水稻事件H23及其后代的水稻植物组成, 该转基因水稻事件H23及其后代是通过利用本发明的对褐飞虱和草铵膦除草剂具有抗性的表达盒进行转化而得到的, 第二亲本水稻植物缺乏对褐飞虱或草铵膦除草剂具有抗性; 然后选择对草铵膦除草剂具有抗性的子代植株, 可以培育出对草铵膦除草剂具有抗性的水稻植物。这些步骤可以进一步包括使褐飞虱和草铵膦抗性的子代植株与第二亲本水稻植物或第三亲本水稻植物进行回交, 然后通过用草铵膦除草剂施加或通过性状相关的分子标记物(如包含转基因水稻事件H23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, 从而产生对褐飞虱和草铵膦除草剂具有抗性的水稻植物。

[0057] 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。

[0058] 术语“探针”是一段分离的核酸分子, 其上面结合有常规的可检测标记或报告分子, 例如, 放射性同位素、配体、化学发光剂或酶类。这种探针与目标核酸的一条链是互补的, 在本发明中, 探针与来自转基因水稻事件H23基因组的一条DNA链互补, 不论该基因组DNA是来自转基因水稻事件H23或种子还是来源于转基因水稻事件H23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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 如本文所用, “试剂盒”或“微阵列”是指用于生物样品中水稻转化事件的鉴定和/或检测目的的试剂组或芯片。为质量控制(例如种子批次的纯度)、植物材料中或包含植物材料或来源于植物材料材料例如但不限于食品或饲料产品中事件的检测的目的, 可以使用试剂盒或芯片, 并且其组分可以具体地调整。

[0062] 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水稻事件H23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水稻基因组侧翼区域, 所述DNA分子的

片段可以用作引物或探针。

[0063] 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水稻事件H23的DNA的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。如本发明使用的,如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构,就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性,则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。如本发明使用的,当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地,如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合,则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的,只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针,仅需保证其在序列上具有充分的互补性,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

[0064] 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。优选地,本发明的一个核酸分子可以在中度严格条件下,例如在约 $2.0 \times$ 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和SEQ ID NO:6中一个或多个核酸分子或其互补序列,或者上述序列的任一片段发生特异性杂交。更优选地,本发明的一个核酸分子在高度严格条件下与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6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:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或其互补序列,或者上述序列的任一片段。

[0065] 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:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6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:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 如本发明使用的,“经过扩增的DNA”或“扩增子”是指作为核酸模板一部分的目标核酸序列的核酸扩增产物。例如,为了确定水稻植物是否由含有本发明转基因水稻事件H23通过有性杂交方式产生,或采集自田地的水稻样品是否包含转基因水稻事件H23,或水稻提取物,例如粗粉、粉或油是否包含转基因水稻事件H23,从水稻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水稻事件H23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水稻事件H23也是诊断性的。

[0069] 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。

[0070] 可选的,引物对可以来源于插入DNA两侧的侧翼基因组序列,以产生包括整个插入核苷酸序列的扩增子。来源于植物基因组序列的引物对中的一个可以位于距插入DNA序列一定距离处,该距离的范围可以为一个核苷酸碱基对到约两万个核苷酸碱基对。术语“扩增子”的使用特别排除了在DNA热扩增反应中形成的引物二聚体。

[0071] 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序列和来自转基因水稻事件H23的侧翼DNA序列可以通过利用所提供的引物序列对转基因水稻事件H23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。

[0072] 基于DNA扩增方法的DNA检测试剂盒含有DNA引物分子,它们在适当的反应条件下特异性杂交到目标DNA上并扩增诊断性扩增子。试剂盒可提供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的水稻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:7和SEQ ID NO:8,其扩增与转基因水稻事件H23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。鉴别在DNA扩增方法中有用的引物对还包括SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10以及SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10,其扩增与转基因水稻事件H23的3'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:2。用作DNA引物的其它DNA分子可选自SEQ ID NO:5。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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(Chen X, Levine L, and Kwok P Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis [J]. Genome Res, 1999, 9(5): 492-8.)。使用这种方法需要设计一个跨越插入DNA序列和相邻的基因组DNA结合部位的寡核苷酸链。将该寡核苷酸链和目标区域的单链PCR产物(在插入序列内和相邻的侧翼基因组序列中各使用一个引物)进行杂交,然后和DNA聚合酶以及一种荧光标记的ddNTP一起进行温育。单碱基延伸会导致插入ddNTP。这种插入可以利用荧光仪测量其偏振的改变。偏振的改变代表了插入/侧翼序列的存在,其说明扩增、杂交和单碱基延伸反应是成功的。

[0076] 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。

[0077] 基于杂交原理,用于检测来源于转基因水稻事件H23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。

[0078] 也可应用分子标记对序列进行检测(Tyagi S and Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(3): 303-8.)。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。

[0079] 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。

[0080] 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

测试试剂盒。所述试剂盒有利于鉴定样品中是否存在转基因水稻事件H23的DNA,还可以用于培育含有转基因水稻事件H23的DNA的水稻植物。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、5或6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。在水稻基因组中含有的以及在表1中说明的转基因插入序列与水稻基因组结合部位的DNA结构包含:位于转基因插入序列5'末端的水稻H23上游侧翼基因组区域,来自转化载体的一部分插入序列(间隔序列),第一个表达盒由花椰菜花叶病毒的35S启动子(CaMV 35S promoter),可操作地连接到草丁膦(草铵膦)抗性基因序列(bar)上,并可操作地连接到花椰菜花叶病毒的终止子(PolyA)上而组成;第二个表达盒由玉米泛素基因启动子(ubiquitin promoter),可操作地连接到水稻BPH9基因上,并可操作地连接到胭脂碱合成酶基因终止子(nos terminator)上而组成;不完整的草丁膦(草铵膦)抗性基因序列(bar),并可操作地连接到花椰菜花叶病毒的终止子(PolyA)上,以及位于转基因插入序列3'末端的水稻植物H23右侧翼基因组区域(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水稻事件H23中转基因插入序列的任何部分,也可以是来源于转基因水稻事件H23中侧翼水稻基因组的DNA区域的任何部分。

[0081] 转基因水稻事件H23可以与其他转基因水稻品种组合,例如除草剂(如草甘膦、麦草畏等)抗性的水稻,或携带抗虫基因的转基因水稻品种。所有这些不同转基因事件的各种组合,与本发明的转基因水稻事件H23一起育种,可以提供抗抗虫并抗多种除草剂的改良杂种转基因水稻品种。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。

[0082] 本发明提供了一种用于检测水稻植物的核酸序列及其检测方法,转基因水稻事件H23具有抗含草铵膦的农业除草剂或抗褐飞虱的生长条件的作用。该性状的水稻植株表达BPH9和膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)蛋白,其赋予植物对褐飞虱和草铵膦的抗性。同时本发明检测方法中SEQ ID NO:1或其互补序列、SEQ ID NO:2或其互补序列、SEQ ID NO:3或其互补序列、SEQ ID NO:4或其互补序列、SEQ ID NO:6或其互补序列可以作为DNA引物或探针以产生诊断为转基因水稻事件H23或其后代的扩增产物,且可以快速、准确、稳定的鉴定出来源于转基因水稻事件H23的植物材料的存在。

[0083] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0084] 图1重组表达载体BU9-3301的物理图谱。各元件英文及缩写含义列举如下:

- | | | |
|--------|------------------|-----------------------|
| [0085] | LB | 农杆菌C58的T-DNA左边界序列。 |
| [0086] | PolyA | 花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S终止子。 |
| [0087] | bar | 编码PAT蛋白,解除草铵膦毒性。 |
| [0088] | 35S | 花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子。 |
| [0089] | ubiquitin | 玉米泛素基因的启动子。 |
| [0090] | BPH9 | 编码LRR类蛋白,具有褐飞虱抗性。 |
| [0091] | nos | 胭脂碱合成酶基因的终止子。 |
| [0092] | T-Border (right) | 农杆菌C58的T-DNA右边界序列。 |

- [0093] PVS1 sta pVS1质粒的质粒稳定位点。
- [0094] PVS1 rep pVS1质粒的复制起始位点。
- [0095] PBR322 bom pBR322质粒的bom位点。
- [0096] PBR322 ori pBR322质粒的复制起始位点。
- [0097] kanamycin (R) 编码氨基糖苷磷酸转移酶蛋白,赋予细菌卡那霉素抗性。
- [0098] 图2 H23外源基因插入拷贝数的Southern印记杂交图,杂交出的外源条带用箭头标注。
- [0099] A: bar探针;泳道1-12分别表示不同的DNA样品。M: DNA Marker III, DIG-labeled (Roche), 大小标注在左侧,单位bp; 1: EcoRI酶切的H23 T₂代单株1基因组DNA; 2: EcoRI酶切的H23 T₂代单株2基因组DNA; 3: EcoRI酶切的BU9-3301质粒; 4: EcoRI酶切的受体对照63-4S基因组DNA; 5: EcoRI酶切的H23 T₃代单株1基因组DNA; 6: EcoRI酶切的H23 T₃代单株2基因组DNA; 7: XbaI酶切的H23 T₂代单株1基因组DNA; 8: XbaI酶切的H23 T₂代单株2基因组DNA; 9: XbaI酶切的BU9-3301质粒; 10: XbaI酶切的受体对照63-4S基因组DNA; 11: XbaI酶切的H23 T₃代单株1基因组DNA; 12: XbaI酶切的H23 T₃代单株2基因组DNA。
- [0100] B: BPH9探针;泳道1-10分别表示不同的DNA样品。M: DNA Marker III, DIG-labeled (Roche), 大小标注在左侧,单位bp; 1: SacI酶切的BU9-3301质粒; 2: SacI酶切的H23 T₂代基因组DNA; 3: SacI酶切的H23 T₃代基因组DNA; 4: SacI酶切的受体对照63-4S基因组DNA; 5: SacI酶切的转化事件分离出的阴性植株基因组DNA; 6: XbaI酶切的H23 T₂代基因组DNA; 7: XbaI酶切的H23 T₃代基因组DNA; 8: XbaI酶切的BU9-3301质粒; 9: XbaI酶切的受体对照63-4S基因组DNA; 10: XbaI酶切的转化事件分离出的阴性植株基因组DNA。图3 T₃代H23成株期褐飞虱抗性表现。RH为阳性对照,63-4S为转化受体,TN1为阴性感虫对照。
- [0101] 图4草铵膦喷施4周后转化事件和受体对照的田间表现。A: 63-4S喷施清水; B: 63-4S喷施1倍田间推荐剂量中量的草铵膦; C: H23喷施清水; D: H23喷施1倍田间推荐剂量中量的草铵膦; E: H23喷施2倍田间推荐剂量中量的草铵膦; F: H23喷施4倍田间推荐剂量中量的草铵膦。
- [0102] 图5转化事件特异性PCR验证结果。A: 上游特异性扩增结果(扩增引物为SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8); B: 下游特异性扩增结果(扩增引物为SEQ ID NO.8和SEQ ID NO.10); M: 分子量标准,从上到下依次为2kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp,扩增产物大小标注在右侧; T₂、T₃: T₂和T₃代转化事件基因组DNA; N: 受体对照63-4S。
- [0103] 图6转化事件H23特异性PCR检测的特异性和灵敏度。M: 分子量标准,从上到下依次为2kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp; CK: 63-4S基因组DNA为模板; P: 转化质粒; 1: 同批次其它转化事件植株基因组DNA为模板; 2: 转化事件T₄代植株基因组DNA为模板(DNA模板浓度为76.8ng/u1); 3: 转化事件T₄代植株基因组DNA为模板(DNA模板浓度为7.68ng/u1); 4: 转化事件T₄代植株基因组DNA为模板(DNA模板浓度为0.768ng/u1); 5: 转化事件T₄代植株基因组DNA为模板(DNA模板浓度为0.0768ng/u1); 6: 转化事件T₄代植株基因组DNA为模板(DNA模板浓度为0.00768ng/u1);

具体实施方式

[0104] 本申请涉及的转化事件H23是指以水稻广占63-4S(简称63-4S)为受体经过遗传转

化后得到在特定基因组序列之间插入外源基因插入物(T-DNA插入物)的水稻植株。在具体实施例中,转基因所用表达载体具有图1所示的物理图谱,所得到的T-DNA插入物具有SEQ ID NO:5的第678-7897位核苷酸所示序列。转化事件H23可以指这一转基因过程,也可以指由这一过程所得到的基因组内的T-DNA插入物,或T-DNA插入物与侧翼序列的组合,或可以指由这一转基因过程得到的水稻植株。在具体实例中,该事件也适用于同样的表达载体转化其他受体品种,从而将T-DNA插入物插入到同样基因组位置而获得的植物。转化事件H23还可以指由上述植物进行无性繁殖、有性繁殖、减倍或加倍繁殖或以上的组合而得到的后代植物。

[0105] 实施例1转化载体的构建和水稻遗传转化

[0106] 所用的植物表达载体为BU9-3301,全长14143bp,T-DNA区包括左右边界序列大小为8050bp。它的骨架是植物基因工程中常用的载体pcambia3301,通过连接ubiquitin-BPH9-nos表达盒构建而成。载体物理图谱见图1。

[0107] 转化水稻所用的方法是农杆菌介导法,其操作程序如下:

[0108] (1) 将载体质粒转入农杆菌EHA105

[0109] ①待转化的质粒预先置于冰上,电击杯用75%乙醇清洗2次,再用蒸馏水冲洗干净后,在超净台上晾干。

[0110] ②吸取2 μ L质粒,迅速加入农杆菌EHA105的感受态细胞,用枪头在离心管中吹打混匀后,贴着杯壁加入到杯中。

[0111] ③将电击杯放进电极转化仪中,在1800V电压下电击5.5毫秒,此时质粒载体已转化到了农杆菌细胞之中。

[0112] ④向电击杯中加入500 μ L LB液体培养基,混匀后吸入1.5mL灭菌离心管中,在28 $^{\circ}$ C、150rpm摇床上培养半小时,取200 μ L涂布于LB固体培养基上(含100 μ g/mL卡那霉素),28 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0113] ⑤挑取白色单菌落,接种于5mL LB液体培养基中(含100 μ g/mL卡那霉素),在28 $^{\circ}$ C,200rpm摇床上培养过夜。

[0114] ⑥分装菌液至5个1.5mL离心管,加入等体积100%甘油,于-80 $^{\circ}$ C长期保存。

[0115] (2) 愈伤组织的诱导

[0116] ①用砵谷机打去种子的内外颖,挑选成熟饱满、胚完整的种子装入50mL离心管。

[0117] ②用蒸馏水清洗3次,浸于70%乙醇2min后,再用蒸馏水清洗3次,最后于0.15% HgCl₂中以100rpm的转速在摇床上振荡15-20min。

[0118] 以下操作在无菌台上进行:

[0119] ③弃去HgCl₂,用无菌水清洗种子5次后,把种子倒在灭菌的滤纸上吸干,中间换2次滤纸,放置约1h。

[0120] ④将种子用镊子夹入N6D培养基(10-12粒/皿)摆好,置于28 $^{\circ}$ C暗培养箱中培养4周左右。

[0121] (3) 继代

[0122] 选择淡黄色、致密且相对干燥的胚性愈伤,转入新的N6D培养基上,28 $^{\circ}$ C继续暗培养15天左右。

[0123] (4) 农杆菌的培养和悬浮

[0124] ①将从-80℃拿出的农杆菌菌种室温下融化后,于37℃摇床150rpm培养30min后,取1mL涂布于LB固体培养基上(含100μg/mL卡那霉素),28℃下暗培养24h至农杆菌长满平板。

[0125] ②向50mL离心管加入30mL 1/2N6AS液体培养基,用药匙轻轻刮取平板上的农杆菌,用勺背将菌块贴在管壁充分拍散,直到农杆菌悬液的OD600达到0.8-1.0。

[0126] (5) 感染和共培养

[0127] ①感染:先将愈伤收集至一个平皿中,用药匙舀入含菌的1/2N6AS中,轻轻混匀,放置20min。

[0128] ②共培养:倒出菌液,把愈伤铺放在无菌滤纸上,放置2h,中间换3次滤纸,保证菌液被吸干,转至1/2N6AS铺有滤纸的固体培养基上,20℃,暗培养1.5d。

[0129] (6) 除菌

[0130] ①将共培养的愈伤收集至250mL试剂瓶中,用适量无菌水于150rpm转速摇洗3次以上,至液体比较清亮。

[0131] ②倒出无菌水,加入N6液体培养基(含500mg/L头孢霉素),于150rpm转速振摇15-20min,重复3次。

[0132] ③将愈伤倒在无菌滤纸上,放置2h,中间换3次滤纸,直至愈伤组织充分干燥。

[0133] (7) 愈伤组织的筛选

[0134] ①将干燥的愈伤转至N6D固体培养基(含25mg/L的basta及250mg/L的头孢霉素),28℃暗培养箱培养7-10d。

[0135] ②将没有农杆菌残留的愈伤转入新的N6D固体培养基上(25mg/L的basta,250mg/L的头孢霉素),28℃暗培养箱培养15-20d。

[0136] ③将愈伤转入新的N6D固体培养基上(仅含50mg/Lbasta),28℃暗培养15-20d。

[0137] (8) 分化与移栽

[0138] ①将经筛选存活下来的愈伤组织转至MS培养基上,28℃暗培养箱中预分化12-15d。

[0139] ②选择生长优良的淡黄色愈伤,转至MS培养基上,光培养15-20d后可更换一次培养基。

[0140] ③待愈伤组织长出2cm左右绿芽时,从周围愈伤组织中分离出来,剪去根,移入装有1/2MS生根培养基的试管中,28℃光培养。

[0141] (9) 炼苗及移植

[0142] 当绿苗长至三叶期时,打开试管口使幼苗与外界接触。1-2天后用自来水冲洗掉幼苗根部的固体培养基,将幼苗浸泡于自来水中炼苗。2天后将幼苗移植到土壤中。

[0143] 实施例2转化事件的筛选

[0144] (1) 对转化获得的转化苗进行bar和BPH9基因分子检测。根据基因序列设计PCR引物对,引物序列分别为5'-CGCCAACCAGACCACATC-3'和5'-AATCCTGGGATGGCTCTAGC-3'以及5'-CCCTCAGCTCCTTCATCT-3'和5'-TTAGCCCTGCCTCATA-3'。取转化苗叶片提取基因组DNA,按照以下PCR参数进行扩增:

[0145] 反应体系:

	DNA (20 ng/ μ L)	2 μ L
	Forward primer (5 μ M)	1 μ L
	Reverse primer (5 μ M)	1 μ L
[0146]	2 \times PCR mixture	7.5 μ L
	ddH ₂ O	3.5 μ L
	Total	15 μ L

[0147] 反应程序:

	94°C	5 min	
	94°C	30 sec	} 34 个循环
[0148]	58°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
	72°C	5 min	
	25°C	1 min	

[0149] 根据bar基因预期扩增片段大小277bp和BPH9基因预期扩增片段大小228bp筛选阳性转化苗。

[0150] (2) 将阳性植株收获T₁种子。对T₁植株进行草铵膦除草剂鉴定,选取抗性优良的转化事件编号191004~191012,继续收获T₂种子。

[0151] (3) 对T₂植株进一步考察苗期抗褐飞虱性状,具体方法为,在面包盒中播种待鉴定材料中间穿插播种几行对照材料,待水稻材料长到两叶一心期时按每株接入7~8头2~3龄的褐飞虱若虫,当感虫对照材料有90%以上的死亡时,按照设定的1~9级的分级标准给每个植株评分,取每个株系最后的平均值即为待鉴定材料的抗性级别。将感虫的转化事件淘汰,只保留中抗以上水平的转化事件191005-191007。

[0152] 表2水稻转化事件褐飞虱抗性鉴定结果

	编号	抗性均值	判定的抗性等级	抗性水平
	191004	7.9 \pm 0.5	7	感虫
	191005	5.6 \pm 0.4	5	中抗
	191006	5.0 \pm 0.3	5	中抗
	191007	5.2 \pm 1.1	5	中抗
[0153]	191008	7.2 \pm 0.4	7	感虫
	191009	9.0 \pm 0.0	9	高感
	191010	8.2 \pm 0.5	9	高感
	191011	7.9 \pm 1.0	9	高感
	阳性对照	0.0 \pm 0.0	0	免疫
	阴性对照	8.7 \pm 0.1	9	高感

[0154] 进一步鉴定抗性优异的转化事件外源基因BPH9的拷贝数和表达量,选择单拷贝且表达量高的转化事件。初步筛选鉴定的结果显示191006为BPH9基因单拷贝插入,且分蘖期

叶片中的蛋白表达量达到 $1.23 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ 鲜重。同时,191006的抗性均值也是最高的。其他的转化事件由于插入拷贝数较多、表达量较低,抗性水平比191006低。

[0155] 因此,选择编号191006的材料命名为H23进行深入的性状鉴定。

[0156] 实施例4转化事件H23的拷贝数检测

[0157] 采用Southern印记杂交的方法确定外源基因插入的拷贝数。Southern杂交选取XbaI和EcoRI/SacI酶消化阳性对照质粒、受体对照63-4S以及T₂、T₃代H23基因组DNA,并选择T-DNA上的外源基因的部分片段作为探针进行Southern杂交。其中bar基因探针用5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'和5'-CCAGAAACCCACGTCATGCCA-3'引物对扩增制备,BPH9基因探针用5'-TGCTCTTTACGCTTTCCACTT-3'和5'-GGCTTCCTGTTCCGTTGCT-3'引物对扩增制备。

[0158] bar基因的插入拷贝数杂交检测选取EcoRI和XbaI两种限制性内切酶分别酶切H23不同世代和受体对照63-4S基因组DNA以及阳性对照质粒DNA。杂交结果见图2A所示。

[0159] EcoRI在T-DNA区的酶切位点只有1个,位于bar基因探针的右侧。此外,EcoRI在载体骨架上有一个酶切位点。受体对照63-4S用EcoRI酶切标记后没有条带(泳道4);阳性对照BU9-3301质粒用EcoRI酶切标记出5.1kb的条带(泳道3),符合预期。经过酶切的H23基因组DNA与特异性探针杂交后获得的标记条带应该包括2.7kb的T-DNA序列及其上游基因组上大小未知的序列,片段长度应该大于2.7kb。实验中标记出2条杂交条带,大小约为4.3kb和10.0kb(泳道1、2、5、6)。

[0160] XbaI在T-DNA区有4个酶切位点,均位于bar基因探针的右侧,在载体骨架上没有酶切位点。受体对照63-4S用XbaI酶切标记后没有看到条带(泳道10);阳性对照BU9-3301质粒用XbaI酶切标记出12.5kb的条带(泳道9),符合预期。经过酶切的H23基因组DNA与特异性探针杂交后获得的标记条带应该包括1.4kb的T-DNA序列及其上游基因组上大小未知的序列,片段长度应该大于1.4kb。实验中标记出两条杂交条带,大小约为9.4kb和12.0kb(泳道7、8、11、12)。

[0161] BPH9基因的插入拷贝数杂交检测选取SacI和XbaI两种限制性内切酶分别酶切H23不同世代和受体对照63-4S基因组DNA以及阳性对照质粒DNA。杂交结果见图2B所示。

[0162] SacI在T-DNA区的酶切位点只有1个,位于BPH9基因探针的下游。阳性对照BU9-3301质粒用SacI酶切标记出14.1kb的条带(泳道1),符合预期。BPH9基因在水稻中有同源片段,受体对照63-4S和转化事件分离出的阴性材料用SacI酶切可标记出7.0kb和9.4kb两条条带(泳道4、5)。经过酶切的H23基因组DNA与特异性探针杂交后获得的标记条带应该包括6.0kb的T-DNA序列及其上游基因组上大小未知的序列,整个片段长度大于6.0kb,实验中标记出三条杂交条带,大小约为7.0kb、9.4kb和10.0kb(泳道2、3),外源条带大小为10.0kb。

[0163] XbaI在T-DNA区有4个酶切位点,均位于BPH9基因探针的上游。阳性对照BU9-3301质粒用XbaI酶切标记出12.5kb的条带(泳道8),符合预期。BPH9基因在水稻中有同源片段,受体对照63-4S和转化事件分离出的阴性材料用XbaI酶切可标记出2.1kb、8.0kb和12.6kb三条带(泳道9、10)。经过酶切的H23转化事件基因组DNA与特异性探针杂交后获得的标记条带应该包括6.1kb的T-DNA序列及其右侧基因组上大小未知的序列,整个片段长度大于6.1kb,实验中标记出四条杂交条带,大小约为2.1kb、8.0kb、12.6kb和13.0kb(泳道6、7),外源条带大小约为13.0kb。

[0164] 以上实验结果表明,H23的T-DNA区含有单拷贝的BPH9基因和两个拷贝的bar基因

片段。不同世代间外源插入片段可通过有性生殖稳定遗传。

[0165] 实施例5转化事件H23对褐飞虱的抗性

[0166] 本实验通过在网室内考察水稻植株苗期和成株期对靶标害虫褐飞虱的抗感反应以及褐飞虱生长发育情况的影响,以此综合评价转化事件对褐飞虱的抗性效率。

[0167] 苗期采用国际标准苗期集团筛选法(SSST法)检测水稻苗期对褐飞虱的抗性。当感虫品种TN1受害达7级时开始查苗并记录各水稻品种的受害级别;之后每日1次,直至TN1全部达9级。以感虫对照达9级时各材料的受害等级作为其抗性等级。若相邻两次分级相差2个等级,则取二者的均值。

[0168] 成株期采用笼罩法检测水稻成株期对褐飞虱的抗性。计算TN1全部达到9级时各水稻品种的综合抗性等级,并依据表4标准判定水稻的抗性等级和抗性水平。采用单因素方差分析和多重比较法比较各水稻品种上褐飞虱虫量、接虫后水稻受害达到9级的天数,分析转基因水稻与受体对照及抗、感对照间的异同。

[0169] 表3水稻对褐飞虱抗性级别的评价标准

抗性级别	稻 苗 受 害 状 况
0	未受害
1	受害极轻微
[0170] 3	大部分植株第一、二片叶部分黄化
5	明显黄化,近半数植株萎蔫或枯死
7	半数以上植株枯死,其余严重矮化
9	全部植株枯死

[0171] 表4水稻对飞虱抗性(或受害)等级和抗性水平的判别标准

平均抗性级别或受害级别	判定的抗性等级或受害等级	抗性水平
0	0	免疫
0.1~1.9	1	高抗
[0173] 2.0~3.9	3	抗
4.0~5.9	5	中抗
6.0~7.9	7	感虫
8.0~9.0	9	高感

[0174] 苗期抗性

[0175] 苗期抗性结果如表5所示,感虫对照TN1达到9级时,转基因水稻H23的抗性等级为5级(中抗),高于受体对照63-4S的7级(感虫),低于抗虫对照RH的1级(高抗)。

[0176] 表5H23苗期对褐飞虱的抗性水平

	世代	材料	平均抗性级别	判定的抗性级别	抗性等级
[0177]	T ₃	H23	5.3±0.4 b	5	中抗
		63-4S	6.1±0.6 b	7	感虫
		TN1	9.0±0.9 a	9	高感
		RH	1.7±0.2 c	1	高抗
	T ₄	H23	4.2±0.2 b	5	中抗
		63-4S	8.1±0.1 b	7	感虫
		TN1	8.7±0.1 a	9	高感
		RH	1.2±0.3 c	1	高抗

[0178] 数值来源于4次重复的平均值±标准差表示。统计分析使用Duncan进行多重比较($\alpha=0.05$),同列数据差异显著性用小写字母表示。

[0179] 成株期抗性

[0180] 在感虫对照TN1达到9级时,H23的抗性等级为5级(中抗),高于受体对照63-4S的7级或9级(感虫或高感),低于抗虫对照RH的0级或3级(免疫或抗)(表6)。

[0181] 接虫后水稻受害级别达到9级的时间,转基因水稻H23为34.8~35.5天,较受体对照63-4S推迟4.3~5.4天,且二者间有显著差异($p<0.05$);抗虫对照RH的受害等级至接虫后36~39天仍未达到9级(表6)。

[0182] 接虫后22天(即TN1受害达到5-7级时)开始调查繁殖的褐飞虱数量,转基因水稻H23显著低于受体对照63-4S与感虫对照TN1,而与RH无显著差异;随着接虫时间延长,4个材料上的褐飞虱数量呈现逐步降低的趋势。在接虫后22天至26天,H23植株上的褐飞虱数量均显著低于受体对照63-4S,在接虫27天后二者无显著差异(表7)。

[0183] T₃代H23成株期抗虫表现见图3。

[0184] 表6 H23成株期对褐飞虱抗性水平

	世代	材料	平均抗性级别	判定的抗性级别	抗性等级	植株到达9级的天数
[0185]	T ₂	H23	5.0±0.3 b	5	中抗	NA
		63-4S	7.2±0.4 a	7	感虫	NA
		TN1	8.7±0.1 a	9	高感	NA
		RH	0.0 c	0	免疫	NA
	T ₃	H23	5.6±1.0 b	5	中抗	35.5±1.2 a
		63-4S	8.3±0.7 c	9	高感	30.1±1.4 b
		TN1	9.0±0.0 c	9	高感	27.5±2.3 b
		RH	3.6±0.5 a	3	抗	>39
T ₄	TH23	5.7±1.0 b	5	中抗	34.8±0.8 a	
	63-4S	8.3±1.0 a	9	高感	30.5±0.6 b	
	TN1	9.0±0.0 a	9	高感	27.7±2.6 c	
	RH	3.5±0.9 c	3	抗	>36	

[0186] 数值以8~10株水稻的平均值±标准差表示,不同材料间数据差异显著性分析使用Duncan进行多重比较($\alpha=0.05$)。NA表示未检测。

[0187] 表7成株期感虫对照TN1达到5级至9级期间褐飞虱在不同材料上的繁殖数量

世代	材料	接虫后不同时期的虫数 (头)							
		22 d	23 d	24 d	25 d	26 d	27 d	28 d	
[0188]	H23	82.8±15.5 b	64.8±19.6 b	56.0±23.1 b	42.9±22.6 b	35.7±16.3 b	30.3±16.4 a	24.1±11.7 a	
	63-4S	197.0±12.7 a	158.8±12.0 a	127.2±19.1 a	77.3±11.8 a	59.0±4.2 a	36.7±5.7 a	19.3±5.7 a	
	T ₃	TN1	144.6±33.4 a	117.8±22.6 a	45.9±33.5 b	48.1±7.2 b	38.6±7.3 b	31.2±4.2 a	17.9±4.9 a
	RH	58.3±23.8 b	29.3±4.9 c	20.5±7.0 b	12.8±2.2 c	4.0±3.8 c	3.3±1.0 b	1.3±1.5 b	
T ₄	H23	64.4±39.9 b	57.5±33.7 b	41.2±28.0 b	27.6±16.3 b	27.8±16.5 b	23.7±5.9 b	15.0±8.5 b	
	63-4S	183.0±59.2 a	173.4±62.7 a	151.8±41.0 a	83.8±20.0 a	67.2±26.1 a	50.0±20.3 a	20.1±3.5 b	
	TN1	133.4±31.6 a	160.6±72.7 a	85.8±28.7 a	76.8±26.4 a	57.2±23.2 a	41.0±19.0 a	34.7±2.5 a	
	RH	44.8±16.8 b	23.0±13.3 b	10.6±11.6 b	5.4±6.3 b	3.9±4.5 c	1.6±1.8 c	1.1±1.5 c	

[0189] 数值以8~10株水稻的平均值±标准差表示,不同材料间数据差异显著性分析使用Duncan进行多重比较($\alpha=0.05$)。

[0190] 实施例6转化事件H23对靶标除草剂的抗性

[0191] 在温室或田间条件下对不同世代转化事件的除草剂抗性进行鉴定,通过分别喷施清水(0×)、喷施田间推荐剂量中量的1倍(1×,250mL/亩或45g/亩)草铵膦、田间推荐浓度中量的2倍(2×,500mL/亩或90g/亩)草铵膦、田间推荐浓度中量的4倍(4×,1000mL/亩或180g/亩)草铵膦,调查植株对目标除草剂的抗性。

[0192] 结果如表8所示,清水处理下对照和转化事件皆无药害产生,药害率为0;草铵膦1倍剂量处理下,药后1周调查发现对照药害率达到100.0%,即全部死亡,H23的T₂和T₃代植株则均没有药害产生,进一步在药后2周和4周调查,亦未发现除草剂药害。2倍和4倍剂量处理下T₂和T₃代转化事件也无药害产生。T₄代植株在4倍处理下有少量药害发生,但2周后药害症状已经消失。这说明转化事件H23对草铵膦的抗性较好。除草剂耐性表现见图4。

[0193] 表8 H23对草铵膦的抗性

处理	材料	药害率 (%)		
		1周	2周	4周
0×	63-4S	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₂	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₃	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₄	0.0 b	0.0 a	0.0 a
1×	63-4S	100.0±0.0 a	-	-
	H23 T ₂	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₃	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₄	0.0 b	0.0 a	0.0 a
2×	H23 T ₂	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₃	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₄	0.0 a	0.0 a	0.0 a
4×	H23 T ₂	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₃	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	H23 T ₄	5.5±1.4 a	0.0 a	0.0 a

[0195] 数值以3次生物学重复的平均值±标准差表示,相同处理下不同材料间数据差异显著性分析使用Duncan进行多重比较($\alpha=0.05$)。

[0196] 实施例7转化事件H23外源序列的侧翼序列及水稻基因组插入位置

[0197] 根据载体序列,设计Tail-PCR载体特异性引物(5'-TCCTGCCCGTCACCGAGATTTG-3')以及基因组的简并引物(5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA-3')。利用相关的引物对转化事件H23进行巢式Tail-PCR扩增,对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测及测序。通过Tail-PCR扩增获得了插入序列左边界旁的侧翼序列。测序结果在PlantGDB数据库中用BLASTN工具,以MSU数据库为参考基因组,与水稻基因组序列进行同源比对,以最好的匹配结果为插入位点。利用转化事件特异性PCR检测H23外源片段插入水稻基因组的位置。

[0198] Tail-PCR的操作步骤如下:

[0199] 1) 提取水稻基因组DNA。

[0200] 2) 以植物基因组DNA作为第一轮PCR反应的模板,反应体系如下:

10×PCR Buffer	2.0 μL
dNTP (10 mmol/L)	0.3 μL
SP1 (10 μM)	0.2 μL
[0201] ADP (10 μM)	1.2 μL
rTaq	0.12 μL
基因组 DNA	1.0 μL
无菌 ddH ₂ O	至终体积 20 μL

[0202] 反应程序为:94℃,5min;(94℃,30sec;62℃,2min;72℃,2.5min)×5cycles;94℃,30sec;25℃,3min;72℃(32%ramp),3min;(94℃,30sec;62℃,1min;72℃,2.5min;94℃,30sec;62℃,1min;72℃,2.5min;94℃,30sec;45℃,1min;72℃,2.5min)×15cycles;72℃,7min;20℃,10min。

[0203] 3) 以步骤2)中相应的PCR产物(母液)为模板进行第二轮PCR扩增。反应体系如下:

10×PCR Buffer	2.0 μL
dNTP (10 mmol/L)	0.3 μL
SP2 (10 μM)	0.2 μL
[0204] ADP (10 μM)	1.2 μL
rTaq	0.12 μL
基因组 DNA	1.0 μL
无菌 ddH ₂ O	至终体积 20 μL

[0205] 反应程序为:94℃,5min;(94℃,30sec;65℃,1min;72℃,2.5min;94℃,30sec;65℃,1min;72℃,2.5min;94℃,30sec;45℃,1min;72℃,2.5min)×20cycles;72℃,7min;20℃,10min。

[0206] 4) 以步骤3)中相应的PCR产物(稀释30倍)为模板进行第三轮PCR扩增。反应体系如下:

[0207] 10×PCR Buffer	2.0 μL
----------------------	--------

	dNTP (10 mmol/L)	0.3 μ L
	SP3 (10 μ M)	0.2 μ L
	ADP (10 μ M)	1.2 μ L
[0208]	rTaq	0.12 μ L
	基因组 DNA	1.0 μ L
	无菌 ddH ₂ O	至终体积 20 μ L

[0209] 反应程序为:94 $^{\circ}$ C,5min;(94 $^{\circ}$ C,30sec;65 $^{\circ}$ C,1min;72 $^{\circ}$ C,2.5min;94 $^{\circ}$ C,30sec;65 $^{\circ}$ C,1min;72 $^{\circ}$ C,2.5min;94 $^{\circ}$ C,30sec;45 $^{\circ}$ C,1min;72 $^{\circ}$ C,2.5min) \times 20cycles;72 $^{\circ}$ C,7min;20 $^{\circ}$ C,10min。

[0210] 5) 取步骤4)中第三轮PCR的产物于1% (w/v) 1 \times TAE琼脂糖凝胶中电泳检测,回收符合目的大小的DNA片段。

[0211] 6) 将回收的片段连接T载体,16 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0212] 7) 转化6)的连接产物。

[0213] 8) 扩增7)中的转化产物,并挑取阳性克隆摇菌提质粒。

[0214] 9) 送质粒进行测序。

[0215] 通过Tail-PCR方法,利用T-DNA区左侧载体上的特异引物和简并引物,得到两条左侧翼序列,分别称为“上游侧翼序列”和“下游侧翼序列”,将序列在PlantGDB数据库(<http://www.plantgdb.org/0sGDB/cgi-bin/blastGDB.pl>)中用BLASTN工具将侧翼序列与水稻基因组序列进行同源比对分析,以MSU_7为参考序列。结合拷贝数检测结果可知,H23转化学事件的外源序列仅在Chr03:26680833-26680844位置处有一个插入,插入的序列从上游到下游依次为bar基因表达盒、BPH9基因表达盒、bar基因表达盒。

[0216] 进一步通过分段设计PCR引物扩增并测序的方法测定H23中插入的T-DNA区全长序列。

[0217] PCR反应体系:模板DNA 1 μ L;引物-F和引物-R各0.5 μ L;PCR Buffer 10 μ L;dNTP 0.5 μ L;Taq酶0.5 μ L;超纯水7 μ L。

[0218] PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 15sec;58 $^{\circ}$ C 30sec;72 $^{\circ}$ C 10min(循环35次);72 $^{\circ}$ C 10min;25 $^{\circ}$ C ∞ 。

[0219] 使用的分段扩增的引物见表9。

[0220] 表9全长扩增测序所用的引物信息

	序列 (5'-3')	用途
	CTGCTGTATTGAACTTCTCCG TCCTGCCCGTCACCGAGATTTG	P1 扩增和测序
	GGGGATCTGGATTTTAGTACTGGA CATGGTGGAGCACGACACTC	P2 扩增和测序
	CGCAATGATGGCATTGT GGGTGGATTTGAGGGAGA	P3 扩增和测序
	TTCCTTTCCACCGCTCCT CGCCCAACCAGACCACATC	P4 扩增和测序
	AATCCTGGGATGGCTCTAGC CCCTCAGCTCCTTCATCT	P5 扩增和测序
[0221]	TTTAGCCCTGCCTTCATA TTCCCAATACCACCCATT	P6 扩增和测序
	GTTGGGCGAGTTGATGATAGA CCTCGCTGATGTTTGTAATGG	P7 扩增和测序
	CTACGACGGATTACCTTAT TCAAGCGAGTGAAATGAC	P8 扩增和测序
	GGCTGTCTGGATGCTGAT AGTAACATAGATGACACCGCGC	P9 扩增和测序
	CGATCGTTCAAACATTTGGC CCAGAAACCCACGTCATGCCA	P10 扩增和测序
	GAAGGCACGCAACGCCTACGA CCCCTATACCTTCCAGCCT	P11 扩增和测序

[0222] 将11段扩增序列测序并通过序列比对和拼接,获得H23的全长插入序列。转化事件H23实际插入序列和左右侧翼水稻基因组序列如SEQ ID NO:5所示。SEQ ID NO:5序列上的遗传元件位置见表1,其中下游的bar基因表达盒不完整,缺少启动子和部分基因序列,预期没有抗性功能。H23的除草剂抗性主要由上游的bar基因表达盒起作用。

[0223] 其中,P1序列(SEQ ID NO:3)和相应的扩增引物SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8以及P11序列(SEQ ID NO:4)和相应的扩增引物SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10仅存在于含有H23的水稻材料中,可以用来对H23进行鉴定。

[0224] 实施例8转化事件H23的检测方法

[0225] 可由转基因水稻事件H23进行育种,并用育成的新品种生产诸如农产品或商品。如果在所述农产品或商品中检测到足够的量,所述农产品或商品预期含有能够诊断转基因水稻事件H23材料在所述农产品或商品中存在的核苷酸序列。所述农产品或商品包括但不限于米粉、米油、米糠、米胚、米蛋白、米淀粉、米糠营养油或米糠多糖、以及将要作为食物源供动物消费的任何其它食品、或者另外作为膨大剂或化妆组合物中的成分用于化妆用途等。基于探针或引物对的核酸检测方法和/或试剂盒可以被开发以检测生物样品中诸如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的转基因水稻事件H23核苷酸序列,其中探针序列或引物扩增序列选自如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6中所示的序列,以诊断转基因水稻事件H23的存在。

[0226] 其中一个检测方法为:利用PCR方法对T₄代H23植株中的特异性边界序列进行检测,所用的PCR引物对分别为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10。为了测试检测方法的灵敏度,将模板浓度设置为0.00768ng/ μ L-76.8ng/ μ L的梯度。PCR反应体

系如下：

	10×PCR Buffer	2 μL
	dNTP (10 mmol/L)	0.5 μL
	正向引物 (10 μM)	0.5 μL
[0227]	反向引物 (10 μM)	0.5 μL
	rTaq (5 U/μL)	0.5 μL
	基因组DNA	1 μL
	灭菌ddH ₂ O	至终体积20 μL

[0228] 反应程序为：

[0229] 94℃,5min;(94℃,30sec;55℃,1min;72℃,1.0min)×35循环;72℃,7min;4℃,5min。

[0230] 取PCR产物于1% (w/v) 1×TAE琼脂糖凝胶中电泳检测,结果见图6。模板浓度大于0.00768ng/μL的转化事件中可以扩增得到预期的目标条带(分别为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6),但是其他非来源于转化事件的样品则不能扩增出目标条带。因此该PCR方法具有灵敏度高、特异性好的优势,能够追踪转化事件的存在,从而应用于育种工作。

[0231] 综上所述,本发明转基因水稻事件H23对褐飞虱和草铵膦除草剂具有较好的抗性,且检测方法可以准确快速的鉴定生物样品中是否包含转基因水稻事件H23的DNA分子。

[0232] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 湖北省农业科学院粮食作物研究所
- [0003] <120> 一种用于检测水稻植物H23的核酸序列及其检测方法
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 10
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 22
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工合成(unknown)
- [0011] <400> 1
- [0012] tctgttgatg taaacaaatt ga 22
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 22
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工合成(unknown)
- [0017] <400> 2
- [0018] ctgctctaac aacttggtggt cg 22
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 908
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工合成(unknown)
- [0023] <400> 3
- [0024] ctgctgtatt gaacttcttc ggtttgttct gttgcttcaa ctgagagaac agggacaatg 60
- [0025] ttggetgttg attcgttaaa tttagcagtg ggccattggt ttcttcagca gctttgtttc 120
- [0026] ctttctcttt gttcgccatt gtctgcaaa tgtgtacagg tcttcaaatt aaatgattat 180
- [0027] tactttctat taaaactgaa ataatctagt tgttttcctt tgtccctgac tatattgcag 240
- [0028] catttgattt ccattcttta taagagattt tttccacca gaaccacaac gattaccttc 300
- [0029] tatcatgaaa atgtaccaga aaatcttaaa ccatcaatag gatatgcaaa aatggtggaa 360
- [0030] aaaaactctg tgattcagtc tgtagcaact aaatacttgc acgttgagaa tattaacca 420
- [0031] agtttaagga tgtattaacc tgttcaaact atctgtccaa tagctgatac tgcctggctt 480
- [0032] catttcatta acttttgctt tcttgaagct gccctgccc acagaagatg gcaatgagcc 540
- [0033] agcacacggt gtctctttca cagtctttct actttggttt tccacaggct ttcttgaacg 600
- [0034] gtggcggttt ctggtgatgt aaacaaattg acgcttagac aacttaataa cacattgcgg 660
- [0035] acgtttttaa tgtagactg aattaacgcc gaattaattc ggggatctg gattttagta 720
- [0036] ctggattttg gtttaggaa ttagaaattt tattgataga agtattttac aaatacaaat 780
- [0037] acatactaag gtttcttat atgctcaaca catgagcgaa accctatagg aaccctaatt 840
- [0038] cccttatctg ggaactactc acacattatt atggagaaac tcgagtcaaa tctcggtgac 900
- [0039] gggcagga 908
- [0040] <210> 4
- [0041] <211> 1219

[0042] <212> DNA
 [0043] <213> 人工合成(unknown)
 [0044] <400> 4
 [0045] gaagcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtgt cccccgcca 60
 [0046] ccagcggacg ggactgggct ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 120
 [0047] gggcttcaag agcgtggctg ctgtcatcgg gctgcccac gaccgagcg tgcgcatgca 180
 [0048] cgaggcgtc ggatatgcc cccgcggcat gctgcggcg gccggcttca agcacgggaa 240
 [0049] ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt 300
 [0050] cctgcccgtc accgagattt gactcgagtt tctccataat aatgtgtgag tagttcccag 360
 [0051] ataaggaat tagggttct atagggttct gctcatgtgt tgagcatata agaaaccctt 420
 [0052] agtatgtatt tgtatttga aaatacttct atcaataaaa tttctaattc ctaaaacca 480
 [0053] aatccagtac taaaatccag atccccgaa ttaattcggc gttaattcag tctaacatta 540
 [0054] aaaacgtccg caatgtgta ttaagttgtc taagcctcaa gctgctctaa caacttgtgg 600
 [0055] tcggccatgg cctccttga acaccgcat ttcttgccat ctgttcgac gcatcttcca 660
 [0056] gttctgggt cagagtctgc atttgggaag cttgataga gaggcctcca gctcactgca 720
 [0057] gtacaataag tatgtcatgt ttccatttga tttacatata acgttgctt ttgtcataat 780
 [0058] aaacctgaac tggtgagaac tgagaacgta acattgatac agcttgatg cagctcctt 840
 [0059] ttgttaataa catgctact tgtacactca gatttgcaat attcagttg tgaagcagt 900
 [0060] attctttaca tacacctaac cgacacacat attgggtgat gtaatgatg tatgtaact 960
 [0061] gatgatcgta cgtttcaagt tgatgtaaaa tactgcattt ctattttget catttatact 1020
 [0062] taacatgtgt ttcatgtata tgcagtaaca taacagttt ttttctgttc taccaggat 1080
 [0063] atgaaaatgt gagtttccag gtttaaagca tcaagatatt tgggtttgaa tacatacttc 1140
 [0064] tgtagctga tgatctgaag cttttgctga ttgaaatgag caggctggaa ggtatagggg 1200
 [0065] ctttgcatt gagatactt 1219
 [0066] <210> 5
 [0067] <211> 12149
 [0068] <212> DNA
 [0069] <213> 人工合成(unknown)
 [0070] <400> 5
 [0071] ctgctgtatt gaacttcttc ggtttgttct gttgcttcaa ctgagagaac agggacaatg 60
 [0072] ttggctgttg attcgtaaa ttagcagtg ggccattgtt ttcttcagca gctttgttct 120
 [0073] ctttctcttt gttcgccatt gtctgcaaa tgtgtacagg tcttcaaatt aaatgattat 180
 [0074] tactttctat taaaactgaa ataatctagt gttttccctt tgtccctgac tatattgcag 240
 [0075] catttgtatt ccattcttta taagagattt tttccacca gaaccacaac gattaccttc 300
 [0076] tatcatgaaa atgtaccaga aaatcttaaa ccatcaatag gatatgcaaa aatggtggaa 360
 [0077] aaaaactg tgattcagtc ttagcacta aaatactgc acgttgagaa tattaacca 420
 [0078] agtttaagga tgtattaacc tttcaaaact atctgtcaa tagctgatac tgcctggctt 480
 [0079] cattcatta acttttgcct tcttgaagct gccctgccg acagaagatg gcaatgagcc 540
 [0080] agcacagggt gtctcttca cagtcttct actttggtt tccacaggct ttcttgaacg 600
 [0081] gtggcggttt ctggtgatgt aaacaaattg acgcttagac aacttaataa cacattgcgg 660
 [0082] acgtttttaa tgtagactg aattaacgcc gaattaattc ggggatctg gatttttagta 720
 [0083] ctggattttg gtttaggaa ttagaaattt tattgataga agtattttac aaatacaaat 780

[0084] acatactaag ggtttcttat atgctcaaca catgagcga accctatagg aaccctaatt 840
[0085] cccttatctg ggaactactc acacattatt atggagaaac tcgagtcaa tctcgggtgac 900
[0086] gggcaggacc ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacagtc 960
[0087] atgccagttc ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag 1020
[0088] cgctcgtgc atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt 1080
[0089] gaagccctgt gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcacct 1140
[0090] ccgctgggtg cggggggaca cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg 1200
[0091] tgcttccag gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctc ccgtccacct cggcgacgag 1260
[0092] ccagggatag cgctcccga gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgcbg 1320
[0093] ctcggtagcg aagttgaccg tgcttgctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc 1380
[0094] cggcatgtcc gcctcgggtg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggctcatggt 1440
[0095] agactcgaga gagatagatt tgtagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa 1500
[0096] tgaatgaac ttcttata agaggaagg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcbtca 1560
[0097] tccctacgt cagtggagat atcacatcaa tccacttctt ttgaagacgt ggttggaacg 1620
[0098] tcttctttt ccacgatgct cctcgtgggt ggggtccat ctttgggacc actgtcggca 1680
[0099] gagcatctt gaacgatagc ctttcttta tcgcaatgat ggcatttcta ggtgccacct 1740
[0100] tcttttcta ctgtccttt gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg 1800
[0101] tttcccata ttacccttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtctt tgagactgta 1860
[0102] tcttgatata tcttgagta gacgagagtg tcgtgctcca ccatgttggc aagctgctct 1920
[0103] agccaatacg caaacgcct gcaggtctag tagatcgtc ccctctctag agataatgag 1980
[0104] cattgcatgt ctaagtata aaaaattacc acatatttt ctgtcacact tgtttgaagt 2040
[0105] gcagttatc tatcttata catatattta aactttactc tacgaataat ataactata 2100
[0106] gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatggtcta 2160
[0107] aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatctttta gtgtgcatgt 2220
[0108] gttctcctt tttttgcaa atagcttcc ctatataata cttcatccat tttattagta 2280
[0109] catccattta ggttttaggg ttaatggtt ttatagacta attttttag tacatctatt 2340
[0110] ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaagactc tattttagtt tttttatta 2400
[0111] ataatttaga tataaatag aataaataa agtgactaaa aattaaaca ataccttta 2460
[0112] agaaatataaaa aaactaagg aaacatttt cttgtttcga gtagataatg ccagcctgtt 2520
[0113] aaacgccgtc gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggc 2580
[0114] aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gaccctctc gagagttccg 2640
[0115] ctccaccgtt ggacttctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg agcggcagac 2700
[0116] gtgagccggc acggcaggcg gcctctcct cctctcagcg caccggcagc tacgggggat 2760
[0117] tctttccca ccgtccttc gtttccctt cctcggccgc cgtaataaat agacaccccc 2820
[0118] tccacacct ctttcccaa cctcgtgtt ttcggagcgc acacacacac aaccagatct 2880
[0119] ccctcaaatc caccgtcgg cacctcgcct tcaaggtacg ccgctcgtc tccccccc 2940
[0120] ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact 3000
[0121] tctgttcatg tttgtgttag atccgtgtt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac 3060
[0122] acggatgca cctgtacgtc agacacgtt tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg 3120
[0123] gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg atttttttg 3180
[0124] tttcgttga tagggtttg tttgccctt tctttattt caatatatgc cgtgcacttg 3240
[0125] tttgtcgggt catcttttca tgctttttt tgtcttggt gtgatgatgt ggtctggtg 3300

[0126]	ggcggctcgtt	ctagatcggg	gtagaattct	gtttcaaact	acctggtgga	tttattaatt	3360
[0127]	ttggatctgt	atgtgtgtgc	catacatatt	catagttacg	aattgaagat	gatggatgga	3420
[0128]	aatatcgatc	taggataggt	atgcatgttg	atgcgggttt	tactgatgca	tatacagaga	3480
[0129]	tgctttttgt	tcgcttggtt	gtgatgatgt	ggtgtggttg	ggcggctcgtt	cattcgttct	3540
[0130]	agatcggagt	agaatactgt	ttcaaactac	ctggtgtatt	tattaatttt	ggaactgtat	3600
[0131]	gtgtgtgtca	tacatcttca	tagttacgag	tttaagatgg	atggaaatat	cgatctagga	3660
[0132]	taggtataca	tgttgatgtg	ggttttactg	atgcatatac	atgatggcat	atgcagcadc	3720
[0133]	tattcatatg	ctctaacctt	gagtacctat	ctattataat	aaacaagtat	gtttttataat	3780
[0134]	tatthtgatc	ttgatatact	tggatgatgg	catatgcagc	agctatatgt	ggatthtttt	3840
[0135]	agccctgcct	tcatacgeta	tttatttgct	tggtactgtt	tcttttgcg	atgctcacc	3900
[0136]	tgthgttg	tgthacttct	gthgcaacat	ggaggccacg	gcggtgagca	ttggcaggtc	3960
[0137]	cgtgctgaag	ggagcgttg	gcttcgcca	atccacctg	gtggaggagg	ttccctgca	4020
[0138]	gctcggcgtc	cagcgcgacc	aggcgttcat	caggacgag	ctggagatga	tgaactcctt	4080
[0139]	cctgatggcc	gccaatgatg	agaaagatga	caacaagtg	gtaaggacct	gggtgaagca	4140
[0140]	ggtccgcgac	gtggcctacg	acgtcgagga	ctgcctccag	gacttcgccg	tccgcttggg	4200
[0141]	ggggaagagt	tcactctggt	ggctcagccc	tcacacgett	tgggagcggc	gccgcatcgc	4260
[0142]	caagcagatg	aaggagctga	gggcaaggt	tgaggatgct	agccagagga	acatgcgcta	4320
[0143]	tcaactcadc	aagggtcca	agcctactgt	agctaccaat	gtcgcacca	gcaacagtac	4380
[0144]	tgccctgctg	accatgctg	gcgcgcatga	agaacgatgg	cagcatgaca	aggcagtagc	4440
[0145]	tggtctggtt	cggtggtca	aaaccaaggt	tgatgaatgt	agagtgattg	cagthgtggg	4500
[0146]	aacaagthgt	gatctaagg	agacgtccat	cattagagaa	gcttatgadc	atatcaagag	4560
[0147]	aagcaagaag	thtgaatgct	gtgcctggat	tgatthgatg	catcctctta	atccaacgaa	4620
[0148]	atthctgcaa	accatthtta	ggcagthtga	cataagatct	cttcaggagg	ctggtgaagc	4680
[0149]	aactcctggg	tgccagcttc	tgaggagcat	gthgatgaag	gaagatcatt	tggattatga	4740
[0150]	cgacttcaat	aatatthtga	gtgacaagg	ctacctcatt	gtgctgaatg	acctatcaac	4800
[0151]	caccgaagag	tggaagcaaa	tcaaaaggca	cttaccagat	aacaagaaag	ggagtcgaat	4860
[0152]	catagthtcc	acacatcaag	tcgaagthgc	aagcttatgc	gcaggacag	aggagthtgc	4920
[0153]	accagagcat	gtgcaattht	thtgcggatca	tgctctthac	gctthtccact	tcaaggthtgc	4980
[0154]	taaagatgga	atagatthcaa	tggaacactc	gcttagctta	catgaagaca	ctagatatag	5040
[0155]	ctctgaagaa	ggaagaacc	tcactcgcac	ggatacaatg	gtaactthtt	tcaaggaatc	5100
[0156]	tgagatcgtt	ggcgagtht	atgatagaaa	caaatthatt	gaactgattt	caaaagthtag	5160
[0157]	ccaacagctt	gagaagatct	cagthtggg	aatggthgt	atthggaaaa	ccactctaat	5220
[0158]	tcaaatgthc	taccgaagcg	aaaagthttaa	gaagatgtht	gataagcatg	catgthtcaac	5280
[0159]	gatcatcgc	ccgthtcaatc	thaatgatct	tcttatgagc	thtagthtagc	aactagaaga	5340
[0160]	thtcaaaaact	tctggagaaa	aggagthtgc	tagcattthta	gaaggaaaga	aatactthgat	5400
[0161]	thtthctthgat	gatgthattat	thcaaacaga	atgggatgct	atagaatcat	atthtccagc	5460
[0162]	aacggaaca	ggaagccgga	tcataataac	cacaaggcat	gaaagthattg	ctaagcattg	5520
[0163]	thtcagggat	caacaaggaa	aatgthatca	actcaatcgt	ctaggagaca	acgatgcaaa	5580
[0164]	gaacctctth	gcaagaag	tatthtaagga	gtcagthaaat	thggatcaac	aagatctthga	5640
[0165]	atthgatcaaa	gaagcgaac	cgatthttaa	gaagthcaat	ggactthccc	thgcaatthgt	5700
[0166]	caccataggt	gthtthctthg	caagccgccc	caaaactact	thggagthgga	gaaatthgaa	5760
[0167]	tgagcatatth	agthcagagth	thggagacaaa	cccaggtct	gaggccatca	gagctgthct	5820

[0168] taatataagc tacgacggat taccttatca cctcaagtct tgcttcttgt atctgtccat 5880
 [0169] ctttcctgaa gatggcaaga ttagcagaaa acgtttgggtg cgctgatggt gtgcagaggg 5940
 [0170] ttactcaagg gagctatggg acaaatctgc agaggaaata gcaacaact acttctttga 6000
 [0171] actcatagac agaagcatga tcctaccaac tcaaaattca acttacagca gtagaggggc 6060
 [0172] tgattcttgc cagatccatg atatcatgcg tgagatagcc atcttgaagt caaaggagga 6120
 [0173] aaaccttggt cttagactcg aaggggtcc caggctatac aatcatgaca cagttcggca 6180
 [0174] tatttcatt acaaacatca gcgaggactg ggagacagat gtcgatgaat tgaagacaac 6240
 [0175] agtagatatg tcccgaataa gatcattaac agtatttggg atgtggagac ctttttttat 6300
 [0176] ttctgacaag atgcagttac tacaagtgt agacttgaa gacacaaaag gtgtatatga 6360
 [0177] tcatcatatt aagcaaattg ggaagctcct tcacctaga tacctttctc taagaggatg 6420
 [0178] tgggaacatt acttacctgc ctgattcctt aggtaacctt aggcaactgg agacactaga 6480
 [0179] tgtcagaggt acgtgcatac tcaggttga aaagaccatc attaatcttc gcaagctaaa 6540
 [0180] gtatctcctg gctgtcccag agttatctga cccgtatgaa gacatagcag agaaactacc 6600
 [0181] agagctcatt aggaacaggc tatgcatttc tgcgactgcg ttgctggcgc tttgcgtgtt 6660
 [0182] atgtcacca agtgatcaag ggattagtac ccgtgacctc tgcaccttgt gttgctgcag 6720
 [0183] tattctcct gccattgcca tgcgctcga cgggaatggt gtagtagcac cgagagggt 6780
 [0184] gaggagactg acagccctgc acacgctagg tgtggtggac atttcatggc agccatcaat 6840
 [0185] ttacaagat atcaagaggc tcatccagct gcgcaactg ggagtgagcg gtgtcaacaa 6900
 [0186] gaaaaacagc aaaaagtttt tatctgcctt tgctgctctc agccgcctgg aatcattgtc 6960
 [0187] actgatctcg aaggggaagc caggtctctg gggctgtctg gatgctgatg aaaagtttc 7020
 [0188] gccacctaa aatctcaaga ctctgaagct tcaaggcaac ctggttgagt tgccaaaatg 7080
 [0189] gatcgggcag ctcaacaatc tcgtgaagct gaagctatca gaaaccgggc tcaaggatca 7140
 [0190] tgatgctgct atacaagtcc ttggtgaagct acgaaacctg accatcctat gcctgctggg 7200
 [0191] caagtcattt cactcgttg aggggtgga actcaatttc tcggaggat ctttcaaaag 7260
 [0192] cctggtggtt ctgagcttg acttcagtgg gagcaaatgc gtcaagtttc aacaaggagc 7320
 [0193] attccacaat cttgagctac tggagcttca ttgtgagcta ctggagcttt ctggtcatat 7380
 [0194] tgaagaagtc gaaactaagt tctctgggct agaatttctc ccaagaatca aggaagtccg 7440
 [0195] gctccagggt tatttttacg gattttatga cacacgaaa ttgatggagg acttgctggc 7500
 [0196] acagcttcc gagaacccaa agaaaccaat cctgaagcct agcgggtgat gtaactaget 7560
 [0197] ctgtctcag tactggccc gaagactgac cagctcgaat ttccccgatc gttcaaacat 7620
 [0198] ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcatga ttatcatata 7680
 [0199] atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat 7740
 [0200] gagatgggtt tttatgatta gagtcccga attatacatt taatacgcga tagaaaacaa 7800
 [0201] aatatagcgc gcaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcg 7860
 [0202] ggccatccgc actgtagcgg atggcctaaa aaaaaacta gaagagacga gtctgagact 7920
 [0203] cagctctcg gtcgactca taactcgtta tagcatacat tatacgaagt tatgggccg 7980
 [0204] attaccctgt taccctagg ccgataact tcgtatagcc tacattatag gatggagga 8040
 [0205] tatectctct taaggtagcg agcaagctct aagaggagtg tcgacaagct tggcactggc 8100
 [0206] cgctgtttta caacgtctg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc 8160
 [0207] agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc 8220
 [0208] ccaacagttg cgcagctga atggcgaatg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 8280
 [0209] agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 8340

[0210]	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggatttt	ggtcatgcat	tctagggag	8400
[0211]	gtgcgaacaa	gtccctgata	tgagatcatg	tttgtcatct	ggagccatag	aacagggttc	8460
[0212]	atcatgagtc	atcaacttac	cttcgccgac	agtgaattca	gcagtaagcg	ccgtcagacc	8520
[0213]	agaaaagaga	ttttctgtc	ccgcatggag	cagattctgc	catggcaaaa	catggtggaa	8580
[0214]	gtcatcgagc	cgttttaccc	caaggctgg	aatggccggc	gaccttatcc	gctggaaacc	8640
[0215]	atgctacgca	ttactgcat	gcagcattgg	tacaacctga	gcgatggcgc	gatggaagat	8700
[0216]	gctctgtacg	aaatgcctc	catgcgtctg	tttgcccgg	tatccctgga	tagcgccttg	8760
[0217]	ccggaccgca	ccaccatcat	gaatttccgc	cacctgctgg	agcagcatca	actggcccgc	8820
[0218]	caattgttca	agaccatcaa	tcgctggctg	gccgaagcag	gcgtcatgat	gactcaaggc	8880
[0219]	accttggctg	atgccacat	cattgaggca	cccagctcga	ccaagaacaa	agagcagcaa	8940
[0220]	cgcatccgg	agatgcatca	gaccaagaaa	ggcaatcagt	ggcactttgg	catgaaggcc	9000
[0221]	cacattggtg	tcgatgcaa	gagtggcctg	accacagcc	tggtcaccac	cgcggccaac	9060
[0222]	gagcatgacc	tcaatcagct	gggtaatctg	ctgcatggag	aggagcaatt	tgtctcagcc	9120
[0223]	gatgccggct	accaagggc	gccacagcgc	gaggagctgg	ccgaggtgga	tgtggactgg	9180
[0224]	ctgatcgccg	agcgcgccg	caaghtaaga	accttgaac	agcatccacg	caagaacaaa	9240
[0225]	acggccatca	acatcgaata	catgaaagcc	agcatccggg	ccagggtgga	gcaccattt	9300
[0226]	cgcatcatca	agcgacagtt	cggcttctg	aaagccagat	acaaggggtt	gctgaaaaac	9360
[0227]	gataaccaac	tggcgtggtt	attcacgctg	gccaacctgt	ttcgggcgga	ccaaatgata	9420
[0228]	cgtcagtggg	agagatctca	ctaaaaactg	gggataacgc	cttaaatggc	gaagaaacgg	9480
[0229]	tctaaatagg	ctgattcaag	gcatttacgg	gagaaaaaat	cggctcaaac	atgaagaaat	9540
[0230]	gaaatgactg	agtcagccga	gaagaatttc	cccgttatt	cgcaccttcc	ctaggtacta	9600
[0231]	aaacaattca	tccagtaaaa	tataatattt	tattttctcc	caatcaggct	tgatccccag	9660
[0232]	taagtcaaaa	aatagctcga	catactgttc	ttccccgata	tcctccctga	tcgaccggac	9720
[0233]	gcagaaggca	atgtcatacc	acttgtccgc	cctgccgctt	ctcccaagat	caataaagcc	9780
[0234]	acttactttg	ccatctttca	caaagatggt	gctgtctccc	aggctgccgt	gggaaaagac	9840
[0235]	aagtctctct	tcgggctttt	ccgtctttaa	aaaatcatac	agctcgcgcg	gatctttaa	9900
[0236]	tggagtgtcc	tcttcccagt	tttcgcaatc	cacatcggcc	agatcgttat	tcagtaagta	9960
[0237]	atccaattcg	gctaagcggc	tgtctaagct	attcgtatag	ggacaatccg	atatgtcgtat	10020
[0238]	ggagtgaag	agcctgatgc	actccgcata	cagctcgata	atcttttcag	ggctttgttc	10080
[0239]	atcttcatac	tcttccgagc	aaaggacgcc	atcggcctca	ctcatgagca	gattgctcca	10140
[0240]	gccatcatgc	cgttcaaagt	gcaggacctt	tggaacaggc	agctttcctt	ccagccatag	10200
[0241]	catcatgtcc	ttttccggtt	ccacatcata	ggtggtccct	ttataccggc	tgtccgctcat	10260
[0242]	ttttaaatat	aggttttcat	tttctcccac	cagcttata	accttagcag	gagacattcc	10320
[0243]	ttccgtatct	tttacgcagc	ggtatttttc	gatcagtttt	ttcaattccg	gtgatattct	10380
[0244]	cattttagcc	atattattatt	tccttctct	tttctacagt	atthaaagat	acccaagaa	10440
[0245]	gctaattata	acaagacgaa	ctccaattca	ctgttccttg	cattctaaaa	ccttaatac	10500
[0246]	cagaaaacag	ctttttcaaa	gttgttttca	aagttggcgt	ataacatagt	atcgacggag	10560
[0247]	ccgattttga	aaccgcggtg	atcacaggca	gcaacgctct	gtcatcgta	caatcaacat	10620
[0248]	gctaccctcc	gcgagatcat	ccgtgtttca	aaccggcag	cttagttgcc	gttcttccga	10680
[0249]	atagcatcgg	taacatgagc	aaagtctgcc	gccttacaat	ggctctccc	ctgacgccgt	10740
[0250]	tagaatagca	tcgtaacat	gagcaaagtc	tgccgcctta	caacggctct	cccgtgacg	10800
[0251]	ccgtcccgga	ctgatgggct	gcctgtatcg	agtggtgatt	ttgtgccgag	ctgccggctg	10860

[0252] gggagctgtt ggctggctgg gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgccctac 10920
 [0253] cgggcccctg gaaggcacgc aacgcctac actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtgt 10980
 [0254] cccccgccca ccageggacg ggactgggct ccacgctcta caccacactg ctgaagtccc 11040
 [0255] tggaggcaca gggcttcaag agcgtggctg ctgtcatcgg gctgcccac gacccgagcg 11100
 [0256] tgcgcatgca cgaggcctc ggatatgcc cccgcggcat gctgcggcg gccggcttca 11160
 [0257] agcacgggaa ctggcatgac gtgggttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccg 11220
 [0258] cccgtccggc cctgcccgtc accgagattt gactcgagtt tctccataat aatgtgtgag 11280
 [0259] tagttcccag ataaggaat tagggttct atagggttc gctcatgtgt tgagcatata 11340
 [0260] agaaaccctt agtatgtatt tgtatttga aaatacttct atcaataaaa tttctaattc 11400
 [0261] ctaaaacca aatccagtac taaaatccag atccccgaa ttaattcggc gttaattcag 11460
 [0262] tctaacatta aaaacgtcc caatgtgta ttaagttgc taagcctcaa gctgctctaa 11520
 [0263] caactgtgg tcggccatgg cctccttga acaccgcat ttcttgccat ctgttcgacg 11580
 [0264] gcatcttcca gtttctgggt cagagtctgc atttgggaag cttgataga gaggcctcca 11640
 [0265] gctcactgca gtacaataag tatgtcatgt ttccattga tttacatc acgttgcctt 11700
 [0266] ttgtcataat aaacctgaac tggtgagaac tgagaacgta acattgatac agcttgtatg 11760
 [0267] cagtccttt ttgttaataa catgctcact tgtacactca gatttgcaat attcagtttg 11820
 [0268] tgaaagcagt attctttaca tacacctaac cgacacacat attggtgat gtaatgtatg 11880
 [0269] tatgtaactt gatgatcgta cgtttcaagt tgatgtaaaa tactgcattt ctattttgct 11940
 [0270] catttatact taacatgtgt ttcatgtata tgcagtaaca taacagtttt ttttctgttc 12000
 [0271] taccaggat atgaaaatgt gagtttccag gtttaagca tcaagatatt tgggtttgaa 12060
 [0272] tacatacttc tgtagctga tgatctgaag cttttgctga ttgaaatgag caggctggaa 12120
 [0273] ggtatagggg cttttgcatt gagatactt 12149
 [0274] <210> 6
 [0275] <211> 920
 [0276] <212> DNA
 [0277] <213> 人工合成(unknown)
 [0278] <400> 6
 [0279] tctgcccgt caccgagatt tgactcgagt ttctccataa taatgtgtga gtagttccca 60
 [0280] gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaacct 120
 [0281] tagtatgat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca 180
 [0282] aatccagta ctaaaatcca gatccccga attaattcgg cgtaattca gtctaacatt 240
 [0283] aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt ctaagcctca agctgctcta acaacttgtg 300
 [0284] gtcggccatg gcctcctttg aacaccgcca tttcttgcca tctgttcgac ggcactctcc 360
 [0285] aggttctggg tcagagtctg catttgggaa gccttgatag agaggcctcc agctcactgc 420
 [0286] agtacaataa gtatgtcatg tttccatttg atttacatat cacgttgctt tttgtcataa 480
 [0287] taaacctgaa ctggtgagaa ctgagaacgt aacattgata cagcttgtat gcagctcctt 540
 [0288] tttgttaata acatgctcac ttgtacactc agatttgcaa tattcagttt gtgaaagcag 600
 [0289] tattctttac atacaccta cgcacacaca tattggtgta tgtaatgtat gtatgtaact 660
 [0290] tgatgatcgt acgtttcaag ttgatgtaaa atactgcatt tctattttgc tcatattatac 720
 [0291] ttaacatgtg tttcatgtat atgcagtaac ataacagttt ttttctgtt ctaccagga 780
 [0292] tatgaaaatg tgagtttca ggtttaaagc atcaagatat ttgggtttga atacatactt 840
 [0293] ctgttagctg atgatctgaa gcttttctg attgaaatga gcaggctgga aggtataggg 900

[0294] gcctttgcat tgagatactt 920
[0295] <210> 7
[0296] <211> 21
[0297] <212> DNA
[0298] <213> 人工合成(unknown)
[0299] <400> 7
[0300] ctgctgtatt gaacttctcc g 21
[0301] <210> 8
[0302] <211> 22
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 人工合成(unknown)
[0305] <400> 8
[0306] tcctgcccgt caccgagatt tg 22
[0307] <210> 9
[0308] <211> 21
[0309] <212> DNA
[0310] <213> 人工合成(unknown)
[0311] <400> 9
[0312] gaaggcacgc aacgcctacg a 21
[0313] <210> 10
[0314] <211> 19
[0315] <212> DNA
[0316] <213> 人工合成(unknown)
[0317] <400> 10
[0318] ccctataacc ttccagcct 19

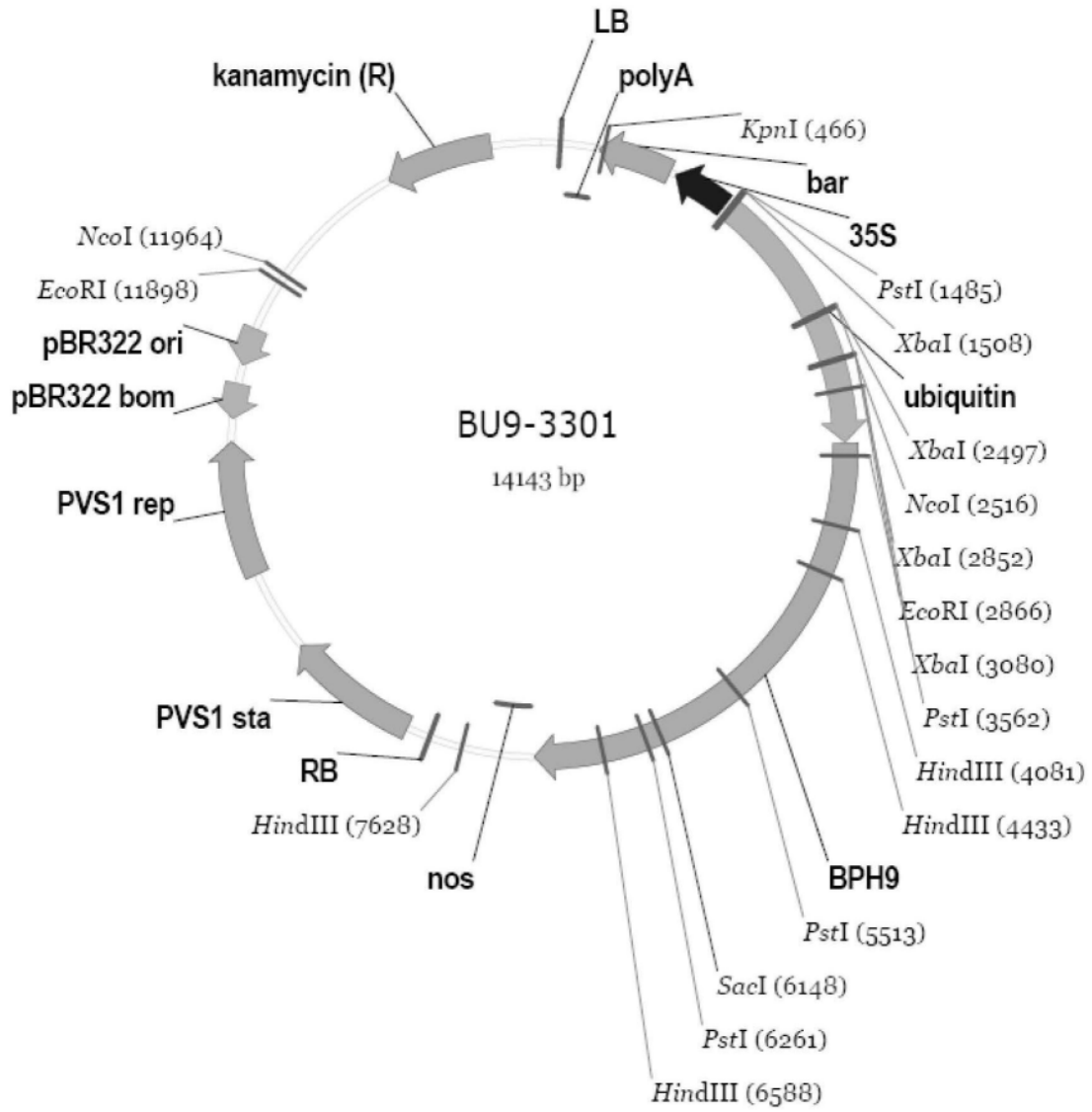


图1

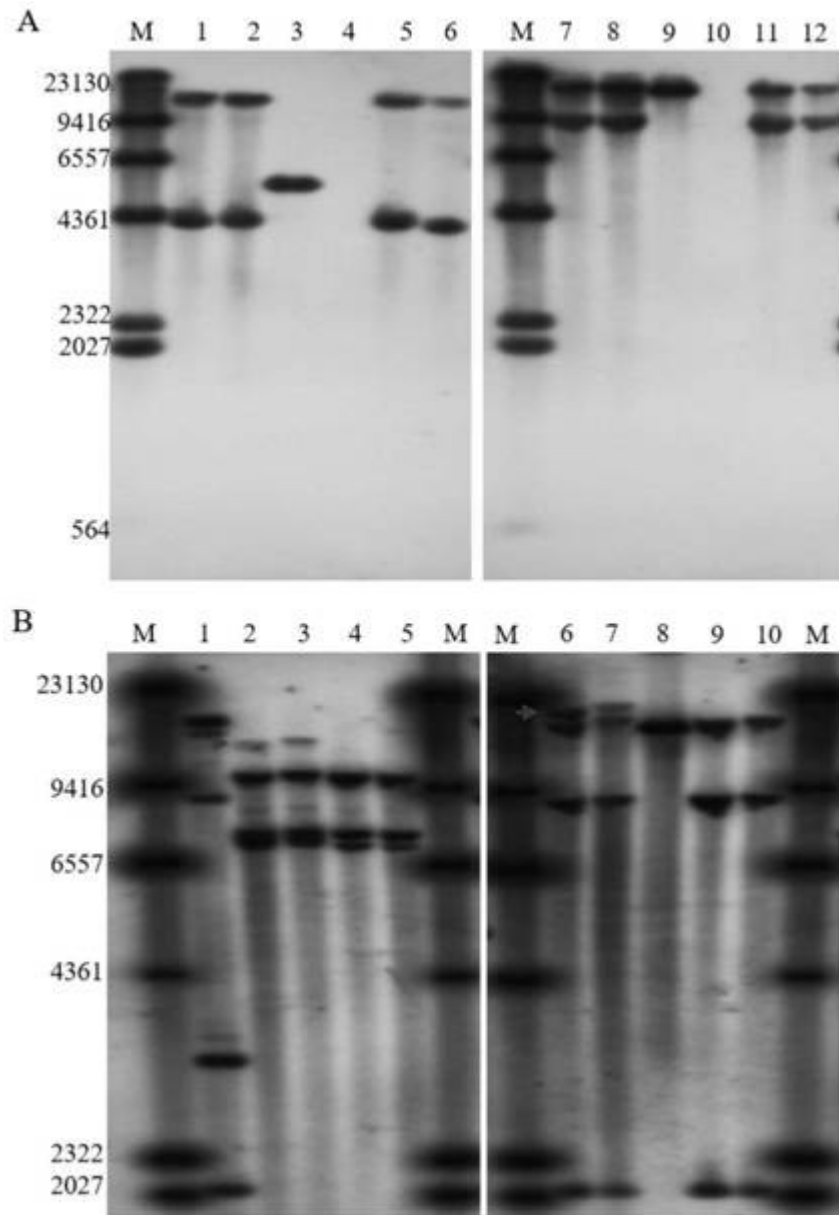


图2

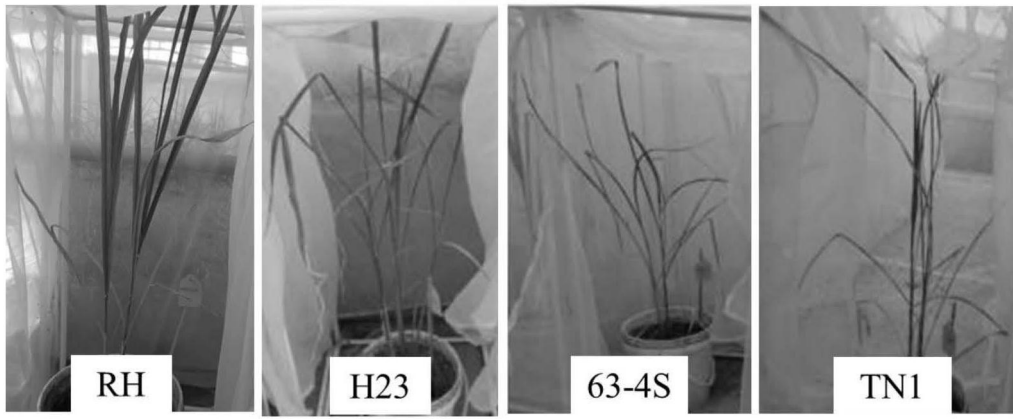


图3

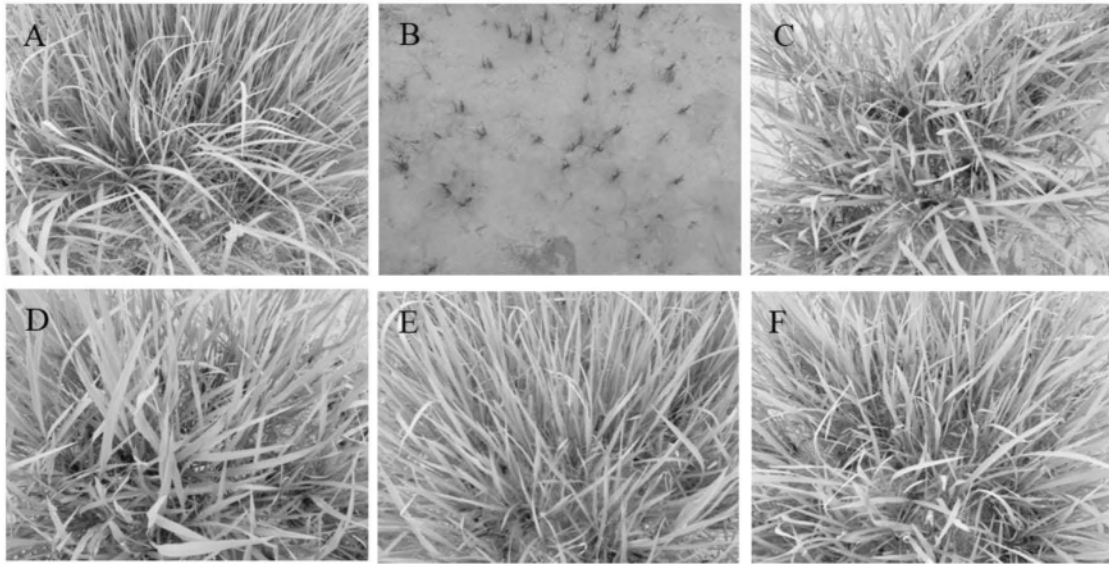


图4

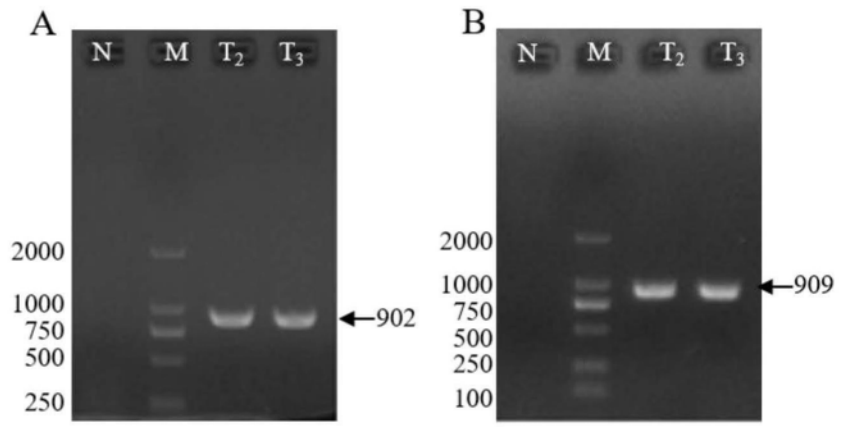


图5

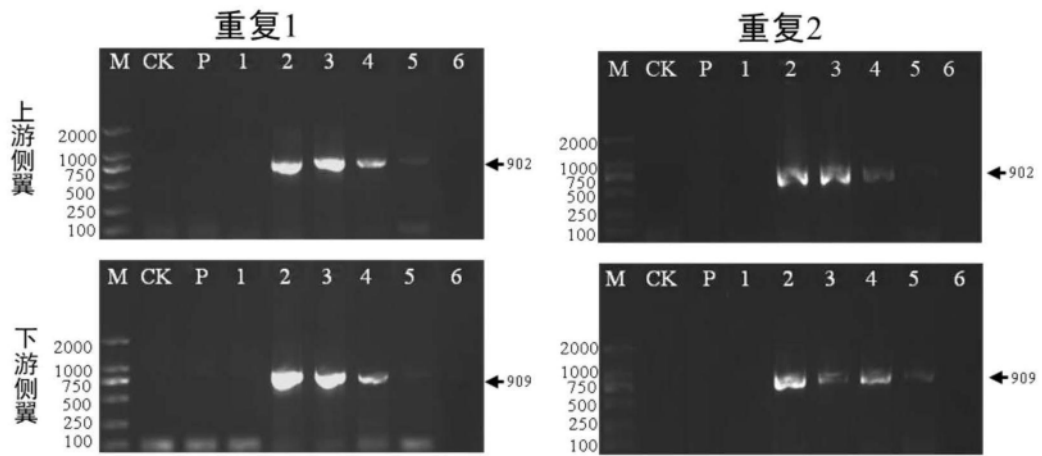


图6