



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116287384 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 05

(21) 申请号 202310132752.2

(22) 申请日 2023.02.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116287384 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(66) 本国优先权数据
202211594241.4 2022.12.13 CN

(73) 专利权人 山东省农业科学院
地址 250000 山东省济南市工业北路202号

(72) 发明人 岳润清 丁照华

(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 叶厚朴

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6895 (2018.01)
A01G 22/20 (2018.01)
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01)
A01H 5/00 (2018.01)
A01N 25/32 (2006.01)
A01N 57/20 (2006.01)
A01P 13/00 (2006.01)
A23K 10/30 (2016.01)
A23L 7/10 (2016.01)

(56) 对比文件
CN 114107344 A, 2022.03.01
WO 2018090715 A1, 2018.05.24
CN 108018369 A, 2018.05.11
CN 111041036 A, 2020.04.21
CN 112126707 A, 2020.12.25
胡银岗. 植物基因工程. 西北农林科技大学出版社, 2006, 第231-232页.

审查员 侯玮婷

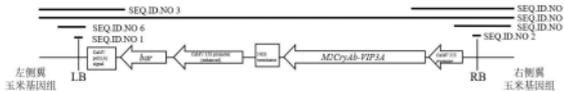
权利要求书1页 说明书21页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

抗虫耐除草剂玉米转化事件LD05的核酸分子、检测方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种抗虫耐除草剂玉米转化事件LD05的核酸分子、检测方法及其应用,所述玉米转化事件LD05的核酸分子包括SEQ ID NO:1所示序列或其反向互补序列、或者SEQ ID NO:2所示序列或其反向互补序列。本发明玉米LD05具有抗虫和耐草铵膦除草剂特性且农艺性状优良,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玉米事件LD05的DNA分子。



1. 一种用于检测玉米转基因转化事件LD05的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子序列为如下任意一种:

- i) SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列,或其反向互补序列;
- ii) SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示序列,或其反向互补序列;
- iii) SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示序列,或其反向互补序列;
- iv) SEQ ID NO:5所示序列,或其反向互补序列;

所述玉米转基因转化事件LD05是指外源片段插入到玉米基因组chr 6:150747133-150747159bp位置处;所述外源片段具有SEQ ID NO:5的第623-8131位核苷酸所示序列。

2. 用于检测权利要求1所述玉米转基因转化事件LD05的探针,其特征在于,所述探针为如下任意一种:

- i) SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示序列,或其反向互补序列;
- ii) SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示序列,或其反向互补序列;
- iii) SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示序列,或其反向互补序列。

3. 用于检测权利要求1所述玉米转基因转化事件LD05的引物对,其特征在于,所述引物对为SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9所示的序列,或者SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示的序列。

4. 用于检测权利要求1所述玉米转基因转化事件LD05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. 检测权利要求1所述玉米转基因转化事件LD05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转化事件:

- 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。

抗虫耐除草剂玉米转化事件LD05的核酸分子、检测方法及其 应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域。具体的说,涉及抗虫耐除草剂玉米转化事件LD05的核酸分子、检测方法及其应用,特别是涉及一种抗虫和耐受草铵膦除草剂施用的转基因玉米事件LD05和用于检测生物样品中是否包含特定转基因玉米事件LD05的核酸序列及其检测方法。

背景技术

[0002] 玉米是我国种植面积最广的农作物,2015年种植面积5.7亿亩,产量2.2亿吨,种植面积和总产量都达到了我国粮食作物总种植面积和总产量的1/3。培育抗虫耐除草剂转基因玉米品种,推广转基因玉米将是我们提升单产,实现供需平衡,保证粮食安全的有效手段。

[0003] 玉米的整个生育期会受到多种虫害的影响,其中,玉米螟是玉米生产上的主要害虫,每年可导致约10%的减产。

[0004] Cry1Ab蛋白首次由孟山都公司开发成抗虫玉米MON810,旨在提高对亚洲玉米螟(ACB)等野秆螟属(*Ositrinia species*)害虫的抗性。Vip3Aa首次由先正达公司应用到转基因玉米MIR162中,对小地老虎*Agrotis ypsilon*、玉米穗蛾*Helicoverpa armigera*、豆白隆切根虫*Loxagrotis albicosta*和草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*具有显著的控制作用。M2cryAb-vip3A蛋白是通过人工合成的方法,将Cry1Ab和Vip3Aa蛋白的主要结构域组合而成。M2cryAb-vip3A蛋白的主要优点有:(1)扩大抗虫谱,同时含有两种蛋白的功能结构域,预期对玉米螟、棉铃虫、粘虫、草地贪夜蛾均有抗性;(2)有利于靶标害虫抗性管理,大量研究表明,Vip3对多种鳞翅目害虫有很高的杀虫活性,拓展了Bt蛋白的杀虫谱,同时Vip3毒素和Cry毒素的杀虫机理存在差别,在进化上没有同源性,害虫对这两种毒素产生交互抗性的机率很小;(3)减少玉米果穗及籽粒中真菌毒素的水平,提高玉米籽粒品质;(4)蛋白序列中不含有过敏原序列,在保持高效杀虫活性的同时兼具生物安全性。

[0005] 田间杂草与作物竞争水、肥、光能及生长空间,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。农业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。除草剂的推广使用,可大幅度减少棉田管理用工,降低劳动强度。开发高效、低毒、无残留的除草剂新产品,费用高、耗时长难度大。通过转基因技术培育耐灭生性除草剂的玉米可以克服这一难题。在玉米生长期喷施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,耐除草剂转基因玉米具有非常广阔的应用价值和市场潜力。

[0006] 本发明将抗虫基因表达盒与耐除草剂表达盒串联,使其在转基因玉米中高效表达,兼具抗虫和耐除草剂性状,进一步增强了该产品的应用和经济价值。

[0007] 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,从而导致了转化事件在性状表现上存在差异。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。因此,需要对更多的转化事件进行性状鉴定和筛选,以获得综合性状表现优异,具有商业化前景的优异转化事件。

[0008] 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)。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

[0009] 本发明的目的是提供一种抗虫耐除草剂性状优异且农艺性状优良的玉米转化事件以及用于检测玉米LD05的核酸分子及其检测方法。转基因玉米事件LD05抗虫性状优良并对草铵膦除草剂具有较好的耐受性,且检测方法可以准确快速地鉴定生物样品中是否包含特定转基因玉米事件LD05的DNA分子。

[0010] 为实现上述目的,本发明使用pCAMBIA3300+m2cryAb-vip3A表达载体,通过农杆菌介导的方法转化玉米HiIIB,获得了600多个阳性转化体,经分子检测后,在每一代以玉米自交系郑58作为轮回亲本进行回交得到BC₅F₂代转基因玉米种子。通过抗虫和耐除草剂性状鉴定发现,转化事件LD05是耐除草剂、抗虫性表现优异且农艺性状最好的转化体,能够用来改良玉米的抗虫和耐除草剂性状。

[0011] 为了表征LD05的身份特征,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,或其反向互补序列。

[0012] 进一步地,所述核酸序列包含SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4所示序列,或其反向互补序列。

[0013] 更进一步地,所述核酸序列包含SEQ ID NO:6和/或SEQ ID NO:7所示序列,或其反向互补序列。

[0014] 更进一步地,所述核酸序列包含SEQ ID NO:5所示序列或其反向互补序列。

[0015] 本发明还提供了用于检测玉米转化事件的探针,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反向互补序列。

[0016] 本发明还提供了用于检测玉米转化事件的引物对,其特征在于,所述引物对的扩增产物包含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反向互补序列。

[0017] 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;或者SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示的序列。

[0018] 本发明还提供了用于检测玉米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/或引物对。

[0019] 本发明还提供了检测玉米转化事件的方法,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。

[0020] 本发明还提供了对玉米进行育种的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

[0021] 1) 获得包含上述核酸分子的玉米;

[0022] 2) 将步骤1)所获得的玉米通过花粉培养、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玉米植物、种子、植物细胞、后代植物或植物部分;以及任选地,

[0023] 3) 对步骤2)所获得的后代植物进行抗虫性状和/或除草剂抗性鉴定,并利用上述的方法来检测其中是否存在所述转化事件。

[0024] 进一步的,本发明还提供了利用上述方法获得的玉米植物、种子、植物细胞、后代植物或植物部分制成的制品,包括食品、饲料或工业原料。

[0025] 所述SEQ ID NO:1为转基因玉米事件LD05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跨越了玉米插入位点的左侧翼基因组DNA序列和插入序列的左边界5'末端的DNA序列,包含所述SEQ ID NO:1或其反向互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LD05的存在。所述SEQ ID NO:2为转基因玉米事件LD05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跨越了插入序列的右边界3'末端的DNA序列和玉米插入位点的右侧翼基因组DNA序列,包含所述SEQ ID NO:2或其反向互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LD05的存在。

[0026] 本发明中,所述核酸序列可以为所述SEQ ID NO:3或其反向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或其反向互补序列中5'左侧翼玉米基因组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反向互补于包含完整的所述SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:6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或SEQ ID NO:6或其反向互补序列的扩增产物时,可以诊断转基因玉米事件LD05或其后代的存在。

[0027] 所述SEQ ID NO:3为转基因玉米事件LD05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1092个核苷酸的序列,所述SEQ ID NO:3由622个核苷酸的玉米左侧翼基因组DNA序列(SEQ ID NO:3的核苷酸1-622)、83个核苷酸的pCAMBIA3300+m2cryAb-vip3A

构建体左边界DNA序列 (SEQ ID NO:3的核苷酸623-705) 和387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706-1092) 组成, 包含所述SEQ ID NO:3或其反向互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LD05的存在。

[0028] 所述核酸序列可以为所述SEQ ID NO:4或其反向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或其反向互补序列中3' 右侧翼玉米基因组DNA区域的任何部分的至少11个或更多个连续多核苷酸 (第四核酸序列)。所述核酸序列进一步可以为同源于或反向互补于包含完整的所述SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的所述SEQ ID NO:4的一部分。当第三核酸序列和第四核酸序列一起使用时, 这些核酸序列在产生扩增产物的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:7或其反向互补序列的扩增产物时, 可以诊断转基因玉米事件LD05或其后代的存在。

[0029] 所述SEQ ID NO:4为转基因玉米事件LD05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1681个核苷酸的序列, 所述SEQ ID NO:4由626个核苷酸的抗虫基因的第二表达盒的3' 末端DNA序列 (SEQ ID NO:4的核苷酸1-626)、733个核苷酸的pCAMBIA3300+m2cryAb-vip3A构建体右边界DNA序列 (SEQ ID NO:4的核苷酸627-1359) 和322个核苷酸的玉米整合位点右侧翼基因组DNA序列 (SEQ ID NO:4的核苷酸1360-1681) 组成, 包含所述SEQ ID NO:4或其反向互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LD05的存在。

[0030] 所述SEQ ID NO:5为表征转基因玉米事件LD05的长度为8453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或其反向互补序列即可鉴定为转基因玉米事件LD05的存在。

[0031] 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
	左侧翼玉米基因组	1-622	620
	LB	623-705	83
	CaMV poly(A) signal	706-880	175
	间隔序列	881-886	6
[0032]	<i>bar</i>	887-1438	552
	间隔序列	1439-1482	44
	CaMV 35S promoter (enhanced)	1483-2160	678
	间隔序列	2161-2482	322
	NOS terminator	2483-2735	253
	间隔序列	2736-2751	16
	M2CryAb-VIP3A	2752-7038	4287
	间隔序列	7039-7052	14
[0033]	CaMV 35S promoter	7053-7398	346
	RB	7399-8131	733
	右侧翼玉米基因组	8132-8453	322

[0034] 1: 单位bp。

[0035] 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 IDNO: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、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所述的核苷酸。当选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的核苷酸时,所述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。

[0036] 本发明还提供了一种保护玉米植物免受由除草剂引起的损伤的方法,其特征在于,包括将含有有效剂量草铵膦除草剂施加到种植至少一种转基因玉米植物的大田中,所述转基因玉米植物在其基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第623-8131位核酸序列和SEQ ID NO:2,或者所述转基因玉米植物的基因组中包含SEQ ID NO:5;所述转基因玉米植物具有对草铵膦除草剂的耐受性。

[0037] 本发明还提供了一种保护玉米植物免于昆虫侵袭的方法,其特征在于,包括在靶昆虫的膳食中提供至少一种转基因玉米植物细胞,所述转基因玉米植物细胞在其基因组中依次包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5第623-8131位核酸序列和SEQ ID NO:2,或者所述转基因玉米植物细胞的基因组中包含SEQ ID NO:5;摄食所述转基因玉米植物细胞的靶昆虫被抑制进一步摄食所述玉米植物。

[0038] 在本发明用于检测玉米植物的核酸序列及其检测方法中,以下定义和方法可以更好地定义本发明和指导本领域的普通技术人员实施本发明,除非另作说明,根据本领域普通技术人员的常规的用法来理解术语。

[0039] 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。

[0040] 所述“包含”是指“包括但不限于”。

[0041] 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。

[0042] 术语“基因”是指表达特定蛋白的核酸片段,包括编码序列前的调节序列 (5' 非编码序列) 和编码序列后的调节序列 (3' 非编码序列)。“天然基因”是指天然发现具有其自身调节序列的基因。“嵌合基因”是指不是天然基因的任何基因,其包含非天然发现的调节和编码序列。“内源基因”是指天然基因,所述天然基因位于生物体基因组中它的天然位置。“外源基因”是现存在于生物体的基因组中且原来不存在的外来基因,也指经转基因步骤导入受体细胞的基因。外源基因可以包含插入非天然生物体的天然基因或嵌合基因。“转基因”是通过转化程序已经被引入基因组的基因。植物基因组中重组DNA已被插入的位点可以称为“插入位点”或“靶位点”。

[0043] “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。当该侧翼区位于上游时,其也可以称为“左边界侧翼”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“右边界侧翼”或“3'侧翼”或“3'基因组侧翼区”或“基因组3'侧翼序列”等。

[0044] 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。

[0045] 本发明提供了称为LD05的转基因玉米事件及其后代,所述转基因玉米事件LD05即为玉米LD05,其包括转基因玉米事件LD05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LD05的植物部分,包括但不限于细胞、花粉、胚珠、花、芽、根、茎、叶和来自玉米LD05的产物,例如棉籽、棉籽油、棉衣、棉被、棉絮、棉布和留在玉米作物田间的生物量。

[0046] 本发明转基因玉米事件LD05包含了一个DNA构建体,当其在植物细胞内表达时,所述转基因玉米事件LD05获得抗虫和/或草铵膦除草剂的耐受性。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具有抗虫功能的m2cryAb-vip3A基因,所述M2CryAb-VIP3A蛋白的核酸序列能提高玉米抗虫。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/或组织特异型启动子,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*)Ro1D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。

[0047] 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。

[0048] 所述“草铵膦”是指一种非选择性,广谱高效、低毒有机磷除草剂,强烈抑制细菌和

植物的氨基酸生物合成酶—谷氨酰胺合成酶 (Glutamine Synthetase, GS) 的活性。GS在植物氮同化及氮代谢调节中起重要作用,它是植物中唯一的解毒酶,能解除由硝酸还原作用、氨基酸降解及光呼吸中释放的氨的毒性。用“草铵膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂进行处理。为了达到有效生物学剂量而对某种草铵膦制剂使用率的选择不超过普通农艺技术人员的技能。使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂处理包含了来源于转基因玉米事件LD05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LD05的植物材料的生长或抗虫。

[0049] 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。

[0050] 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。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] 培养具有抗虫特性和对草铵膦除草剂具有耐受性的转基因玉米事件LD05,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LD05及其后代的玉米植物组成,该转基因玉米事件LD05及其后代是通过利用本发明的抗虫和对草铵膦除草剂具有耐受性的表达盒进行转化而得到的,第二亲本玉米植物缺乏抗虫特性或对草铵膦除草剂具有耐受性;然后选择对草铵膦除草剂具有耐受性的子代植株,可以培育出对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植物。这些步骤可以进一步包括使抗虫和草铵膦耐受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(如包含转基因玉米事件LD05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,从而产生抗虫特性和对草铵膦除草剂具有耐受性的玉米植物。

[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,探针与来自转基因玉米事件LD05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LD05或种子还是来源于转基因玉米事件LD05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。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引物是可以常规方法设计出来的,但是,优选的,本发明中的引物与目标序列的连续核酸具有完全的DNA序列同一性。

[0060] 如本文所用,“试剂盒”或“微阵列”是指用于生物样品中玉米转化事件的鉴定和/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。

[0061] 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LD05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和探针。

[0062] 本发明的引物和探针在严格条件下与目标DNA序列杂交。任何常规的扩增方法都可以用于鉴定样品中来源于转基因玉米事件LD05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。

[0063] 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、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7中一个或多个核酸分子或其互补序列,或者上述序列的任一片段发生特异性杂交。更优选地,本发明的一个核酸分子在高度严格条件下与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7中一个或多个核酸分子或其互补序列,或者上述序列的任一片段发生特异性杂交。本发明中,优选的标记物核酸分子具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、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。

[0064] 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、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:3、SEQ ID NO:4、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。

[0065] 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。

[0066] 术语“特异性结合(目标序列)”是指在严格杂交条件下引物仅与包含目标序列的样品中的目标序列发生杂交。

[0067] 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,为了确定玉米植物是否由含有本发明转基因玉米事件LD05通过有性杂交方式产生,或采集自田地的玉米样品是否包含转基因玉米事件LD05,或玉米提取物,例如棉絮、棉籽油是否包含转基因玉米事件LD05,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LD05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LD05也是诊断性的。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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LD05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LD05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。

[0071] 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的玉米基因组区的任何部分同源或反向互补的以及与SEQ ID NO:5的转基因插入区的任何部分同源或反向互补的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LD05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:10和SEQ ID NO:11,其扩增与转基因玉米事件LD05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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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 PY.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。

[0075] 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。

[0076] 基于杂交原理,用于检测来源于转基因玉米事件LD05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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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LD05的DNA,还可以用于培育含有转基因玉米事件LD05的DNA的玉米植物。所述试剂盒可以含有DNA引物或探针,其同源于或反向互补于SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6或7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LD05左侧翼基因组区域,来自农杆菌的左侧边界区域(LB)的一部分插入序列,第一个表达盒是花椰菜花叶病毒的35S启动子(CaMV 35S promoter (enhanced)),可操作地连接到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35S终止子(CaMV poly(A))上而组成;第二个表达盒由花椰菜花叶病毒的35S启动子(CaMV 35S promoter),可操作地连接到抗虫基因m2cryAb-vip3A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,来自农杆菌的右侧边界区域(RB)的一部分插入序列,以及位于转基因插入序列3'末端的玉米LD05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玉米事件LD05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LD05中侧翼玉米基因组的DNA区域的任何部分。

[0080] 转基因玉米事件LD05可以与其他转基因玉米品种组合,例如除草剂(如草铵膦、草甘膦等)耐受性的玉米,或携带抗虫基因的转基因玉米品种。所有这些不同转基因事件的各种组合,与本发明的转基因玉米事件LD05一起育种,可以提供抗虫并抗多种除草剂的改良杂种转基因玉米品种。这些品种相比于非转基因品种和单性状的转基因品种可以表现出抗虫、多种除草剂抗性等更优异的特征。

[0081] 本发明提供了一种用于检测玉米植物的核酸序列及其检测方法,转基因玉米事件LD05具有提高抗虫性状和耐受草铵膦除草剂的作用。该性状的玉米植株表达M2cryAb-vip3A蛋白和膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)蛋白,其赋予植物抗虫和对草铵膦的耐受性。同时本发明检测方法中SEQ ID NO:1或其反向互补序列、SEQ ID NO:2或其反向互补序列、SEQ ID NO:3或其反向互补序列、SEQ ID NO:4或其反向互补序列、SEQ ID NO:6或其反向互补序列、或者SEQ ID NO:7或其反向互补序列可以作为DNA引物或探针以产生诊断为转基因玉米事件LD05或其后代的扩增产物,且可以快速、准确、稳定的鉴定出来源于转基因玉米事件LD05的植物材料的存在。

[0082] 转基因玉米事件LD05的草铵膦耐受能力强,抗虫性状突出。这些特征使得LD05这个转化体可以用来改良玉米的草铵膦除草剂耐受性和抗虫性状,从而培育抗虫耐除草剂的玉米新品种。

[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转基因插入序列与玉米基因组结合部位的结构示意图。

[0085] 图2重组表达载体pCAMBIA3300+m2cryAb-vip3A的物理图谱。各元件英文及缩写含义列举如下:

- [0086] LB 农杆菌的T-DNA左边界序列。
- [0087] CaMV poly(A) 花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S终止子。
- [0088] bar 编码PAT蛋白,解除草铵膦毒性。
- [0089] CaMV 35S promoter(enhanced) 花椰菜花叶病毒的35S启动子,启动目的基因的转录
NOS terminator 胭脂碱合成酶基因的终止子。
- [0090] m2cryAb-vip3A M2cryAb-vip3A蛋白编码基因。
- [0091] CaMV 35S promoter 花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子。
- [0092] RB 农杆菌的T-DNA右边界序列。
- [0093] pVS1 staA pVS1质粒的质粒稳定位点。
- [0094] pVS1 RepA pVS1质粒的复制起始位点。
- [0095] bom pBR322质粒的bom位点。
- [0096] ori pBR322质粒的复制起始位点。
- [0097] kanR 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3LD05事件与对照郑58的抗虫性表现。A:非转基因对照玉米郑58;B:LD05转化事件玉米植株。
- [0099] 图4LD05事件与对照郑58植株的抗草铵膦除草剂的情况。A:0倍剂量下郑58;B:1倍剂量下郑58;C:0倍剂量下LD05;D:1倍剂量下LD05;E:2倍剂量下LD05;F:4倍剂量下LD05。
- [0100] 图5LD05转化事件特异性PCR验证结果。M:Marker,大小标注在旁(单位:bp);N:空白对照;5:阴性对照(郑58和郑单958的混合物)的基因组DNA;1-2:转化事件LD05基因组DNA;3-4:LD05-郑单958基因组DNA。A:左边界PCR片段预期大小554bp;B:右边界PCR片段预期大小1185bp。
- [0101] 图6Southern杂交酶切和探针位置。
- [0102] 图7LD05目的基因m2cryAb-vip3A插入拷贝数的Southern印记杂交图
- [0103] A:HindⅢ酶消化DNA杂交图;B:BamHI酶消化DNA杂交图;C:探针位置及HindⅢ酶切位点;D:探针位置及BamHI酶切位点。下方线段标示探针位置,图片右侧箭头标示外源条带。
- [0104] M:DNA Marker,条带大小标注在旁,单位bp;
- [0105] CK:郑58;
- [0106] 1:阳性对照质粒;
- [0107] 2-6:同载体其他转化体;
- [0108] 7-8;不同世代的转化体LD05。
- [0109] 图8LD05目的基因bar插入拷贝数的Southern印记杂交图
- [0110] A:HindⅢ酶消化DNA杂交图;B:BamHI酶消化DNA杂交图;C:探针位置及HindⅢ酶切位点;D:探针位置及BamHI酶切位点。下方线段标示探针位置,图片右侧箭头标示外源条带。
- [0111] M:DNA Marker,条带大小标注在旁,单位bp;
- [0112] CK:郑58;
- [0113] 1:阳性对照质粒;
- [0114] 2-6:同载体其他转化体;
- [0115] 7-8;不同世代的转化体LD05。

具体实施方式

[0116] 本申请涉及的转化事件LD05是指以玉米Hi IIB为受体经过遗传转化后与玉米自交系郑58杂交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)的玉米植株。在具体实施例中,转基因所用表达载体具有图2所示的物理图谱,所得到的T-DNA插入物具有SEQ ID NO:5的第623-8131位核苷酸所示序列。转化事件LD05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玉米植株。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LD05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。

[0117] 实施例1转化事件的获得和性状鉴定

[0118] M2cryAb-vip3A蛋白是通过人工合成的方法,将Cry1Ab和Vip3Aa蛋白的主要结构域组合而成,Cry1Ab与Vip3Aa对玉米螟、草地贪夜蛾等害虫具有显著的控制作用;bar基因编码膦丝菌素乙酰转移酶,能提高植物对草铵膦除草剂的耐受能力。本发明使用pCAMBIA3300+m2cryAb-vip3A表达载体(载体物理图谱见图2,包含m2cryAb-vip3A基因表达盒和bar基因表达盒),通过农杆菌介导的方法转化受体Hi IIB,获得了600多个阳性转化体,经分子检测后,在每一代以玉米自交系郑58作为轮回亲本进行回交得到BC₅F₂代转基因玉米种子,并对这些转化苗的除草剂耐性、抗虫性和相关农艺性状做了筛选和鉴定。

[0119] 1、筛选抗虫耐除草剂性状优异的转化体

[0120] (1)除草剂抗性筛选

[0121] 以轮回亲本郑58作为参照,通过田间喷施田间推荐浓度中量1倍的草铵膦的方法,筛选除草剂耐性较好的转化体。结果表明,仅11个转化事件对草铵膦除草剂的耐受能力显著高于对照(表2)。

[0122] 表2除草剂耐性表现

剂量	材料	成苗率 (%)	药害率 (%)
[0123]	郑 58	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD01	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD02	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD03	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD04	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD05	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD07	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD09	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD10	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD11	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD12	100.0±0.0 a	0.0 a
	LD16	100.0±0.0 a	0.0 a
	1×	郑 58	0.0 b
LD01		100.0±0.0 a	0.0 b
LD02		100.0±0.0 a	0.0 b
LD03		100.0±0.0 a	0.0 b
LD04		100.0±0.0 a	0.0 a
LD05		100.0±0.0 a	0.0 b
LD07		100.0±0.0 a	0.0 b
LD09		100.0±0.0 a	0.0 b
LD10		100.0±0.0 a	0.0 b
LD11		100.0±0.0 a	0.0 b
LD12		100.0±0.0 a	0.0 b
LD16		100.0±0.0 a	0.0 b

[0124] 数值来自于3个生物学重复的平均值±标准差。统计分析使用LSD进行多重比较 ($\alpha = 0.05$), 不同字母表示相同除草剂浓度下同列数据差异显著性。

[0125] (2) 抗虫性

[0126] 以轮回亲本郑58作为参照, 通过叶片室内生测的方法从上述10个转化事件中筛选抗虫性较好的转化体。使用离体玉米叶片喂食亚洲玉米螟和草地贪夜蛾的初孵幼虫, 评价材料的抗虫性。11个转化体叶片造成的玉米螟和草地贪夜蛾死亡率均显著高于对照(表3), 其中LD02、LD03、LD05、LD09对玉米螟的抗性水平为高抗, 其余为中抗或抗; LD01、LD02、LD03、LD05、LD09、LD10和LD11对草地贪夜蛾的抗性水平为高抗, 其余为中抗或抗。

[0127] 表3室内生测

材料	玉米螟			草地贪夜蛾		
	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)	抗性	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)	抗性
郑 58	3.33±5.7 b	-	感	5.0±1.7 b	-	感
LD01	53.5±1.3 a	51.9	中抗	95.3±3.9 a	95.1	高抗
LD02	98.2±4.9 a	98.1	高抗	99.8±5.5 a	99.8	高抗
LD03	96.4±11.1 a	96.3	高抗	97.2±12.4 a	97.1	高抗
LD04	89.2±8.5 a	88.9	抗	55.2±5.7 a	52.8	中抗
LD05	97.5±10.1 a	97.4	高抗	100.0±4.8 a	100.0	高抗
LD07	77.5±1.0 a	76.7	抗	79.1±10.3 a	78.0	抗
LD09	98.1±18.9 a	98.0	高抗	95.5±9.9 a	95.3	高抗
LD10	90.2±6.3 a	89.9	抗	94.2±11.2 a	93.9	高抗
LD11	88.8±3.2 a	88.4	抗	91.1±3.3 a	90.6	高抗
LD12	76.4±7.7 a	75.6	抗	80.0±4.1 a	78.9	抗
LD16	65.3±5.6 a	64.1	抗	70.5±5.1 a	68.9	抗

[0129] 数值以4个生物学重复的平均值±标准差表示,同列数据的差异显著性采用LSD方法分析($\alpha=0.05$)。

[0130] (3) 农艺性状调查

[0131] 在对几个转化体进行抗性性状鉴定的同时,还对它们的农艺性状(如株高、叶片大小、果穗大小和籽粒重量等)做了详细的记录。在进行数据统计时意外的发现,转化体LD01、LD03、LD04、LD07、LD09、LD10、LD11、LD12和LD16的株高和百粒重均显著低于对照郑58,只有转化体LD02、LD05的农艺性状(株高和百粒重)与对照无显著差异。(表4)表4部分农艺性状调查结果

	材料	株高 (cm)	百粒重 (g)
	郑 58	225.0±5.7 a	38.6±2.5a
	LD01	130.3±6.2 d	26.1±3.3 b
	LD02	224.2±6.5 a	36.9±4.1 a
	LD03	159.4±10.3 b	24.1±3.1 b
	LD04	162.9±8.0 b	27.2±4.0 b
[0132]	LD05	220.8±4.4 a	36.9±4.1 a
	LD07	163.2±6.5 b	23.9±4.5 b
	LD09	144.9±7.5 c	25.9±3.3 b
	LD10	154.5±9.0 bc	27.1±2.2 b
	LD11	164.2±11.5 b	20.3±1.2 c
	LD12	157.3±7.4 b	25.2±4.8 b
	LD16	153.2±6.6 b	23.1±2.2 bc

[0133] 数值来自于3个生物学重复的平均值±标准差。统计分析使用LSD进行多重比较($\alpha=0.05$),不同字母表示相同时期同列数据差异显著性。

[0134] 综合来看,LD02和LD05是耐除草剂、抗虫性表现优异且农艺性状最好的转化体。

[0135] 2、LD05除草剂耐受性和抗虫性的系统鉴定

[0136] 本发明于2022年夏季将玉米转化体LD05和对照轮回亲本郑58的种子播种于山东省济南章丘区龙山办事处党家村黄淮海转基因玉米中试与产业化基地,在田间喷施不同浓度剂量的草铵膦和人工接虫的方式系统的鉴定转化体LD05的除草剂耐受性和抗虫性状。

[0137] (1) 除草剂耐受性鉴定

[0138] 草铵膦喷施时间为播种后18天,分别在喷后1周、2周和喷后4周调查各药害等级植株数(含无药害植株)和株高,结果如表5和图4所示。对照郑58在喷施草铵膦后1周时所有植株均出现4~5级药害,植株大部分死亡,成苗率0.00%,受害率达100.00%;LD05在不同剂量下皆能100.00%成苗,但有一定药害产生,药害率达3.74%~4.24%,2周后药害症状消失;进一步调查其株高表现,不同剂量下转化体株高没有显著性差异。

[0139] 表5LD05对草铵膦除草剂耐受性

药后时间(周)	材料	剂量(倍)	成苗率(%)	受害率(%)	株高(cm)	
[0140]	1	郑 58	1	0.00 b	100.00±0.00 a	-
			0	100.00±0.00 a	0.00 c	60.80±0.69 b
		LD05	0	100.00±0.00 a	0.00 c	67.13±3.42 ab
			1	100.00±0.00 a	0.00 c	63.27±0.76 a
			2	100.00±0.00 a	3.74±1.97 b	65.13±2.19 ab
	2	郑 58	4	100.00±0.00 a	4.24±1.37 b	74.27±3.45 ab
			1	0.00 b	100.00±0.00 a	-
		LD05	0	100.00±0.00 a	0.00 b	110.47±1.17 a
			1	100.00±0.00 a	0.00 b	111.27±1.1 a
			2	100.00±0.00 a	0.00 b	111.47±0.76 a
4	郑 58	4	100.00±0.00 a	0.00 b	110.80±0.80 a	
		1	100.00±0.00 a	0.00 b	109.40±2.62 a	
	LD05	1	0.00 b	100.00±0.00 a	-	
		0	100.00±0.00 a	0.00 b	163.53±2.80 a	
		2	100.00±0.00 a	0.00 b	165.60±0.20 a	
LD05	1	100.00±0.00 a	0.00 b	166.40±2.25 a		
	2	100.00±0.00 a	0.00 b	166.20±2.60 a		
	4	100.00±0.00 a	0.00 b	164.47±2.37 a		

[0141] 数值以3个生物学重复的平均值±标准差表示。0×、1×、2×、4×分别表示喷施草铵膦推荐剂量中量的倍数。同列数据差异显著性分析使用LSD分析比较($\alpha=0.05$)。“-”表示未调查。

[0142] (2) 抗虫性鉴定

[0143] 参照《农业农村部953号公告-10-2007转基因植物及其产品环境安全检测抗虫玉米第1部分:抗虫性》执行。接虫方法及调查方法按照《NY/T 1248.5玉米抗病虫性鉴定技术规范》执行。分别在玉米心叶期和吐丝期人工接虫,接虫2-3周后调查虫害情况。

[0144] 对玉米螟的田间抗性鉴定结果(表6和图3):

[0145] 心叶期调查结果发现,对照郑58的食叶级别为 8.38 ± 0.38 ,虫害级别为7,抗性级别为感,说明该材料为当地感虫材料,本次人工接虫的质量可以满足抗性鉴定要求;同时,LD05的食叶级别为 1.53 ± 0.42 ,显著低于对照。虫害级别为1,抗性级别为高抗。

[0146] 穗期调查结果发现,对照郑58的雌穗被害级别为 6.32 ± 0.36 ,抗性级别为感,说明该材料为当地感虫材料,本次人工接虫的质量可以满足抗性鉴定要求;LD05的雌穗被害级别为 1.54 ± 0.11 ,显著低于对照,抗性级别为高抗。

[0147] 表6LD05对玉米螟的田间抗性鉴定

材料	心叶期		
	食叶级别	虫害级别	抗性级别
LD05	1.53 ± 0.42 b	1	高抗 HR
郑 58	8.38 ± 0.38 a	7	感 S

材料	穗期					龄期
	雌穗被害级别	抗性级别	蛀孔数量(个/株)	虫孔隧道长度(cm/株)	幼虫存活数(头/株)	
LD05	1.54 ± 0.11 b	高抗 HR	0.27 ± 0.02 a	0.01 ± 0.02 b	0.00 b	-
郑 58	6.32 ± 0.36 a	感 S	0.70 ± 0.59 a	4.46 ± 1.33 a	0.14 ± 0.07 a	4-5

[0149] 数值以平均值±标准差表示,同列数据的差异显著性采用t-test方法分析($\alpha=$

0.05)。心叶期转化体接虫15株,对照14株;吐丝期转化体接虫50株,对照22株。

[0150] 对草地贪夜蛾的田间抗性鉴定结果(表7和图3):

[0151] 心叶期调查结果发现,对照郑58的食叶级别为 8.63 ± 0.35 ,虫害级别为7,抗性级别为感,说明该材料为当地感虫材料,本次人工接虫的质量可以满足抗性鉴定要求;而LD05的食叶级别为 1.13 ± 0.15 ,显著低于对照。转化体虫害级别为1,抗性级别为高抗。

[0152] 穗期调查结果发现,对照郑58的雌穗被害级别为 6.40 ± 0.28 ,抗性级别为感,说明该材料为当地感虫材料,本次人工接虫的质量可以满足抗性鉴定要求;而LD05的食叶级别为 1.47 ± 0.47 ,显著低于对照,抗性级别为高抗。

[0153] 表7草地贪夜蛾田间生测

材料	心叶期			穗期	
	食叶级别	虫害级别	抗性级别	雌穗被害级别	抗性级别
[0154] LD05	1.13±0.15 b	1	高抗 HR	1.47±0.47 b	高抗 HR
郑 58	8.63±0.35 a	7	感 S	6.40±0.28 a	感 S

[0155] 数值以平均值±标准差表示,同列数据的差异显著性采用t-test方法分析($\alpha=0.05$)。心叶期转化体接虫50株,对照19株;吐丝期转化体接虫70株,对照10株。

[0156] 田间鉴定结果表明,转化体LD05可以耐受4倍田间推荐剂量中剂量的草铵膦,对玉米螟和草地贪夜蛾均可以达到高抗级别,且株高等农艺性状与对照没有显著差异。因此,LD05这个转化体可以用来改良玉米的草铵膦除草剂耐受性和抗虫性状,从而培育抗虫耐除草剂的玉米新品种。

[0157] 实施例2转化事件LD05分子特征鉴定

[0158] 为了进一步明确转化事件LD05的身份特征,本发明对LD05外源序列在玉米基因组上插入位点的侧翼序列和插入拷贝数进行了分析。

[0159] 1、外源序列在玉米基因组上的插入位点侧翼序列分析

[0160] 取100mg植株叶片,液氮快速研磨后采用CTAB法提取总DNA。采用TAIL-PCR分离T-DNA区序列在基因组中的插入位置。利用左边界的三对特异引物和简并引物(表8)进行PCR,将PCR产物进行测序,得到了左边界的侧翼序列。再根据插入位点上下游基因组序列与T-DNA左右边界序列设计引物,进行PCR扩增,对扩增产物测序验证。

[0161] 试验所用引物如下:

[0162] 表8简并引物和左边界特异引物

引物名称	序列 (5'-3')	作用
[0163] LC0719	GCTCACGATGGACTGCTGAGTGGC ACCTGVNVNNGGAA	通用长简并引物 AD1
LC0723	GAGCTCACGATGGACTGC	通用引物 AC0
LC0724	CGATGGACTGCTGAGTA	通用引物 AC1
LC0895	CTCGATGTAGTGGTTGACGATGGTG	LB 特异性引物 LB-SP1
LC0896	CGATGGACTGCTGAGTAGGCACCT GTACACCCACCTGCTGAAGT	LB 特异性引物 LB-SP2
LC0897	TCCTGCCCGTCACCGAGAT	LB 特异性引物 LB-SP3

[0164] 将测序结果分别与参考基因组和外源T-DNA序列进行比对,获得外源插入片段插入位置信息。随后,在插入位点左右边界处的基因组侧翼序列和外源插入序列上分别设计正向和反向引物,通过PCR扩增的方法对插入位点进行了验证,并对PCR产物进行了测序分析。结果显示,转化体LD05的外源片段正向插入玉米基因组chr 6:150747133-150747159bp

之间。

[0165] 随后,在插入位点的左边界,截取基因组上插入位点的上游1000bp及T-DNA序列上1000bp,右边界则取基因组插入位点下游1000bp及T-DNA序列上1000bp,利用NCBI网站的Primerblast软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)对截取的序列进行引物设计,扩增产物融合一部分玉米基因组序列和一部分T-DNA序列。

[0166] 以转基因玉米株系基因组DNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应在20 μ L体系中进行。扩增循环程序为:94 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性30s,退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸一定时间(按产物片段大小设置),35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。

[0167] 根据侧翼序列和插入位置的结果利用基因组上游引物(SEQ ID NO:8)与载体左边界引物(SEQ ID NO:9)扩增以及载体右边界引物(SEQ ID NO:10)与基因组下游引物(SEQ ID NO:11)对LD05转化事件进行PCR扩增,以验证外源片段插入位置。结果见图5。结果证明LD05外源片段稳定插入到玉米基因组chr 6:150747133-150747159bp位置处。进一步通过重叠PCR扩增和测序分析,获得插入序列和上下游基因组侧翼序列片段,序列组装如图6所示。序列分析结果显示,插入序列大小为7509bp。

[0168] 通过分析左右侧翼的边界序列可知,外源序列的插入造成了玉米基因组25bp的序列删除,同时载体的左边界序列缺失17bp,右边界序列缺失25bp。

[0169] 2、外源序列的插入拷贝数分析

[0170] 采用Southern印记杂交的方法确定外源序列拷贝数。Southern杂交检测中选取在T-DNA区上且不在杂交区域的两个限制性内切酶消化基因组DNA,则基因组中每个插入拷贝杂交后将显示为一个单一且特异的条带,基因组DNA经过限制性内切酶酶切后,选取待测区域作为探针进行Southern印记杂交实验。

[0171] Southern杂交选取BamHI和Hind III两种酶消化阳性对照质粒、对照郑58以及LD05基因组DNA,并选择目的基因m2cryAb-vip3A和bar的序列片段作为探针,探针和酶切位置示意图见图6。探针引物的具体序列见表9。

[0172] 表9Southern杂交实验所用探针

引物	序列 (5'-3')	载体位置	扩增大小 ¹	用途
[0173] LC0797	ATCTCGTCCAGCGTCAGGT	4367-4385	958	检测 <i>m2cryAb-vip3A</i> 基因
LC0798	TCAACATCGGCATCAACAA	5306-5324		
LC0234	CTGAAGTCCAGCTGCCAGAA	330-349	506	检测 <i>bar</i> 基因
LC0235	ATGAGCCAGAACGACGC	818-835		

[0174] 1:单位bp。

[0175] 目的基因m2cryAb-vip3A的插入拷贝数杂交检测选取BamHI和Hind III两种限制性内切酶,分别酶切阳性对照质粒、阴性对照郑58基因组DNA和LD05基因组DNA。跑胶转膜后用m2cryAb-vip3A基因探针标记,杂交结果见图7A、B所示。外源基因m2cryAb-vip3A的探针位置及限制性内切酶BamHI和Hind III的酶切位点如图7C所示。从杂交结果看,m2cryAb-vip3A基因为单拷贝插入玉米基因组。

[0176] 目的基因bar的插入拷贝数杂交检测选取BamHI和Hind III两种限制性内切酶,分别酶切阳性对照质粒、阴性对照郑58基因组DNA和LD05转化体基因组DNA。跑胶转膜后用bar基因探针标记,杂交结果见图8A、B所示。目的基因bar的探针位置及限制性内切酶BamHI和Hind III的酶切位点如图8C所示。bar基因也为单拷贝插入玉米基因组。

[0177] 实施例3利用转化事件LD05产生抗虫耐除草剂玉米植株的方法

[0178] 通过前期试验发现转化事件LD05的抗性及其他农艺性状都很优良,故可用该事件快速转育改良生产上应用所属同一类群的骨干亲本,以提高这些骨干亲本的抗虫和除草剂耐受性。以玉米自交系郑58为实例进行快速改良的具体方法为:2020年开始做杂交获得F₁,然后与郑58回交3代,再自交2代以上,每一代通过对靶标害虫抗性或草铵膦耐受性下进行选择,再结合其他农艺性状选择优良单株和穗行留种,直至获得性状稳定纯合的LD05-郑58。

[0179] 此外,转化事件LD05可以直接组配杂交组合,抗虫耐除草剂转基因玉米LD05-郑单958是以昌7-2为父本,以转化事件LD05为母本直接组配而成,LD05-郑单958在保留原有优良性状的基础上增加了抗虫和耐草铵膦性状(表10)。

[0180] 利用本发明提供的方法不仅可以在亲本改良和杂交组合组配过程中对LD05进行检测,以为品种的选育提供分子辅助手段,也可以用来鉴定玉米品种中是否含有LD05转化事件。以下方法为鉴定LD05的具体实例。

[0181] 对抗虫耐除草剂转基因玉米新组合LD05-郑单958进行分子检测,以确认这些材料中包含转化事件LD05。根据基因序列设计PCR引物对,通过检测转化事件左右两个边界的存在以确定转化事件LD05的存在。

[0182] 其中一个检测方法为:利用PCR方法对LD05-郑单958回交转育获得的玉米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:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11,PCR反应体系:

	10×PCR Buffer	2 μL
	dNTP (10 mmol/L)	0.5 μL
	正向引物 (10 μM)	0.5 μL
[0183]	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

[0184] 反应程序为:

[0185] 94℃,5min;(94℃,30sec;55℃,30sec;72℃,60sec)×35循环;72℃,5min;4℃,5min。

[0186] 取PCR产物于1% (w/v) 1×TAE琼脂糖凝胶中电泳检测,结果见图5。LD05转化事件中可以扩增得到预期的目标条带(分别为SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7)。而且该PCR方法能够追踪转化事件的存在,从而应用于育种工作。

[0187] 表10抗虫性(玉米螟和草地贪夜蛾)和除草剂耐受性鉴定

	材料	玉米螟室内生测校正死亡率 (%)	草地贪夜蛾室内生测校正死亡率 (%)	1倍除草剂受害率 (%)
[0188]	LD05-郑单 958	100.00a	100.00a	0.00 b
	郑单 958	0.00 b	0.00 b	100.00a

[0189] 数值以平均值±标准差表示,同列数据的差异显著性采用t-test方法分析(α=

0.05)。

[0190] 实施例4转化事件LD05的检测方法

[0191] 可由转基因玉米事件LD05育成的新品种并生产农产品或商品。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玉米事件LD05材料在所述农产品或商品中存在的核苷酸序列。所述农产品或商品包括但不限于玉米油、玉米面、玉米粉、玉米糊、淀粉以及其他调味品或作为食物源供动物消费的任何其它食品、或者化妆品、工业用品等。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所示的转基因玉米事件LD05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和SEQ ID NO:7中所示的序列,以诊断转基因玉米事件LD05的存在。

[0192] 综上所述,本发明转基因玉米事件LD05可提高植物抗虫性并对草铵膦除草剂具有较高的耐受性,而且可将其用于改良其他玉米种质、创制新的玉米杂交组合。其检测方法可以准确快速的鉴定生物样品中是否包含转基因玉米事件LD05的DNA分子。

[0193] 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。

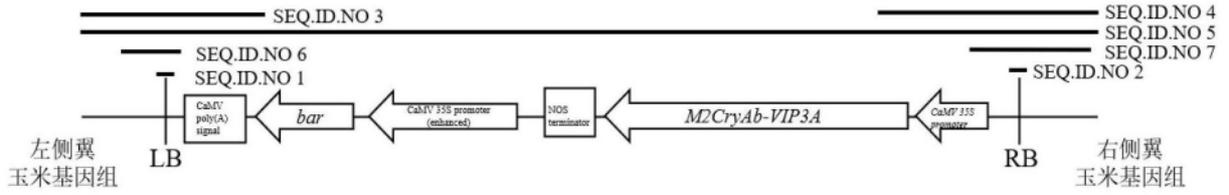


图1

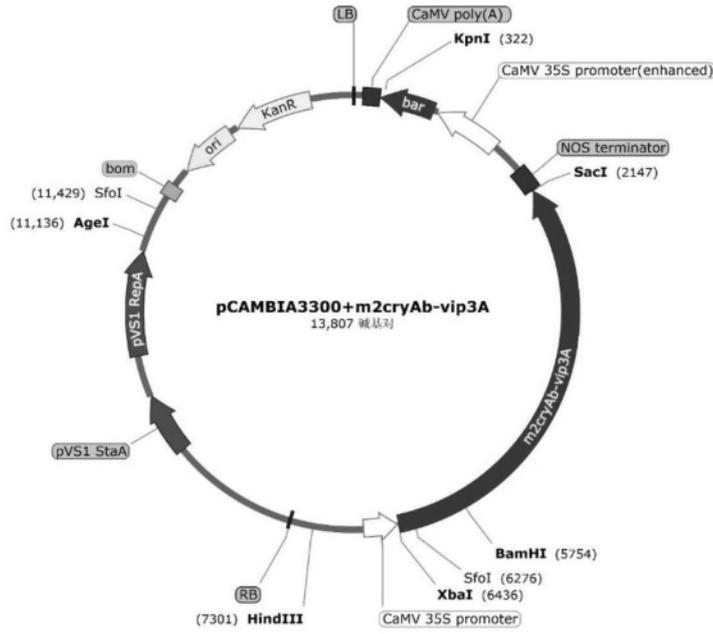


图2

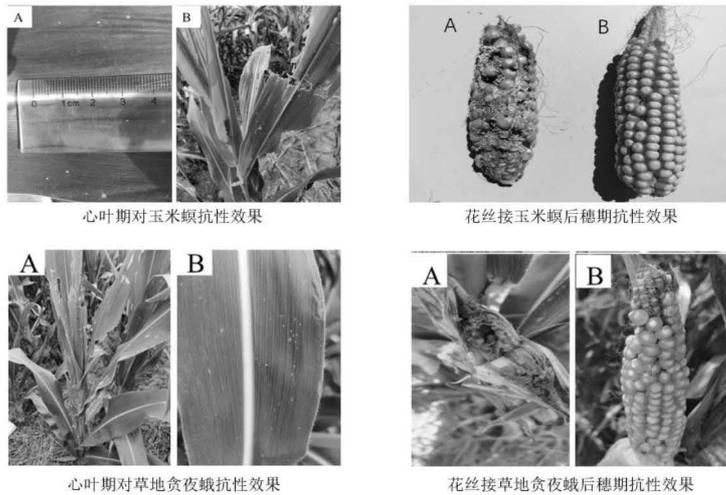


图3

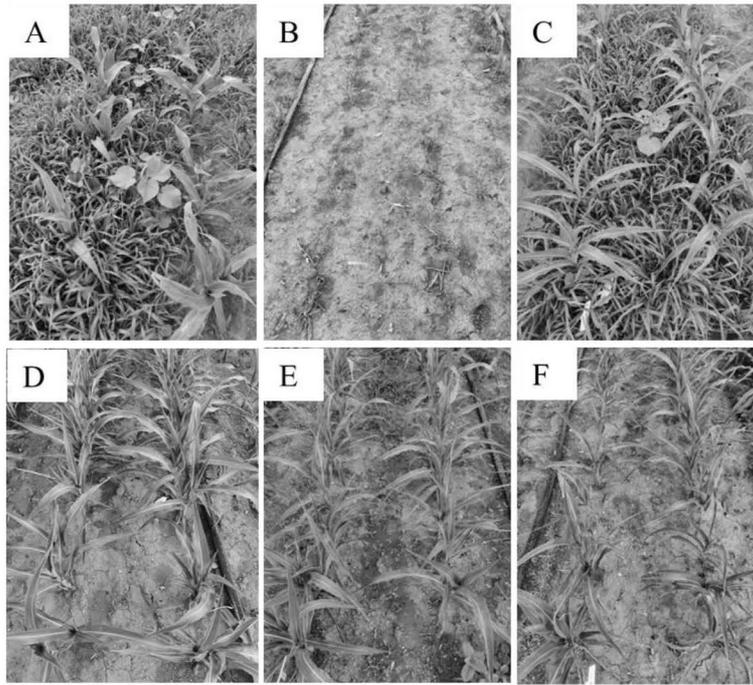


图4

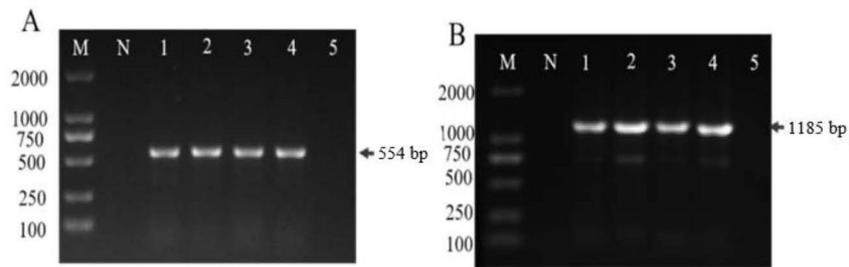


图5

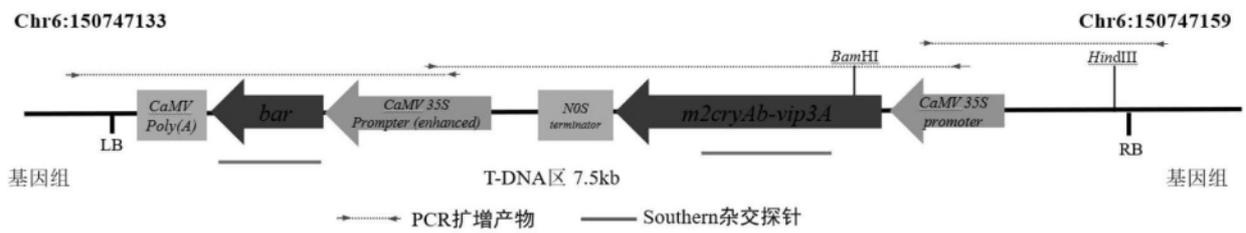


图6

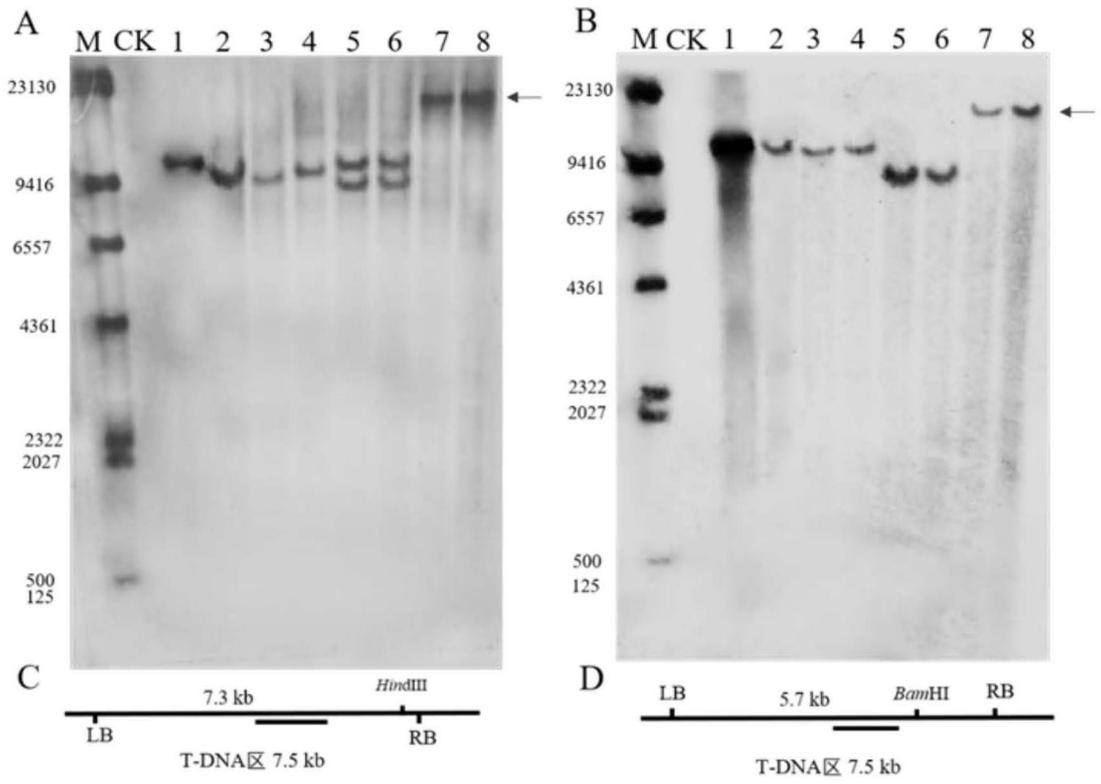


图7

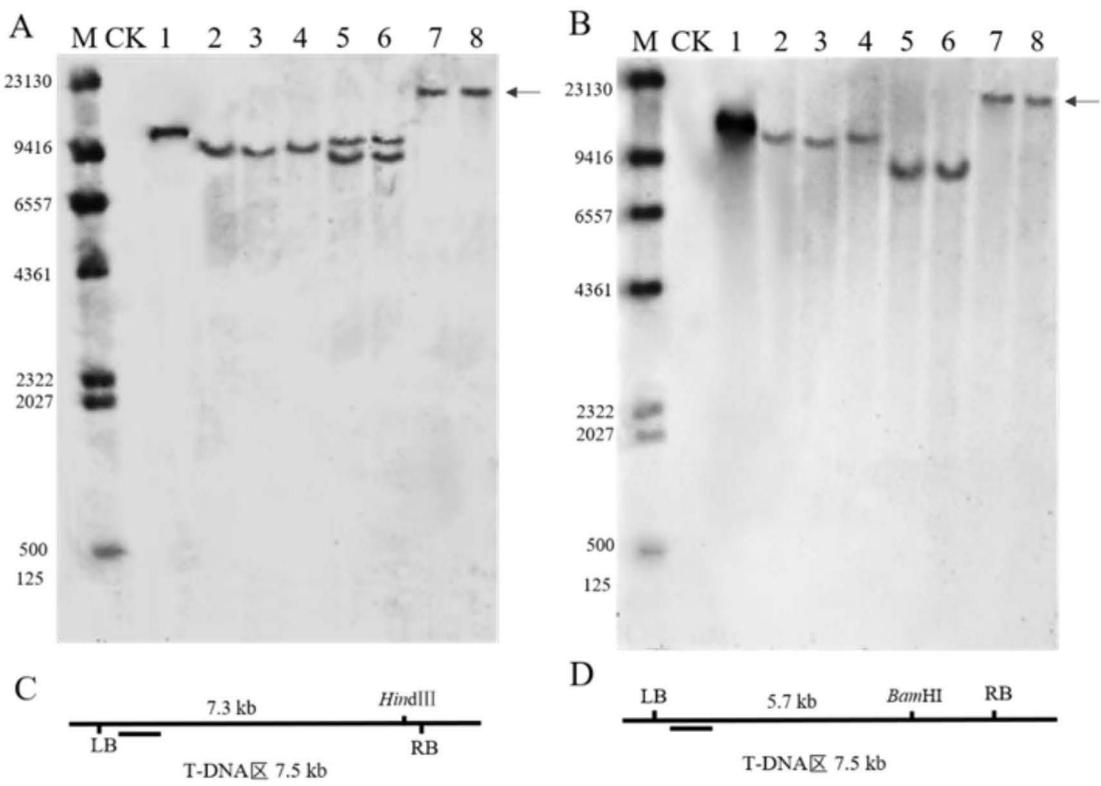


图8