



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0044388
(43) 공개일자 2014년04월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7003370
- (22) 출원일자(국제) 2012년07월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년02월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/046706
- (87) 국제공개번호 WO 2013/010094
국제공개일자 2013년01월17일
- (30) 우선권주장
61/507,444 2011년07월13일 미국(US)
61/515,634 2011년08월05일 미국(US)

- (71) 출원인
다우 아그로사이언시즈 엘엘씨
미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330
엠에스 테크놀로지스 엘엘씨
미국 52656 아이오와주 웨스트 포인트 애비뉴 디 103
- (72) 발명자
호프먼 토머스
미국 46077 인디애나주 자이언스빌 킹스버리 웨이 6526
파크허스트 던 마리
미국 46123 인디애나주 에이번 암스테르담 코트 7844
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김영, 양영준

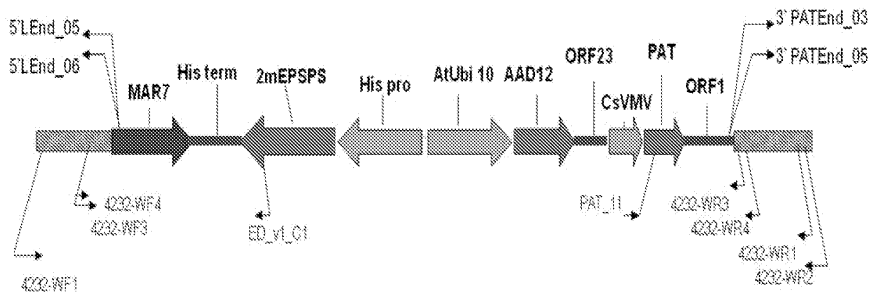
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **집적된 제초제 내성 이벤트 8 2 6 4. 4 2. 3 2. 1, 관련 트랜스제닉 대두 식물주, 및 그의 검출**

(57) 요약

본 발명은 대두 이벤트 (event) pDAB8264.42.32.1에 관한 것이고, 글리포세이트, 아릴옥시알카노에이트, 및 글루포시네이트 제초제에 대한 저항성을 부여하는 다중 형질을 포함하는 신규한 발현 카세트 및 트랜스제닉 (transgenic) 삽입체를 포함한다. 본 발명은 또한 부분적으로, 저항성 잡초, 식물 육종 및 제초제 내성 식물을 제어하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 이벤트 서열은 예를 들어 다른 제초제 내성 유전자(들) 및/또는 곤충-억제성 단백질을 비롯한 다른 형질과 "집적(stack)"될 수 있다. 본 발명은 추가로 부분적으로 대두 및 관련 식물 물질에서 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 검출을 위한 중점 TAQMAN PCR 검정에 관한 것이다. 일부 실시양태는 식물 물질의 고처리량 접합성 분석을 수행할 수 있고, 다른 실시양태는 본 발명의 이벤트를 포함하는 대두 식물주의 접합성을 특유하게 확인하고 상기 대두 식물주를 재배하기 위해 사용될 수 있다. 이들 검정을 수행하는데 유용한 키트 및 조건을 또한 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

조우 닝

미국 46077 인디애나주 자이언스빌 페블포인트 패
스 4776

파레디 데야카

미국 46033 인디애나주 카멜 우드바인 드라이브
665

쿠이 원싱 코리

미국 46032 인디애나주 카멜 로열 새들 드라이브
13736

바드 네이쎈

미국 53703 위스콘신주 매디슨 엘리자베스 스트리
트 1225

틀레도 샌드라 그레이스

미국 47906 인디애나주 웨스트 라파에트 다트머스
코트 3160

브래드피쉬 그레고리 앨런

미국 46033 인디애나주 카멜 제이티 레인 14572

헬드 브루스

미국 50014 아이오아주 에임즈 클레멘스 블러바드
5326

세카 바이셀링엄

미국 50014 아이오아주 에임즈 웨섹스 드라이브
2901

왕 양

미국 50131 아이오아주 존스턴 엔 더블유 50 스트
리트 6104

클라크 로렌

미국 46075 인디애나주 화이스타운 센트럴 블러바
드 6150 아파트먼트 105

러셀 션 마이클

미국 46032 인디애나주 카멜 라크스퍼 레인 11574

스미쓰 켈리 앤

미국 46052 인디애나주 레버넌 이스트 729 노쓰
750

라이트 데리 알

미국 46074 인디애나주 카멜 채리티 체이스 서클
14162

특허청구의 범위

청구항 1

서열 1 및 서열 2를 포함하는 대두 게놈 DNA의 절편에 트랜스제닉 삽입체를 포함하는 트랜스제닉 대두 식물.

청구항 2

아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection; ATCC)에 기탁 번호 PTA-11993으로 기탁된 전형적인 종자에 존재하는 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 게놈을 포함하는 대두 종자.

청구항 3

제1항에 따른 식물의 대두 종자로서, 상기 절편에 상기 트랜스제닉 삽입체를 포함하는 대두 종자.

청구항 4

제2항에 따른 종자를 성장시킴으로써 생성되고, 서열 1 및 서열 2를 포함하는 대두 게놈 DNA의 절편에 트랜스제닉 삽입체를 포함하는 대두 식물.

청구항 5

이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는, 제4항에 따른 대두 식물의 자손체 식물.

청구항 6

제1항에 따른 대두 식물의 제초제-내성 자손체 식물로서, 상기 절편에 제초제 내성 유전자를 포함하는 자손체 식물.

청구항 7

서열 1 및 서열 2를 포함하는 대두 게놈 DNA의 절편 내로 삽입된, 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중성 폴리뉴클레오티드를 제조하는 것을 포함하는, 대두 식물에 대한 발현 카세트를 제조하는 방법.

청구항 8

꽃가루, 배주, 꽃, 싹, 뿌리, 및 잎으로 이루어지는 군 중에서 선택되고, 트랜스제닉 삽입체를 포함하는 제4항에 따른 식물의 일부.

청구항 9

적어도 15개의 뉴클레오티드를 포함하고, 엄격한 세척 조건 하에서 서열 1 및 서열 2로 이루어지는 군 중에서 선택되는 핵산 서열과 혼성화를 유지하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 10

서열 3 내지 21로 이루어지는 군 중에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

도입유전자를 대두 게놈의 DNA 절편 내로 삽입하는 것을 포함하고, 상기 DNA 절편은 서열 1을 포함하는 5' 말단부 및 뉴클레오티드 잔기 서열 2를 포함하는 3' 말단부를 포함하는 것인, 대두 게놈의 변형 방법.

청구항 12

서열 1 및 서열 2를 포함하는 대두 게놈 DNA의 절편 내에 트랜스제닉 삽입체를 포함하는 제1 대두 식물을 제2 대두 식물과 교배하여 게놈을 포함하는 제3 대두 식물을 생성하고, 상기 게놈 내의 상기 절편 내의 상기 트랜스제닉 삽입체의 존재에 대해 상기 제3 대두 식물을 검정하는 것을 포함하는, 대두 식물의 육종 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 방법이 제초제 내성 형질을 상기 대두 식물 내로 유전자 이입하기 위해 사용되고, 상기 제1 대두 식물은 서열 19 및 서열 20을 포함하고, 상기 제3 대두 식물은 상기 계놈 내의 서열 19 및 서열 20 중의 적어도 하나의 존재에 대해 검정되는 방법.

청구항 14

아릴옥시알카노에이트, 글리포세이트, 비알라포스, 포스피노트리신 또는 글루포시네이트 제초제 중 적어도 하나를 제1항에 따른 식물을 포함하는 재배지에 적용하는 것을 포함하고, 상기 트랜스제닉 삽입체는 서열 18의 잔기 1247 내지 11507을 포함하는 것인, 잡초의 방제 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제초제가 동시에 및/또는 순차적으로 선택되고 적용되는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 아릴옥시알카노에이트 제초제가 2,4-D; 2,4-DB; MCPA; 및 MCPB로 이루어지는 군 중에서 선택되는 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 제초제를 상기 재배지에 적용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가의 제초제가 디캄바인 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 방법이 제초제(들)의 적용 14일 이내에 종자를 재배지에 식재하는 것을 포함하고, 상기 식물이 상기 종자로부터 성장하는 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제초제가 동일한 성장 시기 내에 적용되는 방법.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제초제가 상기 식물의 상부 상에 적용되는 것인 방법.

청구항 22

서열 18, 서열 19, 및 서열 20을 포함하는 핵산 분자와 적어도 95% 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 안정하게 형질전환된 쌍떡잎 식물.

청구항 23

제22항에 있어서, 쌍떡잎 식물이 글리신 맥스 (*Glycine max*)인 안정하게 형질전환된 쌍떡잎 식물.

청구항 24

제1항에 따른 식물로부터 생산된 가루 (meal) 또는 오일 생성물.

청구항 25

제1항에 있어서, 대두 식물이 아릴옥시알카노에이트 제초제, 글리포세이트 제초제, 및 글루포시네이트 제초제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 제초제에 저항성이고, 상기 트랜스제닉 삽입체는 서열 18의 잔기 1247 내지 11507을 포함하는 것인 대두 식물.

청구항 26

서열 1 및 서열 2에 인접하거나 서열 1 및 서열 2를 포함하는 유전자좌에서 염색체 15 내로 트랜스제닉 방식으로 삽입된 발현 카세트를 포함하고, 상기 발현 카세트는

- a. 글리포세이트 제초제 내성 유전자를 발현하는 제1 식물 전사 단위;
- b. 아릴옥시알카노에이트 제초제 내성 유전자를 발현하는 제2 식물 전사 단위; 및
- c. 글루포시네이트 제초제 내성 유전자를 발현하는 제3 식물 전사 단위를 포함하는 것인 식물 세포.

청구항 27

서열 19의 잔기 1246 및 1247, 또는 서열 20의 잔기 176 및 177을 포함하는 pDAB8264.42.32.1의 연결 서열에 특이적으로 결합하거나 상기 연결 서열을 증폭하는 프로브 또는 적어도 하나의 프라이머를 사용하여, ATCC 기탁 번호 PTA-11993 하에 기탁된 종자에 존재하는 상기 연결 서열을 검출하는 것을 포함하는, 샘플에서 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 확인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 방법이 적어도 2개의 프라이머를 이용하는 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 상기 샘플에 존재하는 핵산으로부터 DNA 단편을 증폭하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 상기 제1 프라이머는 서열 18 내의 삽입체 서열 또는 그의 상보체에 특이적으로 결합하고, 제2 프라이머는 서열 1 및 서열 2로 이루어지는 군 중에서 선택되는 인접 서열 내의 서열에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 29

5' 인접 대두 게놈 DNA 및 3' 인접 대두 게놈 DNA에 인접하는 도입유전자 구축물을 포함하는, ATCC 기탁 번호 PTA-11993 하에 기탁된 종자에 존재하는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 대두 식물의 이벤트 접합성을 결정하는 방법으로서,

상기 대두 식물로부터 게놈 DNA의 DNA 샘플을 얻고;

상기 DNA 샘플을

- a. 제1 이벤트 프라이머 및 제2 이벤트 프라이머 - 상기 제1 이벤트 프라이머는 상기 도입유전자 구축물에 특이적으로 결합하고, 상기 제2 이벤트 프라이머는 상기 5' 대두 게놈 인접 DNA 또는 상기 3' 대두 게놈 인접 DNA에 특이적으로 결합하고, 상기 제1 이벤트 프라이머 및 상기 제2 이벤트 프라이머는 TAQMAN PCR 조건에 적용될 때 이벤트 앰플리콘을 생성함,
- b. TAQMAN PCR 조건에 적용될 때 내인성 대두 참조 유전자로부터 참조 앰플리콘을 생산하는 참조 전방향 프라이머 및 참조 역방향 프라이머,
- c. 상기 이벤트 앰플리콘과 혼성화하는 형광 이벤트 프로브,
- d. 상기 참조 앰플리콘과 혼성화하는 형광 참조 프로브

와 접촉시켜 접촉된 샘플을 생산하고;

상기 접촉된 샘플을 형광-기반 중점 TAQMAN PCR 조건에 적용하고;

상기 이벤트 앰플리콘에 혼성화된 상기 형광 이벤트 프로브를 정량하고;

상기 참조 앰플리콘에 혼성화된 상기 형광 참조 프로브를 정량하고;

혼성화된 형광 이벤트 프로브의 양을 혼성화된 형광 참조 프로브와 비교하고;

혼성화된 형광 이벤트 프로브 및 혼성화된 형광 참조 프로브의 형광 비율을 비교함으로써 pDAB8264.42.32.1의 접합성을 결정하는 것

을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 5' 인접 DNA가 서열 1을 포함하고, 상기 3' 인접 DNA가 서열 2를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 제2 이벤트 프라이머가 서열 21에 결합하는 것인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 참조 유전자가 서열 15, 서열 16, 및 서열 17로 이루어지는 군 중에서 선택되는 서열을 포함하거나 이 서열에 혼성화하는 것인 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 이벤트 프로브가 서열 14를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제29항에 있어서, 상기 이벤트 프라이머가 서열 12 및 서열 13인 방법.

청구항 35

제29항에 있어서, 상기 이벤트 프라이머가 서열 12 및 서열 13으로 이루어지고, 상기 참조 프라이머가 서열 15 및 서열 16으로 이루어지고, 상기 이벤트 프로브가 서열 14로 이루어지고, 상기 참조 프로브가 서열 17로 이루어지는 것인 방법.

청구항 36

제29항에 따른 방법을 수행하기 위한, 상기 제1 이벤트 프라이머, 상기 제2 이벤트 프라이머, 상기 참조 전방향 프라이머, 상기 참조 역방향 프라이머, 상기 이벤트 프로브, 및 상기 참조 프로브를 포함하는 키트.

청구항 37

서열 1, 서열 2, 서열 18, 서열 19, 서열 20, 및 그의 상보체로 이루어지는 군 중에서 선택되는 서열과 적어도 95% 동일한 단리된 폴리뉴클레오티드.

명세서

기술분야

[0001] <관련 출원에 관한 교차 참조>

[0002] 본원은 2011년 7월 13일자 출원된 미국 특허 가출원 61/507,444 및 2011년 8월 5일자 출원된 61/515,634의 35 U.S.C § 119(e) 하의 이익을 주장한다. 이들 출원은 그 전문을 모든 목적으로 본원에 참조로 포함된다.

배경기술

[0003] 글리포세이트 (N-포스포노메틸글리신, 광범위 제초제)는 5-에놀피루빌시킴에이트-3-포스페이트 합성효소 (EPSPS) (식물 세포 내에서 필수 방향족 아미노산을 생산하는 시킴산 대사 경로의 효소)를 억제한다. EPSPS의 억제는 단백질 합성을 효과적으로 파괴하고, 이에 따라 영향을 받은 식물 세포를 치사시킨다. 글리포세이트는 식물 세포에 비-선택적이기 때문에 잡초 및 작물 식물을 모두 치사시킨다. 따라서, 이것은 작물 식물을 글리포세이트에 저항성이 되도록 변형시켜 목적하는 식물이 글리포세이트에 대한 노출에서 생존하도록 할 수 있을 때 농업 생산에서 유용하다.

[0004] 글리포세이트-저항성인 돌연변이체 EPSP 합성효소를 단리하는 데에는 재조합 DNA 기술이 사용되고 있다. 그러한 글리포세이트-내성 돌연변이체 EPSP 합성효소는 식물 내로 형질전환되고, 형질전환된 식물에 글리포세이트-저항성을 부여할 수 있다. 예로서, 글리포세이트 내성 유전자는 미국 특허 5,633,435에 설명된 바와 같이 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 균주 CP4로부터 단리되었다. 상기 문헌 및 인용된 모든 문헌은 본원에 참조로 포함된다.

- [0005] 다른 글리포세이트 내성 유전자는 돌연변이의 도입을 통해 생성되었다. 이들은 미국 특허 5,094,945, 4,769,061 및 4,535,060에 기재되고 코메이 (Comai)에 의해 단리된 AroA 유전자를 포함한다. 미국 특허 5,310,667에 설명된 바와 같이, 아미노산 위치 80 내지 120에서 알려진 잔기를 글리신 잔기로 치환함으로써 단일 돌연변이체가 활용되었다. 이중 돌연변이체는 미국 특허 6,225,114 및 5,866,775에 설명되었으며, 여기서는, 상기 돌연변이에 추가로, 제2 돌연변이 (위치 170 내지 210에서 알려진 잔기를 트레오닌 잔기로 치환함)가 야생형 EPSPS 유전자 내로 도입되었다.
- [0006] 다른 연구에서는 젠뱅크 (GenBank) 기탁 번호 X63374에 의해 코딩된 아미노산 서열의 잔기 102 (트레오닌을 이소류신으로 변화시킴) 및 잔기 106 (프롤린을 세린으로 변화시킴)에서 돌연변이를 보유하는 변형된 옥수수 EPSPS 유전자의 도입을 통해 글리포세이트 저항성 옥수수를 생산하였다. 미국 특허 6,566,587 및 6,040,497을 참조한다.
- [0007] 대두에서 글리포세이트에 대한 저항성을 제공하는 이벤트 (event)의 예는 대두 이벤트 GTS 40-3-2 (Padgett et al. 1995) 및 대두 이벤트 MON89788 (미국 특허 7,608,761)를 포함한다.
- [0008] 글리포세이트 내성 작물 재배 시스템의 광범위한 채택 및 글리포세이트의 사용 증가는 최근에 글리포세이트-저항성 및 방제가 어려운 잡초가 널리 퍼지는데 기여하였다. 재배자가 글리포세이트 저항성 잡초 또는 방제가 보다 어려운 잡초 종으로의 전환에 직면하는 지역에서, 재배자는 방제시에 놓친 잡초를 방제할 다른 제조제와의 탱크 혼합 또는 교대 적용에 의해 글리포세이트의 제조제 스펙트럼의 갭을 보충할 수 있다.
- [0009] 제조제 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D)은 글리포세이트에 내성 또는 저항성일 수 있는 활엽수 또는 쌍떡잎 잡초의 스펙트럼을 확장할 것으로 기대되는 글리포세이트와 함께 사용될 수 있다. 60년 초과 기간 동안 제조제로서 사용되어온 2,4-D는 매우 광범위한 일년생, 이년생, 및 다년생 활엽수 잡초에 대한 넓은 스펙트럼의 발아 후 방제를 제공한다. 옥수수, 대두 및 면화에서, 2,4-D (560 - 1120 g ae/ha 살포량)는 다음을 포함하는 핵심적인 잡초를 방제한다: 돼지풀 (*Ambrosia artemisiifolia*), 단풍잎돼지풀 (*Ambrosia trifida*), 도꼬마리 (*Xanthium strumarium*), 명아주 (*Chenopodium album*), 해바라기 (*Helianthus annuus*), 이포모메아 (*Ipomoea*) 종, 어저귀 (*Abutilon theophrasti*), 망초 (*Conyza canadensis*), 및 결명자 (*Senna obtusifolia*). 2,4-D는 다음을 포함하는 몇몇의 핵심적인 잡초의 부분적인 방제를 제공한다: 폴리고눔 펜실바니쿰 (*Polygonum pensylvanicum*), 폴리고눔 페르시카리아 (*Polygonum persicaria*), 시르시움 아르벤세 (*Cirsium arvense*), 타락사쿰 오피시날레 (*Taraxacum officinale*), 및 아마란투스 루디스 (*Amaranthus rudis*), 및 긴이삭비름 (*Amaranthus palmeri*)을 포함하는 비름 (*Amaranthus*) 종.
- [0010] 2,4-D의 추가 사용에 대한 제한은 대두 또는 면화와 같은 쌍떡잎 작물에 대한 그의 선택도가 매우 불량하다는 점이고, 따라서 2,4-D는 민감한 쌍떡잎 작물에 일반적으로 사용되지 않는다 (일반적으로 그 근처에도 사용되지 않는다). 추가로, 초본 작물에 대한 2,4-D의 사용은 발생할 수 있는 작물 손상의 특성 때문에 다소 제한된다. 글리포세이트와 조합하여 2,4-D는 무경간 (no-till) 대두 및 면화의 식재 전에 보다 안정적인 고사 (burndown) 처리를 제공하기 위해 사용되었지만; 이들 쌍떡잎 종의 2,4-D에 대한 민감성 때문에, 이들 고사 처리는 적어도 적어도 식재 14-30일 전에 실시되어야 한다 (Agrilience, 2005).
- [0011] 2,4-D를 분해하는 그의 능력에 대해 심도있게 연구된 하나의 유기체는 무기화 경로의 제1 단계를 촉매하는 효소 (TfdA)를 코딩하는 유전자 *tfdA*를 함유하는 랄스토니아 유티트로파 (*Ralstonia eutropha*)이다 (미국 특허 6,153,401 및 젠뱅크 Acc. No. M16730 참조). TfdA는 α -케토글루타레이트-의존적 디옥시게나제 반응을 통해 2,4-D 산의 디클로로페놀 (DCP)로의 전환을 촉매한다 (Smejkal et al., 2001). DCP는 2,4-D에 비해 거의 제조제 활성을 갖지 않는다. *tfdA*는 정상적으로는 2,4-D에 민감한 쌍떡잎 식물 (예를 들어, 면화 및 담배)에서 2,4-D 저항성을 부여하기 위해 트랜스제닉 (transgenic) 식물에 사용되었다 ([Streber et al. (1989)], [Lyon et al. (1989)], [Lyon (1993)], 및 미국 특허 5,608,147).
- [0012] 2,4-D를 분해할 수 있는 단백질을 코딩하는 많은 *tfdA*-형 유전자가 환경으로부터 확인되었고, 젠뱅크 데이터베이스에 기탁되었다. 많은 상동체는 TfdA와 유사하고 (>85% 아미노산 동일성), TfdA와 유사한 효소적 특성을 갖는다. 그러나, TfdA와 유의하게 더 낮은 동일성 (25-50%)을 갖지만, α -케토글루타레이트 디옥시게나제 Fe (II) 디옥시게나제와 연관된 특징적인 잔기를 갖는 많은 상동체가 존재한다. 따라서, 분기하는 (divergent) TfdA 단백질의 기질 특이성은 분명하지 않다.
- [0013] *tfdA*에 대한 낮은 상동성 (<35%)을 갖는 2,4-D-분해 유전자의 예는 델프트리아 아시도보란스 (*Deiftia Acidovorans*)로부터의 *aad-12* 유전자이다 ([Schleinitz et al. (2004)] 및 [Westendorf et al. (2002)]).

aad-12 유전자는 페녹시알카노에이트 제조제 (예를 들어, 페녹시아세트산 제조제, 예컨대 2,4-D 및 MCPA; 및 페녹시부탄산 제조제, 예컨대 2,4-DB 및 MCPB) 및 피리딜옥시알칸산 제조제 (예를 들어, 피리딜옥시아세트산 제조제, 예컨대 트리클로피르 및 플루록시피르)를 포함하고 이로 제한되지 않는, 및 활성 성분(들)의 산, 염, 또는 에스테르 형태 (예를 들어, WO 2007/053482 참조)를 포함하는 특정 페녹시 옥신 제조제에 대한 내성을 부여하기 위해 식물에 사용된 S-거울상이성질체-특이적 α -케토글루타레이트-의존성 디옥시게나제를 코딩한다.

[0014] 글루포시네이트-암모늄 ("글루포시네이트")은 제조제의 포스포노트리신 클래스 내의 비-침투성 (systemic), 비-선택적 제조제이다. 주로 매우 광범한 활엽수 및 초본성 잡초의 발아후 방제를 위해 사용되는, 글루포시네이트의 활성 성분인 L-포스포노트리신은 식물에서 암모니아 해독에 필요한 효소인 글루타민-합성효소의 비가역적인 억제제를 통해 잡초를 방제한다. 글루포시네이트 제조제는 예를 들어 상표명 이그나이트(IGNITE)® 및 리버티(LIBERTY)® 하에 상업적으로 시판된다.

[0015] 토양 박테리아 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스 (*Streptomyces viridochromogenes*)로부터 단리된 효소 포스포노트리신 N-아세틸 트랜스퍼라제 (PAT)는 아세틸화에 의해 L-포스포노트리신의 그의 불활성 형태로의 전환을 촉매한다. PAT를 발현하는 유전자의 식물-최적화된 형태는 글루포시네이트 제조제에 대한 내성을 부여하기 위해 대두에 사용되어 왔다. 상기 글루포시네이트 저항성 대두의 하나의 예는 이벤트 A5547-127이다. 보다 최근에, 글루포시네이트-내성 형질과 조합한 글루포시네이트 제조제의 사용이 ALS- 및 글리포세이트 저항성 잡초를 효과적으로 관리하는 비선택적 수단으로서 제안되었다.

[0016] 식물 내에서 이중성 또는 외래 유전자의 발현은 외래 유전자가 염색체에 삽입되는 위치에 의해 영향받는다. 이것은 예를 들어 염색질 구조 (예를 들어, 이질염색질) 또는 통합 부위에 가까운 전사 조절 요소 (예를 들어, 인핸서)의 근접성 때문일 수 있다 (Weising et al., Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988). 동일한 종류의 트랜스제닉 식물 (또는 다른 유기체) 내의 동일한 유전자는 상이한 이벤트 사이에서 발현 수준에 대한 넓은 차이를 보일 수 있다. 또한, 공간적 또는 시간적 발현 패턴의 차이가 존재할 수 있다. 예를 들어, 다양한 식물 조직에서 도입유전자 (transgene)의 상대적인 발현의 차이는 도입된 유전자 구축물 내에 존재하는 전사 조절 요소로부터 예상되는 패턴에 대응하지 않을 수 있다.

[0017] 따라서, 매우 많은 이벤트가 종종 생성되고, 관심있는 도입된 유전자를 제시된 목적을 위해 만족스러운 수준으로 발현하는 이벤트를 확인하기 위해 스크리닝된다. 상업적인 목적을 위해, 수백 내지 수천 개의 상이한 이벤트를 생산하고 이들 이벤트를 요구되는 도입유전자 발현 수준 및 패턴을 갖는 단일 이벤트에 대해 스크리닝하는 것이 통상적이다. 도입유전자 발현의 요구되는 수준 및/또는 패턴을 갖는 이벤트는 통상적인 육종 방법을 사용하여 유성 교배체에 의해 도입유전자를 다른 유전적 배경 내로 유전자 이입 (introgression)하기 위해 유용하다. 상기 교배체의 자손체는 원래의 형질전환체의 도입유전자 발현 특징을 유지한다. 상기 전략은 현지 성장 조건에 잘 적응된 많은 변종에서 신뢰할 수 있는 유전자 발현을 보장하기 위해 사용된다.

발명의 내용

[0018] 발명의 개요

[0019] 본 발명은 부분적으로, 제조제-내성 기술의 유용성 보존을 돕는, 잡초 저항성을 관리하는 효과적인 수단을 제공할 수 있다. 본 발명은 또한 재배자에게 잡초 방제법 선택에 대한 많은 융통성과 편의를 제공할 수 있다.

[0020] 보다 구체적으로, 본 발명은 부분적으로, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection; ATCC)에 기탁 번호 PTA-11993으로 기탁된 전형적인 종자를 갖는 pDAB8264.42.32.1로 지정된 대두 (글리신 맥스 (*Glycine max*)) 이벤트 ("이벤트 pDAB8264.42.32.1"), 및 이로부터 유래된 자손체에 관한 것이다. 본 발명은 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 대두 식물을 포함한다 (그리고 서열 1과 서열 2 사이에 트랜스제닉 삽입체 (insert)를 포함하는 대두 식물을 포함한다).

[0021] 본 발명의 이벤트 및 기탁된 종자에 존재하는 트랜스제닉 삽입체는 3개의 제조제 내성 유전자, 즉 aad-12, 2mEpsps, 및 pat 유전자를 포함한다. 델프트리아 아시도보란스로부터 유래된 aad-12 유전자는 예를 들어 2,4-디클로로페녹시아세트산 및 피리딜옥시아세테이트 제조제에 대한 내성을 부여하는 아릴옥시알카노에이트 디옥시게나제 (AAD-12) 단백질을 코딩한다. 옥수수로부터 단리된 변형된 EPSPS 서열인 2mepsps 유전자는 글리포세이트 제조제에 대한 내성을 부여하는 단백질을 생산한다. 토양 박테리아 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스로부터의 pat 유전자는 제조제 글루포시네이트에 대한 내성을 부여한다.

[0022] 본 발명의 다른 측면은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 자손체 식물, 대두, 종자, 및/또는 식물 및

종자 및 자손체의 재생가능한 부분, 및 상기 임의의 것으로 제조된 식품 또는 사료 생성물을 포함한다. 본 발명은 또한 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 꽃가루, 배주, 꽃, 싹, 뿌리, 잎, 영양 세포의 핵, 꽃가루 세포, 및 다른 식물 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 식물 부분을 포함한다. 본 발명은 추가로 폐녹시 옥신 및/또는 아릴옥시알카노에이트 제조제, 글리포세이트, 및/또는 글루포시네이트를 포함하는 다중 제조제에 대한 내성을 갖는 대두 식물에 관한 것이다. 상기 대두 식물은 또한 디카바, 이미다졸 리논, 및 HPPD 제조제를 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 다른 비-선택적 및 선택적 제조제에 대한 내성을 부여하는 유전자로 집적 (stacking) 될 수 있다. 본 발명은 신규한 유전자 조성의 이벤트 pDAB8264.42.32.1 및 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 대두 식물의 작물 성능의 측면을 추가로 포함한다.

[0023] 본 발명은 부분적으로 식물 육종 및 제조제 내성 식물에 관한 것이다. 본 발명은 대두 세포의 계놈 내의 특정 부위 내에 삽입된, 본원에서 설명되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대두 식물 내의 신규한 형질전환 이벤트를 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 상기 이벤트/폴리뉴클레오티드는 예를 들어 작물 형질 및/또는 곤충-억제성 단백질을 포함하는 다른 형질로 "집적"될 수 있다. 그러나, 본 발명은 본원에서 설명되는 단일 이벤트를 갖는 식물을 포함한다.

[0025] 추가의 형질은 예를 들어 식물 육종, 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 함유하는 트랜스제닉 식물의 재-형질전환, 또는 상동성 재조합에 의한 표적화 통합을 통한 새로운 형질의 부가를 통해 식물 계놈 내로, 또는 이벤트 pDAB8264.42.32.1과 동일한 유전자좌 내로 집적될 수 있다.

[0026] 다른 실시양태는 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 트랜스제닉 삽입체 및/또는 인접하는 서열의 일부 또는 전부의 절제를 포함한다. 절제시에, 또 다른 및/또는 추가의 삽입체는 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 특정 염색체 부위로 표적화될 수 있다. 예시된 삽입체는 교체될 수 있거나, 또는 추가의 삽입체(들)이 본 발명의 대두 이벤트의 예시된 삽입체와 상기 방식으로 집적될 수 있다.

[0027] 한 실시양태에서, 본 발명은 염색체 15에 위치하는 대두 염색체 표적 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 부위는 이중성 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대두 염색체 표적 부위는 서열 1 및 서열 2에 제시된 인접하는 서열 사이에 위치한다.

[0028] 한 실시양태에서, 본 발명은 이중성 핵산을 염색체 15 상의 위치에 삽입하는 것을 포함하는, 트랜스제닉 대두 식물의 제조 방법을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이중성 핵산은 본원에서 설명되는 다양한 예시된 폴리뉴클레오티드 절편들 근처 또는 그 사이에서 염색체 15 상에 삽입된다.

[0029] 추가로, 본 발명은 샘플 (예를 들어 대두의)에서 본 발명의 이벤트의 존재를 검출하기 위한 검정을 제공한다. 검정은 대두 계놈 내로 삽입된 재조합 구축물의 DNA 서열 및 삽입 부위에 인접한 계놈 서열을 기초로 할 수 있다. 검정 수행에 유용한 키트 및 조건도 제공된다.

[0030] 따라서, 본 발명은 부분적으로, 예시된 전체 삽입체 및 그의 경계 영역의 DNA 서열 (트랜스제닉 대두 식물주에서)의 클로닝 및 분석에 관한 것이다. 이들 서열은 특유한 것이다. 이들 삽입체 및 경계 (및 연결) 서열을 기초로 하여, 이벤트-특이적 프라이머는 생성될 수 있고 생성되었다. PCR 분석은 이들 이벤트가 이들 이벤트-특이적 프라이머 세트를 사용하여 생성된 PCR 앰플리콘의 분석에 의해 확인될 수 있음을 입증하였다. 따라서, 이들 및 다른 관련 절차는 본 발명의 이벤트를 포함하는 대두 식물주를 특유하게 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 부분적으로, 이벤트 8264.42.32.1의 검출을 위한 중점 TAQMAN PCR 검정에 관한 것이다. 몇몇의 실시양태는 접합성 분석이 가능한 검정에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 부분적으로, 접합성 결정에 사용하기 위한 GMFL01-25-J19 (젠뱅크: AK286292.1) 참조 유전자의 용도에 관한 것이다. 이들 및 다른 관련 절차는 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 접합성을 특유하게 확인하고 상기 이벤트를 포함하는 대두 식물주를 채배하기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1: pDAB8264의 플라스미드 지도.
- 도 2: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 5' 및 3' 경계 서열을 확인하기 위한 프라이머 위치를 보여주는 개략도.
- 도 3: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 비형질전환된 및 계놈 DNA를 확인하기 위한 프라이머 위치를 보여주는 개략도.

도 4: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 TAQMAN 검정 검출을 위한 프라이머 위치를 보여주는 개략도.

<서열의 간단한 설명>

서열 1은 본 발명의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 5' 인접 경계 서열을 제공한다.

서열 2는 본 발명의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 3' 인접 경계 서열을 제공한다.

서열 3은 프라이머 4232_WF1을 제공한다.

서열 4는 프라이머 4232_WF3을 제공한다.

서열 5는 프라이머 4232_WF4를 제공한다.

서열 6은 프라이머 4232_WR1을 제공한다.

서열 7은 프라이머 4232_WR2를 제공한다.

서열 8은 프라이머 4232_WR3을 제공한다.

서열 9는 프라이머 4232_WR4를 제공한다.

서열 10은 프라이머 ED_v1_C1을 제공한다.

서열 11은 프라이머 PAT_11을 제공한다.

서열 12는 프라이머 4232_3'F를 제공한다.

서열 13은 프라이머 4232_3'R를 제공한다.

서열 14는 프로브 4232_3'P를 제공한다.

서열 15는 프라이머 GMS116F를 제공한다.

서열 16은 프라이머 GMS116R을 제공한다.

서열 17은 프로브 GMS116Probe를 제공한다.

서열 18은 pDAB8264 T-가닥 삽입체 및 부분적인 5' 및 3' 게놈 인접 서열을 제공한다.

서열 19는 본 발명의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 5' 게놈으로부터 삽입체까지의 서열 (연결 포함)을 제공한다.

서열 20은 본 발명의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 3' 삽입체로부터 식물까지의 연결을 제공한다.

서열 21은 플라스미드 pDAB8264의 서열을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본원에서 설명되는 본 발명은 대두 세포의 게놈 내의 특이적 유전자좌에 삽입된 다중 제초제 내성 유전자의 발현을 위한 카세트를 포함하는 대두 식물 (대두)의 신규한 형질전환 이벤트를 포함한다. 구체적으로, pDAB8264.42.32.1 이벤트를 함유하는 신규한 대두 식물주가 개발되었다. 상기 트랜스제닉 이벤트는 페녹시 옥신 및/또는 아릴옥시알카노에이트 제초제, 글리포세이트, 및/또는 글루포시네이트를 포함하는 다중 제초제에 대한 내성을 제공한다. 다중 제초제에 대한 내성을 통해, 재배자는 그의 개별 잡초 집단을 가장 잘 관리하기 위해 최적의 제초제 조합을 선택할 수 있다.

[0034] 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 예시된 트랜스제닉 삽입체는 다음과 같은 3개의 상이한 제초제 내성 유전자의 발현을 위한 유전 요소를 포함한다: (1) 합성 aad-12 유전자; (2) 야생형 EPSPS 폴리펩티드에 비해 아미노산 잔기 102 (트레오닌으로부터 이소류신으로) 및 106 (프롤린으로부터 세린으로)에 돌연변이를 함유하고 글리포세이트 제초제에 대한 저항성 또는 내성을 부여하는 단백질을 코딩하는 옥수수로부터의 변형된 EPSPS 서열; 및 (3) 글루포시네이트 제초제에 대한 내성 또는 저항성을 부여하는 pat 유전자. aad-12 유전자는 델프트리아 아시도보란스로부터 유래되었고, 페녹시알카노에이트 제초제 (예를 들어, 페녹시아세트산 제초제, 예컨대 2,4-D 및 MCPA; 및 페녹시부탄산 제초제, 예컨대 2,4-DB 및 MCPB) 및 피리딜옥시알칸산 제초제 (예를 들어, 피리딜옥시아세트산 제초제, 예컨대 트리클로피르 및 플루록시피르)를 포함하고, 활성 성분(들)의 산, 염, 또는 에스테르 형태를 포함하는, α-케토글루타레이트 모이어티 (moiety)를 갖는 제초제를 실행시킬 수 있는 아릴옥시알카

노에이트 디옥시게나제 (AAD-12) 단백질 효소를 코딩한다.

- [0035] 본 발명은 또한 샘플에서 본 발명의 이벤트의 존재를 검출하기 위한 검정을 제공한다. 본 발명의 측면은 본원에서 예시되거나 제시된 임의의 진단적 핵산 분자, 특히 전체적으로 또는 부분적으로 본 발명의 인접 서열을 기초로 한 의 분자의 설계 및/또는 생산 방법을 포함한다.
- [0036] 본 발명은 부분적으로 식물 육종 및 제초제 내성 식물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 다른 형질 (예컨대 다른 제초제 내성 유전자(들) 및/또는 예를 들어 곤충-억제성 단백질 또는 억제성 RNA 서열을 코딩하는 유전자(들))로 "집적될" 수 있다. 그러나, 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 단일 이벤트를 갖는 식물을 포함한다.
- [0037] 보다 구체적으로, 본 발명은 부분적으로, 트랜스제닉 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1, 이들 이벤트를 포함하는 식물주, 및 상기 삽입체의 DNA 서열, 및/또는 그의 경계 영역의 클로닝 및 분석에 관한 것이다. 본 발명의 식물주는 본원에 개시되고 제안된 서열을 사용하여 검출할 수 있다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 본원에 예시되거나 설명된 폴리뉴클레오티드 절편 (예컨대, 도 2에 도시된 바와 같은 서열 1, 서열 2, 및/또는 이들 사이의 삽입체)은 절제된 후, 추가의 폴리뉴클레오티드 서열(들)로 재-표적화될 수 있다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 본 발명은 제초제-내성 대두 식물주, 및 그의 확인에 관한 것이다. 본 발명은 부분적으로, 유성 교배의 자손체가 관심있는 이벤트를 함유하는지 결정하기 위해 본 발명의 이벤트의 존재를 검출하는 것에 관한 것이다. 추가로, 이벤트를 검출하기 위한 방법이 포함되고, 예를 들어 시판된 허가 및 재조합 작물 식물로부터 유래된 식품의 표시를 필요로 하는 규정을 따르는데 도움이 된다. 임의의 공지 핵산 검출 방법, 예컨대 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 또는 핵산 프로브를 사용한 DNA 혼성화에 의해 본 발명의 이벤트의 존재를 검출하는 것이 가능하다. 이벤트-특이적 PCR 검정이 본원에서 논의된다 (예를 들어, 또 다른 예에 대해서는 문헌 [Windels et al. (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999] 참조). 몇몇의 이들 예는 삽입체와 인접 DNA 사이의 연결에 걸치는 프라이머 세트를 사용하는 것에 관련된다.
- [0040] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1, 및 그의 선택 및 세대별로 전체 식물 및 분자 수준에서의 안정성 및 발현에 대한 특성화가 본원에 예시된다. 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 두 인접하는 서열은 모두 서열결정되었고 서열 1 및 서열 2로서 본원에서 설명된다. 이벤트 특이적 검정이 개발되었다. 또한, 이벤트는 대두 계놈 (대두 염색체 15) 상에 매핑되었다. 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 순계 및 잡종 대두 식물주에서 페녹시 옥신, 글리포세이트 및 글루포시네이트 제초제에 대한 내성을 부여할 엘리트 (elite) 재배종 (cultivar) 내로 유전자 이입될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 EPSPS 유전자는 돌연변이체 5-에놀피루빌-3-포스포시킵산 합성효소 (EPSPS)를 코딩한다. 야생형 EPSPS 유전자는 제아 메이즈 (*Zea mays*)로부터 처음 단리되었고, 서열은 젠뱅크 기탁 번호 X63374 하에 기탁되었다. 또한 미국 특허 6,566,587 (특히 여기서 서열 3)을 참조한다.
- [0042] 식물에서 이중성 유전자의 높은 발현을 얻기 위해, 식물 세포에서 보다 효율적으로 발현되도록 상기 유전자를 재조작하는 것이 바람직할 수 있다. 야생형 식물 EPSPS 뉴클레오티드 서열의 변형은 식물 세포에서 발현될 때 상기 저항성을 제공할 수 있다. '587 특허에 기재된 바와 같이, EPSPS 폴리펩티드를 야생형 폴리펩티드와 비교할 때, 단백질의 잔기 102에서 트레오닌을 이소류신으로 치환하고 위치 106에서 프롤린을 세린으로 치환하는 변형의 결과는 본 발명의 삽입체에 사용되는 이중 돌연변이체 EPSPS 폴리펩티드 (2mEPSPS)이다. 식물 세포에서 발현될 때, 이것은 글리포세이트에 대한 내성을 제공한다. "2mepsps 유전자" 또는 DMMG로도 언급되는 본 발명의 EPSPS 유전자는 별법으로 쌍떡잎 식물 및 외떡잎 식물 둘 모두, 특히 대두에서 발현을 개선하기 위해 최적화될 수 있다. 코돈 사용 빈도는 바람직한 헤미코트 (hemicot) 코돈 사용 빈도를 기초로 하여 선택될 수 있고, 즉, 단백질이 외떡잎 및 쌍떡잎 식물 사용 빈도 둘 모두에 대한 편향성 (bias)을 갖는 코돈에 의해 코딩되도록 재설계될 수 있다. 유해한 서열 및 불필요한 제한 부위는 2mepsps 코딩 서열의 전사/번역 효율을 증가시키고 DNA 조작 단계를 용이하게 하기 위해 제거될 수 있다. 해당 외떡잎 식물 유전자의 헤미코트-최적화된 버전은 2010년 12월 3일에 출원된 미국 특허 가출원 (출원 번호 61/419,703) (명칭: "OPTIMIZED EXPRESSION OF GLYPHOSATE RESISTANCE ENCODING NUCLEIC ACID IN PLANT CELLS")에 상세히 설명되어 있다.
- [0043] 본원에서 이미 언급된 바와 같이, 도입유전자의 식물 계놈 내로의 도입 및 통합은 몇몇의 무작위 이벤트를 수반한다 (따라서 제시된 삽입에 대해 명칭 "이벤트"가 사용됨). 즉, 많은 형질전환 기술, 예컨대 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 형질전환, "유전자 총 (gene gun)", 및 WHISKERS를 사용하더라도, 도입유전자가 삽입될 계놈

내의 위치는 예측할 수 없다. 따라서, 삽입체의 두 측면 상의 인접하는 식물 게놈 DNA의 확인은 제시된 삽입 이벤트를 갖는 식물의 확인을 위해 중요할 수 있다. 예를 들어, 삽입체 및 숙주 게놈의 연결 영역을 가로질러 PCR 앰플리콘을 생성하는 PCR 프라이머를 설계할 수 있다. 상기 PCR 앰플리콘은 특유한 또는 별개의 종류의 삽입 이벤트를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0044] 식물 세포의 게놈 내로 삽입체를 도입하는 과정 동안, 삽입체 및/또는 게놈 인접 서열의 몇몇의 결실 또는 다른 변경이 발생하는 것은 비통상적이지 않다. 따라서, 본원에서 제공되는 플라스미드 서열의 관련 절편은 몇몇의 작은 변이를 포함할 수 있다. 이것은 본원에서 제공되는 인접하는 서열에 대해서도 동일하게 적용된다. 따라서, 본 발명의 인접 및/또는 삽입체 서열과 일정 범위의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열에 대한 동일성은 본원에 예시되거나 설명된 서열과 적어도 65% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 70% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 80% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 또한, 본원에서 제공되는 혼성화 및 혼성화 조건은 본 발명의 상기 식물 및 폴리뉴클레오티드 서열을 규정하기 위해 사용될 수 있다. 인접하는 서열 + 전체 삽입체 서열을 포함하는 서열은 기탁된 종자를 참고로 하여 확인될 수 있다.

[0045] "이벤트"는 본래 무작위 이벤트이기 때문에, 본 개시내용의 일부로서 이벤트를 포함하는 대두 식물주의 적어도 2500개의 종자가 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC, 미국 20110 버지니아주 매나사스 유니버시티 볼리바드 10801)에 기탁되었고 제한 없이 (그러나, 특허권이 적용됨) 공중에게 이용가능하다. 기탁물은 ATCC 기탁 번호 PTA-11993으로 지정되었다. 글리신 맥스 종자 (대두 종자 글리신 맥스 엘.: pDAB8264.42.32.1)의 100 패킷 (packet) (패킷당 25개 종자)이 2011년 7월 11일 기탁되었다. 기탁물을 2011년 7월 26일 시험하였고, 이날 종자는 생존가능하였다. 상기 기탁은 특허 절차의 목적상 종자 기탁에 대한 부다페스트 조약에 따라 그 규정 하에 이루어졌고, 유지될 것이다. 기탁물은 공공 기탁기관인 ATCC 기탁기관에 제한 없이, 30년 동안, 또는 가장 최근의 요청 후 5년 동안, 또는 특허의 존속 기간 중 가장 긴 기간 동안 유지될 것이고, 이 기간 동안 비생존 가능하게 될 경우 교체될 것이다.

[0046] 기탁된 종자는 본 발명의 일부이다. 분명하게, 대두 식물은 이들 종자로부터 성장할 수 있고, 상기 식물은 본 발명의 일부이다. 본 발명은 또한 이들 식물 및 그의 자손체를 검출하기 위해 유용한 이들 대두 식물 내에 함유된 DNA 서열에 관한 것이다. 본 발명의 검출 방법 및 키트는 최종 시험 목적에 따라 이들 이벤트 중의 임의의 하나, 둘 또는 심지어 3개 모두를 확인하는 것에 관한 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 설명을 돕고 통상의 기술자에게 본 발명의 실시를 안내하기 위한 정의 및 예가 본원에 제공된다. 달리 주지하지 않으면, 용어는 통상의 기술자에 의해 통상적인 용법에 따라 이해되어야 한다. 37 CFR § 1.822에 기재된 바와 같은 DNA 염기에 대한 명명법이 사용된다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자손체"는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 모 식물의 임의의 세대의 자손을 나타낸다.

[0049] 트랜스제닉 "이벤트"는 이중성 DNA, 즉, 관심있는 도입유전자를 포함하는 핵산 구축물을 사용한 식물 세포의 형질전환, 도입유전자의 식물의 게놈 내로의 삽입에 의해 생성된 식물 집단의 재생, 및 특정 게놈 위치 내로의 삽입을 특징으로 하는 특정 식물의 선택에 의해 생산된다. 용어 "이벤트"는 이중성 DNA를 포함하는 본래의 형질 전환체 및 형질 전환체의 자손체를 의미한다. 용어 "이벤트"는 또한 형질 전환체와, 게놈/도입유전자 DNA를 포함하는 또 다른 변종 사이의 유성 이종교배에 의해 생산된 자손체를 의미한다. 반복친 (recurrent parent)에 대한 반복된 역교배 후에도, 형질 전환된 모체로부터의 삽입된 도입유전자 DNA 및 인접하는 게놈 DNA (게놈/도입유전자 DNA)는 동일한 염색체 위치에서 교배체의 자손체에 존재한다. 용어 "이벤트"는 또한 삽입된 DNA를 포함하는 하나의 모 식물주 (예를 들어, 본래의 형질 전환체 및 자가수정 (selfing)에 의해 생성되는 자손체)와 삽입되는 DNA를 함유하지 않는 모 식물주 사이의 유성 교배의 결과로서 관심있는 도입유전자를 포함하는 삽입된 DNA를 수용하는 자손체로 전달될 것으로 예상되는 삽입된 DNA에 바로 인접하여 존재하는 인접 게놈 서열 및 삽입된 DNA를 포함하는 본래의 형질 전환체 및 그의 자손체로부터의 DNA를 의미한다.

[0050] "연결 서열"은 게놈 내에 삽입되는 DNA가 삽입 지점에 인접하는 대두 천연 게놈으로부터의 DNA에 연결되는 지점을 포함하고, 식물의 유전 물질 내의 하나 또는 다른 연결 서열의 확인 또는 검출이 이벤트에 대한 진단으로 충분하다. 본원에 기재된 대두 이벤트 내의 삽입 및 유사한 길이의 인접 DNA를 포함하는 DNA 서열이 포함된다. 상기 진단적 서열의 구체적인 예를 본원에 제공하지만; 삽입체의 연결과 중첩되는 다른 서열, 또는 삽입체 및 게놈 서열의 연결이 또한 진단 서열이고, 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명은 부분적으로 상기 인접, 연결, 및 삽입체 서열을 사용한 이벤트 확인에 관한 것이다. 관련된 PCR 프라이머 및 앰플리콘은 본 발명에 포함된다. 본 발명에 따르면, 삽입된 DNA 및 그의 경계에 걸쳐 이어지는 앰플리콘을 사용하는 PCR 분석 방법은 본 발명의 독점적인 (proprietary) 트랜스제닉 대두 식물주로부터 유래된 상업화된 트랜스제닉 대두 변종 또는 식물주를 검출하거나 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0052] 이원성 (binary) 플라스미드인 pDAB8264 (서열 21)은 도 1에 도시된 유전 요소를 포함한다. 다음 유전 요소 (T-가닥 경계 서열 미포함)는 pDAB8264의 T-가닥 영역 내에 포함된다. 표 1에서, 유전 요소의 잔기 넘버링은 본원에 개시된 서열 21에 대해 제시된다.

표 1

이원성 플라스미드 pDAB8264 (서열 21)를 포함하는 유전 요소의 잔기 넘버링.

유전 요소	위치	참고문헌
RB7 MARv3 (매트릭스 부착 영역)	137 bp – 1302 bp	Thompson and Myatt, (1997) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 34: 687-692. ; WO9727207
개재 서열	1303 bp – 1341 bp	비적용가능함
히스톤 H4A7 48 3'UTR (비번역 영역)	1342 bp – 2002 bp	Chabouté et al., (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8: 179-191
개재 서열	2003 bp – 2025 bp	비적용가능함
2mEPSPS v1	2026 bp – 3363 bp	미국 특허 No. 6,566,587
OTPc (최적화된 수송 펩타이드)	3364 bp – 3735 bp	미국 특허 No. 5,510,471
개재 서열	3736 bp – 3748 bp	비적용가능함
인트론 2	3749 bp – 4214 bp	Chaubet et al., (1992) <i>J. Mol. Bio.</i> , 225: 569-574
히스톤 H4A7 48 프로모터	4215 bp – 5169 bp	Chabouté et al., (1987) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 8:179-191
개재 서열	5170 bp – 5261 bp	비적용가능함
AtUbi 10 프로모터 (아라비디시스 탈리아나 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)유비쿼틴 10 프로모터)	5262 bp – 6583 bp	Callis, et al., (1990) <i>J. Biol. Chem.</i> , 265: 12486-12493
개재 서열	6584 bp – 6591 bp	비적용가능함
aad-12 v1	6592 bp – 7473 bp	WO 2007/053482
모든 6-프레임에 정지 코돈을 함유하는 개재 서열	7474 bp – 7575 bp	비적용가능함
AtuORF23 3' UTR (아그로박테리움 투메파시엔스 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 개방 해독 프레임 23 UTR)	7576 bp – 8032 bp	미국 특허 No. 5,428,147
개재 서열	8033 bp – 8146 bp	비적용가능함
CsVMV 프로모터 (카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터)	8147 bp – 8663 bp	Verdaguer et al., (1996) <i>Plant Mol. Biol.</i> , 31: 1129-1139
개재 서열	8664 bp – 8670 bp	비적용가능함
pat v6	8671 bp – 9222 bp	Wohlleben et al., (1988) <i>Gene</i> 70: 25-37
모든 6-프레임에 정지 코돈을 함유하는 개재 서열	9223 bp – 9324 bp	비적용가능함
AtuORF1 3'UTR (아그로박테리움 투메파시엔스 개방 해독 프레임 1 UTR)	9325 bp – 10028 bp	Huang et al., (1990) <i>J. Bacteriol.</i> 172:1814-1822

[0053]

[0054] 서열 19 및 20은 각각 아래에서 보다 상세하게 설명되는 바와 같이, 삽입체 서열의 5' 및 3' 부분과 함께 제시된 5' 및 3' 인접 서열이고, 따라서 삽입체 및 게놈 DNA의 5' 및 3' "연결" 또는 "전이 (transition)" 서열을 포함한다. 서열 19에 대해, 잔기 1-1246은 5' 게놈 인접 서열이고, 잔기 1247-1550은 삽입체의 5' 말단부 잔기이다. 서열 20에 대해, 잔기 1-176은 삽입체의 3' 말단부의 잔기이고, 잔기 177-680은 3' 게놈 인접 서열이다. 따라서, 삽입체의 5' 말단부에 대해 연결 서열 또는 전이는 서열 19의 잔기 1246-1247에서 발생한다. 삽입체의 3' 말단부에 대해 연결 서열 또는 전이는 따라서 서열 20의 잔기 176-177에서 발생한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 연결 서열의 한 측면 상에, 예를 들어, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 또는 200개 염기, 또는 가능하게는 그 초과, 및 그 사이의 임의의 증분을 포함하는 것을 포함한다. 따라서, 연결 서열에 걸치는 프라이머는 예를 들어 인접하는 서열과 혼성화하는 5-10개 염기 및 삽입체 서열과 혼성화하는 5-10개 염기를 포함할 수 있다. 프로브 및 앰플리콘은 유사하게 설계될 수 있지만, 종종 프라이머보다 길 것이다.

- [0055] 본 발명의 서열 (인접하는 서열 포함)은 특유한 것이다. 이들 삽입체 및 경계 서열을 기초로 하여, 이벤트-특이적 프라이머를 생성하였다. PCR 분석은 이들 대두 식물주가, 이들 이벤트-특이적 프라이머 세트를 사용하여 생성된 PCR 앰플리콘의 분석에 의해 상이한 대두 유전자형에 의해 확인될 수 있음을 보여주었다. 따라서, 이들 및 다른 관련 절차는 이들 대두 식물주를 특유하게 확인하기 위해 사용될 수 있다. 본원에서 확인된 서열은 특유한 것이다.
- [0056] 본 발명의 검출 기술은 하나 이상의 관심있는 추가의 형질을 자손체에 부여하기 위해 관심있는 이벤트를 포함하는 모 식물을 또 다른 식물주와 교배한 후에 어느 자손체 식물이 제시된 이벤트를 포함하는지 결정하기 위해 식물 육종과 관련하여 특히 유용하다. 이들 PCR 분석 방법은 특히 상업화된 트랜스제닉 대두 종자에 대한 대두 육종 프로그램 및 품질 관리에 유리하다. 또한, 이들 트랜스제닉 대두 식물주에 대한 PCR 검출 키트가 현재 제조되고 사용될 수 있다. 이것은 또한 생성물 등록 및 생성물 관리에 유리할 수 있다.
- [0057] 또한, 인접하는 대두/계놈 서열은 각각의 삽입체의 계놈 위치를 특이적으로 확인하기 위해 사용될 수 있다. 상기 정보는 각각의 이벤트에 특이적인 분자 마커 시스템의 제조를 위해 사용될 수 있다. 이들은 가속 (accelerated) 육종 전략을 위해 및 연관 데이터를 확립하기 위해 사용될 수 있다.
- [0058] 추가로, 인접하는 서열 정보는 도입유전자 통합 과정, 계놈 통합 부위 특징, 이벤트 분류, 도입유전자 및 그의 인접하는 서열의 안정화, 및 유전자 발현 (특히 유전자 침묵 (silencing), 도입유전자 결정화 패턴, 위치 효과, 및 잠재적인 발현-관련 요소, 예컨대 MARS [매트릭스 부착 영역] 등과 관련된)을 연구하고 특성화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0059] 본 개시내용에 비추어, 본 발명은 ATCC 기탁 번호 PTA-11993 하에 이용가능한, 2011년 7월 11일에 본 발명의 이벤트에 대해 기탁된 종자를 포함함이 명백하다. 본 발명은 또한 이날 상기 기탁 번호 하에 ATCC에 기탁된 종자로부터 성장한 제초제-내성 대두 식물을 포함한다. 본 발명은 추가로 상기 식물의 일부, 예컨대 잎, 조직 샘플, 상기 식물에 의해 생산된 종자, 꽃가루, 가루 (meal) (콩 가루) 등 (여기서 이들은 서열 1 및 서열 2가 인접하는 트랜스제닉 삽입체를 포함함)을 포함한다. 본 발명은 추가로 본 발명의 식물 (상기 나열된 식물의 일부로부터의 세포 포함)로부터의 비-분화전능성 (totipotent) 세포를 포함한다.
- [0060] 또한, 본 발명은 기탁된 종자로부터 성장한 식물의 후손 및/또는 자손체 식물, 바람직하게는 제초제-저항성 대두 식물을 포함하고, 여기서 상기 식물은 본원에서 설명되는 검출가능한 야생형 계놈 DNA/삽입체 DNA 연결 서열을 포함하는 계놈을 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대두"는 글리신 맥스를 의미하고, 대두 식물과 교배될 수 있는 그의 모든 변종을 포함한다.
- [0061] 본 발명은 추가로 적어도 하나의 모체로서 본 발명의 식물을 사용하여 교배체를 제조하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 본원에 예시된 임의의 식물을 양친의 하나 또는 둘 모두로서 갖는 F₁ 잡종 식물을 포함한다. 또한, 본 발명에는 본 발명의 상기 F₁ 잡종에 의해 생산된 종자가 포함된다. 본 발명은 예시된 식물을 상이한 (예를 들어 근친교배 모체) 식물과 교배하고 생성되는 잡종 종자를 수거함으로써 F₁ 잡종 종자를 생산하기 위한 방법을 포함한다. 본 발명은 자성 모체 또는 옹성 모체인 예시된 식물을 포함한다. 생성되는 식물의 특징은 모 식물의 주의 깊은 고려에 의해 개선될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 제초제-내성 대두 식물은 먼저 본원에서 언급되는 임의의 하나의 종자로부터 성장한 대두 식물로 이루어진 제1 모 대두 식물, 및 제2 모 대두 식물을 유성 교배하여, 다수의 제1 자손체 식물을 생성한 후; 제초제에 저항성인 (또는 적어도 하나의 본 발명의 이벤트를 갖는) 제1 자손체 식물을 선택하고; 제1 자손체 식물을 자가수정하여, 다수의 제2 자손체 식물을 생성한 후; 제2 자손체 식물로부터 제초제에 저항성인 (또는 적어도 하나의 본 발명의 이벤트를 갖는) 식물을 선택함으로써 번식될 수 있다. 이들 단계는 제1 자손체 식물 또는 제2 자손체 식물을 제2 모 대두 식물 또는 제3 모 대두 식물에 역교배하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이어서, 본 발명의 대두 종자를 포함하는 대두 작물, 또는 그의 자손체를 식재할 수 있다.
- [0063] 또한, 2개의 상이한 트랜스제닉 식물은 또한 교배되어 2개의 독립적으로 분리되는, 부가된 외인성 유전자를 함유하는 자손을 생성할 수 있음이 이해되어야 한다. 적절한 자손체의 자가수정은 부가된 외인성 유전자 둘 모두에 대해 동형접합성인 식물을 생산할 수 있다. 모 식물에 대한 역교배 및 비-트랜스제닉 식물과의 이종교배도 영양 번식으로 고려된다. 상이한 형질 및 작물에 대해 통상 사용되는 다른 육종 방법은 당업계에 공지되어 있다. 역교배 육종은 간단히 유전되는, 고도로 유전가능한 형질에 대한 유전자를 반복적인 바람직한 동형접합성 재배종 또는 순계주 내로 전달하기 위해 사용되었다. 전달되는 형질의 공급원은 공여자 모체로 불린다. 생성

되는 식물은 반복친 (예를 들어, 재배종)의 특질 및 공여자 모체로부터 전달되는 바람직한 형질을 가질 것으로 예상된다. 초기 교배 후에, 공여자 모체의 표현형을 갖는 개체는 선택되고 반복친에 반복적으로 교배 (역교배)된다. 생성되는 모체는 반복친 (예를 들어, 재배종)의 특질 및 공여자 모체로부터 전달되는 바람직한 형질을 가질 것으로 예상된다.

[0064] 본 발명의 DNA 분자는 마커 지원 (assisted) 육종 (MAB) 방법에서 분자 마커로서 사용될 수 있다. 본 발명의 DNA 분자는 유전적으로 연결된 작물학상 유용한 형질을 확인하기 위한 방법 (예컨대, AFLP 마커, RFLP 마커, RAPD 마커, SNP, 및 SSR)에 사용될 수 있다. 제조제-저항성 형질은 MAB 방법을 사용하여 본 발명의 대두 식물 (또는 그의 자손체 및 임의의 다른 대두 재배종 또는 변종)과의 교배체의 자손체에서 추적될 수 있다. DNA 분자는 상기 형질에 대한 마커이고, 당업계에 공지된 MAB 방법은 본 발명의 적어도 하나의 대두 식물주, 또는 그의 자손체가 모체 또는 조상인 대두 식물에서 제조제-저항성 형질(들)을 추적하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 본 발명의 이벤트를 갖는 임의의 대두 변종을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 방법은 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 대두 재배종 내로 유전자 이입시키는 것을 포함하는, 제조제-내성 대두 식물을 생산하는 방법을 포함한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 방법은 본 발명의 2개의 식물, 또는 본 발명의 하나의 식물 및 임의의 다른 식물의 교배를 포함할 수 있다. 바람직한 방법은 상기 자손체를 본 발명에 따라 검출가능한 이벤트에 대해 분석함으로써 상기 교배체의 자손체를 선택하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 다른 바람직한 형질, 예컨대 작물 형질, 예컨대 본원에서 다양한 실시예에서 시험되는 형질을 포함하는 식물과의 육종 사이클을 통해 본 발명의 이벤트를 추적하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이벤트 및 요구되는 형질을 포함하는 식물은 검출, 확인, 선택되고, 예를 들어 추가의 라운드의 육종에 신속하게 사용될 수 있다. 본 발명의 이벤트/형질은 또한 곤충 저항성 형질(들) 및/또는 추가의 제조제 내성 형질과 함께 육종을 통해 조합되고, 본 발명에 따라 추적될 수 있다. 후자의 한 실시양태는 제조제 디카바에 대한 저항성을 코딩하는 유전자와 조합된 본 발명의 이벤트를 포함하는 식물이다.

[0066] 따라서, 본 발명은 예를 들어 글리포세이트 저항성을 코딩하는 추가의 형질 (예를 들어, 저항성 식물 또는 박테리아 글리포세이트 옥시다제 (GOX)), 글리포세이트 아세틸 트랜스퍼라제 (GAT), 글루포시네이트 저항성을 위한 추가의 형질 (예를 들어 비알라포스 (bialaphos) 저항성 (bar)), 아세트락테이트 합성효소 (ALS)-억제성 제조제 저항을 부여하는 형질 (예를 들어, 이미다졸리논 [예컨대 이마제타피르], 술폰닐우레아, 트리아졸로피리미딘 술폰아닐리드, 피리미디닐티오벤조에이트, 및 다른 화학물질 [Csr1, SurA 등]), 브로목시닐 저항성 형질 (예를 들어, Bxn), 디카바 제조제에 대한 저항성을 위한 형질 (예를 들어, U.S. 2003/0135879 참조), HPPD의 억제제에 대한 저항성을 위한 형질 (4-히드록실페닐-피루베이트-디옥시게나제) 효소, 피토크 탈포화효소 (desaturase) (PDS)의 억제제에 대한 저항성을 위한 형질, 광계 (photosystem) II 억제성 제조제에 대한 저항성을 위한 형질 (예를 들어, psbA), 광계 I 억제성 제조제에 대한 저항성을 위한 형질, 프로토포르피리노겐 옥시다제 IX (PPO)-억제성 제조제 (예를 들어, PPO-1)에 대한 저항성을 위한 형질, 및 페닐우레아 제조제 (예를 들어, CYP76B1)에 대한 저항성을 위한 형질과 조합될 수 있다. 하나 이상의 상기 형질은 잡초 전이를 효과적으로 방제, 지연 및/또는 억제하는 능력 및/또는 여러 클래스의 제조제에 대한 저항성을 제공하기 위해 본 발명과 조합될 수 있다.

[0067] 본 발명에서 사용되는 aad-12 유전자는 페녹시아세테이트 옥신 제조제 (예를 들어, 2,4-DB, MCPB 등)로 전환되는 화합물에 대한 저항성을 제공하는 것이 통상의 기술자에게 이해될 것이다. 2,4-DB 제조제에 존재하는 부티르산 모이어티는 β-산화를 통해 식물독성 2,4-디클로로페녹시아세트산으로 전환된다. 마찬가지로, MCPB는 β-산화를 통해 식물독성 MCPA로 전환된다. 부탄산 제조제 자체는 비제조성이지만, 식물독성인 아세트산 형태의 제조제를 생산하도록 감수성 식물 내에서 β-산화에 의해 그 각각의 산으로 전환된다. 신속한 β-산화능이 없는 식물은 부탄산 제조제에 의해 피해를 보지 않는다. 그러나, 신속한 β-산화능을 갖고 부탄산 제조제를 아세트산 형태로 전환할 수 있는 식물은 후속적으로 AAD-12에 의해 보호된다.

[0068] 제조제 적용 방법은 당업계에 공지되어 있다. 상기 적용은 하나 초과인 제조제의 탱크 혼합을 포함할 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위해 바람직한 제조제는 글리포세이트, 글루포시네이트, 및 페녹시 옥신 제조제 (예컨대 2,4-D; 2,4-DB; MCPA; MCPB)의 조합물이다. 다른 바람직한 조합은 글리포세이트 + 2,4-D 또는 글루포시네이트 + 2,4-D 혼합물을 포함한다. 이들 3 종류의 제조제는 본 개시내용의 이점을 갖는, 통상의 기술자에게 분명할 유리한 조합으로 사용될 수 있다. 하나 이상의 상기 제조제는 본 발명의 종자와 함께 식재하기 전에 재배지/영역에 적용될 수 있다. 상기 적용은 예를 들어 본 발명의 종자의 식재 후 14일 이내에 실시될 수 있다. 하나 이상의 상기 제조제는 또한 식재 후 발아 전에 적용될 수 있다. 하나 이상의 상기 제조제는 또한 토양에 (잡초 방제를 위해) 또는 잡초의 상부 상에 및/또는 본 발명의 트랜스제닉 식물의 상부 상에 적용될 수 있다. 상기 3개의 제조제는 예를 들어 한 제조제에 대해 내성일 수 있지만 또 다른 제조제에 대해서는 그렇지 않은 잡

초를 방제하거나 억제하기 위해 순서대로 사용되거나, 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 3가지 종류의 제조제에 대해 다양한 적용 시간은 당업계에 공지된 다양한 방식으로 사용될 수 있다.

- [0069] 추가로, 본 발명의 이벤트는 트랜스제닉 및 비트랜스제닉 둘 모두에서 하나 이상의 추가의 제조제 내성 형질, 하나 이상의 추가의 도입 (예를 들어, 곤충 저항성, 진균 저항성, 또는 스트레스 내성 등) 또는 산출 (예를 들어, 증가된 수율, 개선된 오일 프로파일, 개선된 섬유 품질 등) 형질이 집적될 수 있다. 따라서, 본 발명은 임의의 많은 작물 해충을 탄력적이고 비용 효과적으로 방제하는 능력을 갖는 개선된 작물 품질의 완전한 작물 패키지를 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0070] 폴리뉴클레오티드 서열을 상동성 재조합을 통해 식물 세포의 특정 염색체 부위 내에 통합하는 방법은 당업계에 설명되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2009/0111188 A1에 설명된 바와 같은 부위 특이적 통합은 염색체 표적 내로 공여자 폴리뉴클레오티드 서열의 도입을 매개하기 위한 재조합효소 또는 인테그라제의 사용을 설명한다. 또한, 국제 특허 출원 WO 2008/021207은 하나 이상의 공여자 폴리뉴클레오티드 서열을 게놈의 특이적 위치 내에 통합시키기 위한 아연 핑거 (zinc finger) 매개-상동성 재조합을 설명한다. 미국 특허 6,720,475에 설명된 바와 같은 재조합효소, 예컨대 FLP/FRT, 또는 미국 특허 5,658,772에 설명된 바와 같은 CRE/LOX의 사용은 폴리뉴클레오티드 서열을 특정 염색체 부위 내에 통합시키기 위해 이용될 수 있다. 마지막으로, 공여자 폴리뉴클레오티드를 특정 염색체 위치 내에 표적화하기 위한 메가뉴클레아제의 사용은 문헌 [Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) pp. 5055-5060]에 기재되어 있다.
- [0071] 식물 세포 내의 부위 특이적 통합을 위한 다른 다양한 방법은 일반적으로 알려져 있고, 적용가능하다 (Kumar et al., Trends in Plant Sci 6(4) (2001) pp. 155-159). 또한, 몇몇의 원핵 및 하등 진핵 유기체에서 확인된 부위-특이적 재조합 시스템이 식물에서 사용하기 위해 적용될 수 있다. 상기 시스템의 예는 효모 자이코사카로마이세스 로옥시 (*Zygosaccharomyces rouxii*)의 pSR1 플라스미드로부터의 R/RS 재조합효소 시스템 (Araki et al. (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), 및 파지 Mu의 Gin/gix 시스템 (Maeser and Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 새로운 도입유전자(들)을 존재하는 트랜스제닉 이벤트에 근접하여 통합시키거나 집적하는 것이 바람직할 수 있다. 트랜스제닉 이벤트는 특유한 특징, 예컨대 단일 삽입 부위, 정상적인 멘델 분리 (Mendelian segregation) 및 안정한 발현, 및 여러 환경적 위치에서 및 위치에 걸친 제조제 내성 및 작물 성능을 포함하는 매우 우수한 효능의 조합을 기초로 하여 선택된 바람직한 게놈 유전자좌로 간주될 수 있다. 새로 통합된 도입유전자는 존재하는 형질전환체의 도입유전자 발현 특징을 유지하여야 한다. 또한, 새로 통합된 이벤트의 검출 및 확인을 위한 검정의 개발은 새로 통합된 이벤트의 게놈 인접 서열 및 염색체 위치가 이미 확인되었기 때문에 가능할 것이다. 마지막으로, 존재하는 도입유전자에 연결된 특정 염색체 위치 내로의 새로운 도입유전자의 통합은 통상적인 육종 방법을 사용한 유성 이종교배에 의한 도입유전자의 다른 유전적 배경 내로의 유전자 이입을 촉진할 것이다.
- [0073] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 서열을 트랜스제닉 이벤트로부터 절제하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 미국 특허 가출원 61/297,628에 설명된 바와 같은 도입유전자 절제는 유전자 발현 카세트에 이루어진 폴리뉴클레오티드 서열을 염색체 통합된 트랜스제닉 이벤트로부터 제거하기 위해 아연 핑거 뉴클레아제의 사용을 설명한다. 제거되는 폴리뉴클레오티드 서열은 선택가능 마커일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열의 절제 및 제거시, 변형된 트랜스제닉 이벤트는 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입에 의해 재표적화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열의 절제 및 변형된 트랜스제닉 이벤트의 후속적인 재표적화는 선택가능 마커의 재사용 또는 특이적 유전자의 발현에 의한 식물 전사체 (transcriptome)에 대한 의도하지 않은 변화를 극복하는 능력과 같은 이점을 제공한다.
- [0074] 본 발명은 이중성 핵산의 삽입에 매우 우수한 대두 게놈 내의 염색체 15 상의 특정 부위를 본원에 개시한다. 또한, 5' 인접 서열 및 3' 인접 서열이 개시되고, 이것은 염색체 15 상의 삽입/표적화 부위의 위치의 확인 및/또는 표적화에 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 관심있는 이중성 핵산을 상기 예비-확인된 표적 부위 내에 또는 상기 표적 부위의 근처에 도입하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 개시된 표적 부위에서 또는 상기 부위의 근처에서 삽입된 임의의 이중성 뉴클레오티드 서열을 포함하는 대두 종자 및/또는 대두 식물을 포함한다. 상기 표적화된 통합을 달성하는 한 방법은 본원에 예시된 pat 발현 카세트 대신에 상이한 삽입체를 절제 및/또는 치환하는 것이다. 이와 관련하여, 비제한적인 예를 들어 표적화된 상동성 재조합이 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0075] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자 이벤트 또는 형질 "집적"은 요구되는 형질을 한 트랜스제닉 식물주 내에

조합한다. 식물 재배가는 각각 요구되는 형질을 갖는 모체 사이의 교배를 수행한 후, 이들 요구되는 형질을 모두 갖는 자손을 확인함으로써 트랜스제닉 형질을 집적할 수 있다. 유전자를 집적하는 또 다른 방법은 형질전환 동안 2 이상의 유전자를 식물의 세포 핵 내로 동시에 전달하는 것이다. 유전자를 집적하는 또 다른 방법은 트랜스제닉 식물을 관심있는 또 다른 유전자로 재형질전환시키는 것이다. 예를 들어, 유전자 집적은 예를 들어, 2 이상의 상이한 곤충 저항성 형질(들), 곤충 저항성 형질(들) 및 질병 저항성 형질(들), 2 이상의 제초제 저항성 형질, 및/또는 곤충 저항성 형질(들) 및 제초제 내성 형질(들)을 포함하는 2 이상의 상이한 형질을 조합하기 위해 사용될 수 있다. 관심있는 유전자 이외에 선택가능 마커의 사용도 유전자 집적으로 간주될 수 있다.

[0076] "상동성 재조합"은 그를 통해 2개의 뉴클레오티드 서열이 상호작용 (재조합)하여 새로운 재조합 DNA 서열을 형성할 수 있는 유사한 뉴클레오티드 서열을 함유하는 대응하는 부위를 갖는 임의의 쌍의 뉴클레오티드 서열 사이의 반응을 의미한다. 유사한 뉴클레오티드 서열의 부위는 각각 본원에서 "상동성 서열"로 언급된다. 일반적으로, 상동성 재조합 빈도는 상동성 서열의 길이가 증가하면서 증가한다. 따라서, 상동성 재조합은 덜 동일한 (less than identical) 2개의 뉴클레오티드 서열 사이에서 발생할 수 있지만, 재조합 빈도 (또는 효율)는 2개의 서열 사이의 상이도 (divergence)가 증가하면서 감소한다. 재조합은 각각의 공여자 및 표적 분자 상의 하나의 상동성 서열을 이용하여 "단일-교차" 재조합 생성물을 생성함으로써 달성할 수 있다. 별법으로, 2개의 상동성 서열은 각각의 표적 및 공여자 뉴클레오티드 서열 상에 위치할 수 있다. 공여자 상의 2개의 상동성 서열과 표적 상의 2개의 상동성 서열 사이의 재조합은 "이중-교차" 재조합 생성물을 생성한다. 공여자 분자 상의 상동성 서열이 조각될 서열 (예를 들어, 관심있는 서열)에 인접할 경우, 표적 분자와의 이중-교차 재조합은 관심있는 서열이, 본래 표적 분자 상의 상동성 서열 사이에 위치하는 DNA 서열을 교체하는 재조합 생성물을 생성할 것이다. 이중-교차 재조합 이벤트를 통한 표적과 공여자 사이의 DNA 서열의 교환은 "서열 교체"로 명명된다.

[0077] 본 발명의 이벤트는 3개의 상이한 제초제 내성 단백질의 트랜스제닉 발현을 허용하여, 거의 모든 활엽수 및 초본 잡초를 방제할 제초제의 조합에 대한 내성을 유도할 수 있다. 상기 다중-제초제 내성 형질 발현 카세트/트랜스제닉 삽입체는 예를 들어 다른 제초제 내성 형질 (예를 들어, 글리포세이트 저항성, 글루포시네이트 저항성, 이미다졸리논 저항성, 디카바 저항성, HPPD 저항성, 브로복시닐 저항성 등), 및 곤충 저항성 형질 (예컨대 Cry1F, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry 34/45, Cry1Be, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, 식물 생장의 살곤충 단백질 ("VIPS") - VIP3A 포함 등)로 집적될 수 있다. 추가로, 본 발명의 발현 카세트/트랜스제닉 삽입체 내의 제초제 내성 단백질은 제2 유전자 또는 유전자 군으로 유전자 조작된 식물의 1차 형질전환체의 선택을 돕기 위한 하나 이상의 선택가능 마커로서 기능할 수 있다.

[0078] 이들 형질의 조합은 제초제 (예를 들어, 글리포세이트)에 대한 새로 획득한 저항성 또는 고유한 내성 때문에 잡초 (등과 같은) 종의 신규한 방제 방법을 제시한다. 따라서, 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 사용하여 잡초를 방제하는 신규한 방법은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0079] 작물 내로 집적되거나 개별적으로 형질전환된 본 발명의 트랜스제닉 형질의 사용은 폐녹시, 피리디옥시, 글리포세이트 및/또는 글루포시네이트 제초제에 대한 내성을 부여하기 위한 유전자를 함유하지 않는 다른 제초제 내성 자원 (volunteer) 작물의 방제를 위한 도구를 제공한다.

[0080] 본 발명의 바람직한 식물, 또는 종자는 그의 계놈 내에 본원에서 확인된 삽입체 서열을, 본원에서 설명되는 바와 같이 삽입체의 양 측면 상의 적어도 20-500개 또는 그 초과와 연속적인 인접하는 뉴클레오티드를 포함한다. 달리 지시하지 않으면, 인접하는 서열에 대한 언급은 서열 1 및 서열 2에 대해 확인된 것을 나타낸다. 다시, 본 발명의 이벤트는 삽입되는 DNA에 바로 인접하는 상기 인접하는 계놈 서열 사이에 삽입된 이중성 DNA를 포함한다. 이들 인접하는 서열의 전부 또는 일부는 이벤트를 포함하는 모 식물주의 유성 교배의 결과로서 삽입된 DNA를 수용하는 자손체로 전달될 것으로 예상될 수 있다.

[0081] 본 발명은 본 발명의 식물의 재생가능한 세포의 조직 배양액을 포함한다. 또한, 상기 조직 배양액으로부터 재배된 식물이 포함되고, 특히 상기 식물은 예시된 변종의 모든 형태학적 및 생리학적 특성을 발현할 수 있다. 본 발명의 바람직한 식물은 기탁된 종자로부터 성장한 식물의 모든 생리학적 및 형태학적 특징을 갖는다. 본 발명은 추가로 상기 종자 및 관심있는 품질 형질을 갖는 종자를 포함한다.

[0082] 식물 또는 종자, 또는 그의 일부의 조각 (예컨대 돌연변이, 추가의 형질감염, 및 추가의 육종)은 "본질적으로 유래된" 변종으로 언급될 수 있는 것의 생성을 야기할 수 있다. 국제 식물 신품종 보호 연맹 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV))은 변종이 보호되는 변종으로부터 본질적으로 유래되었는지를 결정하기 위한 다음과 같은 지침을 제시하였다:

- [0083] [A] 변종은
- [0084] (i) 변종이 초기 변종의 유전자형 또는 유전자형의 조합에 의해 생성된 본질적인 특징의 발현을 유지하면서, 초기 변종으로부터, 또는 그 자체가 초기 변종으로부터 우세하게 유래된 변종으로부터 우세하게 유래되고;
- [0085] (ii) 변종이 초기 변종으로부터 분명하게 구분가능하고;
- [0086] (iii) 유도과정의 작용에 의한 차이를 제외하고, 변종이 초기 변종의 유전자형 또는 유전자형의 조합에 의해 생성된 본질적인 특징의 발현에서 초기 변종과 일치할 때,
- [0087] 또 다른 변종 ("초기 변종")으로부터 본질적으로 유래된 것으로 인정될 것이다.
- [0088] (UPOV, Sixth Meeting with International Organizations, Geneva, Oct. 30, 1992; Office of the Union에 의해 작성된 문헌).
- [0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, "식물주"는 적어도 하나의 형질에 대해 개체 사이에 유전적 변이를 거의 또는 전혀 보이지 않는 식물의 군이다. 상기 식물주는 몇몇 세대의 자가 수분 및 선택, 또는 조직 또는 세포 배양 기술을 사용하여 단일 모체로부터의 영양 번식에 의해 생성될 수 있다.
- [0090] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "재배종" 및 "변종"은 동의어이고, 상업적인 생산을 위해 사용되는 식물주를 의미한다.
- [0091] "안정화" 또는 "안정한"은 주어진 성분에 대해, 성분이 세대에 걸쳐, 바람직하게는 적어도 3세대 동안 실질적으로 동일한 수준, 예를 들어, 바람직하게는 $\pm 15\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 10\%$, 가장 바람직하게는 $\pm 5\%$ 로 유지됨을 의미한다. 안정성은 온도, 위치, 스트레스 및 식재 시기에 의해 영향받을 수 있다. 재배지 조건 하에서 후속 세대의 비교는 성분들을 유사한 방식으로 생산하여야 한다.
- [0092] "상업적 유용성"은 작물이 통상적인 농업 장비를 사용하여 경작자에 의해 생산될 수 있고 통상적인 압착 및 추출 장비를 사용하여 설명된 성분을 갖는 오일을 종자로부터 추출할 수 있도록 우수한 식물 성장력 및 높은 생식력을 갖는 것으로 규정된다. 상업적으로 유용하기 위해, 종자 중량, 오일 함량, 및 에이커당 총 오일 생산에 의해 측정되는 수율은 동일한 영역에서 성장한 아주 가치있는 형질이 없는 다른 대등한 상업적인 대두 변종의 평균 수율의 15% 내이다.
- [0093] "작물학상 엘리트"는 식물주가 본 발명의 이벤트(들)에 의한 제초제 내성 이외에, 바람직한 작물 특징, 예컨대 수율, 성숙도, 질병 저항성 등을 갖는다는 것을 의미한다. 본 발명의 이벤트를 포함하는 식물에서 아래 실시예에 제시되는 바와 같이 개별적으로 또는 임의의 조합으로 취한 작물학상 형질은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 임의의 및 모든 이들 작물 특징 및 데이터 점은 상기 식물을 규정하기 위해 사용되는 특징 범위의 특정 지점에서 또는 어느 한 말단 또는 양 말단에서 상기 식물을 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0094] 통상의 기술자가 본 개시내용에 비추어 알 수 있는 바와 같이, 검출 키트의 바람직한 실시양태는 예를 들어 "연결 서열" 또는 "전이 서열" (대두 계놈 인접 서열이 삽입체 서열을 만나는 경우에)에 대해 작용하는 및/또는 이들을 포함하는 프로브 및/또는 프라이머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이것은 표 1에 나타낸 바와 같이 연결 서열 (삽입체가 인접하는 서열을 만나는 경우에)의 하나 또는 둘 모두를 확인하기 위해 설계된 폴리뉴클레오티드 프로브, 프라이머, 및/또는 앰플리콘을 포함한다. 하나의 통상적인 설계는 인접하는 영역에서 혼성화하는 하나의 프라이머, 및 삽입체에서 혼성화하는 하나의 프라이머를 갖는 것이다. 상기 프라이머의 길이는 종종 각각 약 적어도 15개 잔기이다. 상기 정렬을 사용하여, 프라이머는 본 발명의 이벤트의 존재를 나타내는 검출가능한 앰플리콘을 생성/증폭하기 위해 사용될 수 있다. 이들 프라이머는 상기 나타낸 바와 같은 연결 서열에 걸치는 (및 이를 포함하는) 앰플리콘을 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0095] 인접하는 서열에서 "터치 다운하는 (touching down)"하는 프라이머(들)은 일반적으로 약 200개 염기를 넘어서 또는 연결부를 넘어서 혼성화하도록 설계되지 않는다. 따라서, 일반적인 인접하는 프라이머는 삽입체의 개시부로부터 인접하는 서열 내로의 200개 염기 내의 어느 한 가닥의 적어도 15개의 잔기를 포함하도록 설계될 것이다. 즉, 상기 확인된 연결 서열의 하나 또는 둘 모두로부터 100 내지 200-500개 염기 내의 잔기로부터의 적절한 크기의 (또는 잔기에 혼성화하는) 서열을 포함하는 프라이머가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 삽입체 프라이머는 마찬가지로 삽입체 상의 임의의 부위에 대해 설계될 수 있지만, 상기 확인된 연결 서열(들)로부터 100 내지 200-500개 염기 내의 삽입체 상의 잔기 (상보체 포함) 상의 잔기가 상기 프라이머 설계를 위해, 예를 들어 비-배타적으로 사용될 수 있다.

- [0096] 통상의 기술자는 또한 프라이머 및 프로브가 다양한 표준 혼성화 및/또는 PCR 조건 하에서 본원에 예시된 서열의 절편 (또는 그의 상보체)에 혼성화하도록 설계될 수 있고, 여기서 프라이머 또는 프로브는 예시된 서열에 완전히 상보성이지 않음을 알 것이다. 즉, 어느 정도의 미스매치 (mismatch)가 허용될 수 있다. 약 20개 뉴클레오타이드의 프라이머에 대해, 예를 들어, 일반적으로 하나 또는 두 개 정도의 뉴클레오타이드는, 미스매치된 염기가 내부에 존재하거나 또는 앰플리콘의 반대편의 프라이머의 말단부에 존재할 경우, 반대편의 가닥에 결합할 필요는 없다. 다양한 적절한 혼성화 조건이 아래에 제공된다. 합성 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 이노신도 프로브에 사용될 수 있다. 펩티드 핵산 (PNA) 프로브, 및 DNA 및 RNA 프로브도 사용될 수 있다. 중요한 것은 상기 프로브 및 프라이머가 본 발명의 이벤트의 존재를 판단하는 근거가 된다는 (특유하게 확인하고 구별할 수 있다는) 것이다.
- [0097] PCR 증폭시의 오류가 발생할 수 있고, 이것은 예를 들어 작은 서열결정 오류를 야기할 수 있음을 유의하여야 한다. 즉, 달리 지시하지 않으면, 본원에 나열된 서열은 대두 게놈 DNA로부터 긴 앰플리콘을 생성한 후, 및 앰플리콘을 클로닝하고 서열결정함으로써 결정되었다. 게놈 DNA로부터 서열결정을 위한 충분한 앰플리콘을 생성하기 위해 필요한 많은 라운드의 증폭을 고려할 때, 상기 방식으로 생성되고 결정된 서열에서 경미한 차이 및 작은 불일치를 발견하는 것은 드물지 않다. 통상의 기술자는 이러한 종류의 통상적인 서열결정 오류 또는 불일치 때문에 필요한 임의의 조정이 본 발명의 범위 내에 포함됨을 알아야 하고, 통지를 받아야 한다.
- [0098] 또한, 예를 들어 서열이 이벤트의 생성 동안 삽입될 때 몇몇의 게놈 서열이 결실되는 것은 드물지 않음을 유의해야 한다. 따라서, 몇몇의 차이가 또한 예를 들어 본 발명의 인접 서열과 켄뱅크에 나열된 게놈 서열 사이에 나타날 수 있다.
- [0099] "삽입체"의 성분은 도면에 제시되고, 아래 실시예에서 보다 상세하게 논의된다. 이들 성분의 DNA 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 그의 단편은 본 발명의 방법에서 DNA 프라이머 또는 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0100] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 대두 식물로부터의 식물 및 종자 등에서 도입유전자/게놈 삽입 영역의 존재를 검출하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 본원에서 제공되는 본 발명의 도입유전자/게놈 삽입 영역 연결 서열, 본원에서 확인된 연결 서열을 포함하는 절편, 및 임의의 상기 예시된 서열의 상보체 및 그의 임의의 절편을 포함하는 DNA 서열이 제공된다. 삽입 영역 연결 서열은 게놈 내로 삽입된 이종성 DNA와 삽입 부위에 인접하는 대두 세포로부터의 DNA 사이의 연결부에 걸친다. 상기 서열은 제시된 이벤트에 대한 판단 근거가 될 수 있다.
- [0101] 이들 삽입체 및 경계 서열을 기초로 하여, 이벤트-특이적 프라이머를 생성할 수 있다. PCR 분석은 본 발명의 대두 식물주가 이들 이벤트-특이적 프라이머 세트를 사용하여 생성된 PCR 앰플리콘의 분석에 의해 상이한 대두 유전자형에서 확인될 수 있음을 보여주었다. 이들 및 다른 관련 절차는 이들 대두 식물주를 특유하게 확인하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 프라이머 쌍으로부터 유래된 PCR 앰플리콘은 특유하고, 이들 대두 식물주를 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 신규한 도입유전자/게놈 삽입 영역의 연속적인 단편을 포함하는 DNA 서열은 본 발명의 측면이다. 도입유전자 삽입체 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 하나 이상의 상기 언급한 대두 식물로부터의 대두 게놈 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 하나 이상의 이들 대두 식물에 대한 판단 근거가 되는 앰플리콘 생성물의 생산을 위한 프라이머 서열로서 유용한 서열을 포함하는 DNA 서열이 포함된다.
- [0103] 관련 실시양태는 본원에서 확인된 DNA 서열의 도입유전자 부분의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개, 또는 그 초과인 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 서열, 또는 그의 상보체, 및 이들 서열로부터의 유사한 길이의 인접하는 대두 DNA 서열 (예컨대 서열 1 및 서열 2 및 그의 절편), 또는 그의 상보체에 관한 것이다. 상기 서열은 DNA 증폭 방법에서 DNA 프라이머로서 유용하다. 이들 프라이머를 사용하여 생산된 앰플리콘은 본원에서 언급되는 임의의 대두 이벤트에 대한 판단 근거가 된다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 DNA 프라이머 및 상동성 프라이머에 의해 생산된 앰플리콘을 포함한다.
- [0104] 본 발명은 또한 본원에서 언급되는 대두 이벤트에 대응하는 DNA의 존재를 샘플에서 검출하는 방법을 포함한다. 그러한 방법은 (a) DNA를 포함하는 샘플을, 이들 대두 이벤트 중의 적어도 하나로부터의 DNA와의 핵산 증폭 반응에 사용될 때 상기 이벤트(들)에 대한 판단 근거가 되는 앰플리콘을 생산하는 프라이머 세트와 접촉시키고; (b) 핵산 증폭 반응을 수행하여 앰플리콘을 생산하고; (c) 앰플리콘을 검출하는 것을 포함할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 추가의 검출 방법은 상기 이벤트에 대응하는 DNA의 존재를 샘플에서 검출하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 (a) DNA를 포함하는 샘플을, 엄격한 혼성화 조건 하에 적어도 하나의 상기 대두 이벤트로부터의 DNA와

혼성화하지만 엄격한 혼성화 조건 하에 대조군 대두 식물 (비-관심있는 이벤트 DNA)과는 혼성화하지 않는 프로브와 접촉시키고; (b) 샘플 및 프로브를 엄격한 혼성화 조건에 적용하고; (c) DNA에 대한 프로브의 혼성화를 검출하는 것을 포함한다.

[0106] 또 다른 추가의 실시양태에서, 본 발명은 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 포함하는 대두 식물을 생산하는 방법을 포함하고, 여기서 상기 방법은 (a) 제1 모 대두 식물주 (상기 식물주의 식물에 상기 제초제 내성 형질을 부여하는, 본 발명의 발현 카세트를 포함함) 및 제2 모 대두 식물주 (상기 제초제 내성 형질이 결여됨)를 유성 교배하여 다수의 자손체 식물을 생산하고; (b) 분자 마커의 사용에 의해 자손체 식물을 선택하는 단계를 포함한다. 그러한 방법은 상기 제초제 내성 형질을 포함하는 진정한 육종 대두 식물을 생산하기 위해 자손체 식물에 제2 모 대두 식물주에 역교배하는 추가의 단계를 임의로 포함할 수 있다.

[0107] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 이벤트를 갖는 교배체의 자손체의 접합성을 결정하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대두 DNA를 포함하는 샘플을 본 발명의 프라이머 세트와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 프라이머는 적어도 하나의 상기 대두 이벤트로부터의 게놈 DNA와의 핵산 증폭 반응에 사용될 때, 적어도 하나의 상기 대두 이벤트에 대한 판단 근거가 되는 제1 앰플리콘을 생산한다. 그러한 방법은 핵산 증폭 반응을 수행하여 제1 앰플리콘을 생산하고; 제1 앰플리콘을 검출하고; 대두 DNA를 포함하는 샘플을 상기 프라이머 세트와 접촉시키고 (상기 프라이머 세트는 대두 식물로부터의 게놈 DNA와의 핵산 증폭 반응에 사용될 때, 대두 게놈 영역에 상동성인 천연 대두 게놈 DNA를 포함하는 제2 앰플리콘을 생산함); 핵산 증폭 반응을 수행하여 제2 앰플리콘을 생산하는 것을 추가로 포함한다. 이 방법은 제2 앰플리콘을 검출하고, 샘플 내의 제1 및 제2 앰플리콘을 비교하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 앰플리콘의 존재는 샘플이 도입유전자 삽입에 대해 이형접합성을 나타낸다.

[0108] DNA 검출 키트는 본원에 개시된 조성물 및 DNA 검출 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 개발될 수 있다. 키트는 샘플 내의 본 발명의 대두 이벤트 DNA의 확인에 유용하고, 상기 DNA를 함유하는 대두 식물의 육종 방법에 적용될 수 있다. 키트는 예를 들어 본원에 개시된 앰플리콘에 상동성 또는 상보성인 DNA 서열, 또는 본 발명의 이벤트의 도입유전자 유전 요소에 함유된 DNA에 상동성 또는 상보성인 DNA 서열을 함유한다. 이들 DNA 서열은 DNA 증폭 반응에 또는 DNA 혼성화 방법에서 프로브로서 사용될 수 있다. 키트는 또한 검출 방법의 수행에 필요한 시약 및 물질을 함유할 수 있다.

[0109] "프로브"는 통상적인 검출가능한 표지 또는 리포터 분자 (예컨대 방사성 동위원소, 리간드, 화학발광제, 또는 효소)가 부착된 단리된 핵산 분자이다. 상기 프로브는 표적 핵산의 한 가닥에, 본 발명의 경우에, 대두 식물로부터 또는 이벤트로부터의 DNA를 포함하는 샘플로부터 유래된 것인지 상관하지 않고 상기 대두 이벤트 중의 하나로부터의 게놈 DNA의 가닥에 상보성이다. 본 발명에 따른 프로브는 데옥시리보핵산 또는 리보핵산뿐만 아니라, 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하고 그 표적 DNA 서열의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있는 폴리아미드 및 다른 프로브 물질을 포함한다. "단리된" 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 폴리뉴클레오티드가 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 비-천연 상태로 존재함을 함축한다. "정제된" 단백질은 유사하게 단백질이 비-천연 상태로 존재함을 함축한다.

[0110] "프라이머"는 핵산 혼성화에 의해 상보성 표적 DNA에 어닐링되어 프라이머와 표적 DNA 가닥 사이에 혼성체를 형성한 후, 증합효소, 예를 들어, DNA 증합효소에 의해 표적 DNA 가닥을 따라 연장되는 단리/합성된 핵산이다. 본 발명의 프라이머 쌍은 예를 들어 증합효소 연쇄 반응 (PCR) 또는 다른 통상적인 핵산 증폭 방법에 의한 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 그의 용도를 나타낸다.

[0111] 프로브 및 프라이머의 길이는 일반적으로 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237,

238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 또는 500개 폴리뉴클레오티드 또는 그 초과이다. 상기 프로브 및 프라이머는 고 엄격성 혼성화 조건 하에서 표적 서열에 특이적으로 혼성화한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 프로브 및 프라이머는 표적 서열과 완전한 서열 유사성을 갖지만, 표적 서열과 상이하고 표적 서열에 혼성화하는 능력을 보유하는 프로브가 통상적인 방법에 의해 설계될 수 있다.

[0112] 프로브 및 프라이머의 제조 및 사용 방법은 예를 들어 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]에 기재되어 있다. PCR-프라이머 쌍은 예를 들어 그 목적이 의도되는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 공지된 서열로부터 유래될 수 있다.

[0113] 본원에 개시된 인접 DNA 및 삽입체 서열을 기초로 한 프라이머 및 프로브는 통상적인 방법, 예를 들어 개시된 서열의 재-클로닝 및 서열결정에 의해 상기 서열을 확인 (및 필요한 경우에 정정)하기 위해 사용될 수 있다.

[0114] 본 발명의 핵산 프로브 및 프라이머는 엄격한 조건 하에 표적 DNA 서열에 혼성화한다. 임의의 통상적인 핵산 혼성화 또는 증폭 방법이 샘플에서 트랜스체인 이벤트로부터의 DNA의 존재를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 핵산 분자 또는 그의 단편은 특정 상황 하에서 다른 핵산 분자에 특이적으로 혼성화할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 핵산 분자는 2개의 분자가 역평행 (anti-parallel) 이중-가닥 핵산 구조를 형성할 수 있다면 서로 특이적으로 혼성화할 수 있다고 언급된다. 핵산 분자는 완전한 상보성을 보인다면 또 다른 핵산 분자의 "상보체"인 것으로 언급된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 분자는 한 분자의 모든 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드에 상보성일 때 "완전한 상보성"을 보인다고 언급된다. 2개의 분자는 이들이 적어도 통상적인 "저-엄격성" 조건 하에서 서로 어닐링된 상태로 유지되도록 하기에 충분한 안정성으로 서로 혼성화할 수 있다면 "최소 상보성"인 것으로 언급된다. 유사하게, 분자는 통상적인 "고-엄격성" 조건 하에서 서로 어닐링된 상태로 유지되도록 하기에 충분한 안정성으로 서로 혼성화할 수 있다면 "상보성"인 것으로 언급된다. 통상적인 엄격성 조건은 문헌 [Sambrook et al., 1989]에 기재되어 있다. 따라서, 완전한 상보성으로부터의 이탈이 이중-가닥 구조를 형성하는 분자의 능력을 완전히 제거하지 않는다면 상기 이탈은 허용될 수 있다. 핵산 분자가 프라이머 또는 프로브로서 기능하기 위해서, 사용되는 특정 용매 및 염 농도 하에서 안정한 이중-가닥 구조를 형성할 수 있도록 단지 서열이 충분히 상보성일 것만을 필요로 한다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, 실질적으로 상동성인 서열은 고 엄격성 조건 하에 비교되는 핵산 서열의 상보체에 특이적으로 혼성화할 핵산 서열이다. 용어 "엄격한 조건"은 문헌 [Sambrook et al., 1989, at 9.52-9.55]에 논의된 특이적 혼성화 절차에 의해 표적 핵산 (즉, 관심있는 특정 핵산 서열)에 대한 핵산 프로브의 혼성화에 대해 기능적으로 규정된다. 또한, 문헌 [Sambrook et al., 1989 at 9.47-9.52 및 9.56-9.58]을 참조한다. 따라서, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 DNA 단편의 상보성 스트레치 (stretch)와 이중체 분자를 선택적으로 형성하는 그의 능력을 위해 사용될 수 있다.

[0116] 고려되는 용도에 따라, 표적 서열에 대한 프로브의 상이한 정도의 선택도를 달성하기 위해 상이한 혼성화 조건을 사용할 수 있다. 높은 선택도를 필요로 하는 용도를 위해, 일반적으로 혼성체를 형성하기 위해 비교적 엄격한 조건을 사용할 것이고, 예를 들어, 중점 TAQMAN 및 실시간 PCR 용도에 대해 약 60°C 내지 약 75°C의 온도에서 1.5 mM 내지 약 4.0 mM MgCl₂를 선택할 것이고, 엄격성 증가를 위해 본원에서 설명되는 체류 시간을 변경할 수 있다. 다른 혼성화 기술을 위해, 일반적으로, 예컨대 약 50°C 내지 약 70°C의 온도에서 약 0.02 M 내지 약

0.15 M NaCl에 의해 제공되는 비교적 낮은 염 및/또는 고온 조건을 사용할 것이다. 엄격한 조건은 예를 들어 혼성화 필터를 고-엄격성 세척 완충제 (0.2X SSC, 0.1% SDS, 65°C)를 사용하여 적어도 2회 세척하는 것을 수반할 수 있다. DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄격성 조건, 예를 들어 약 45°C의 6.0X 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC), 이어서 50°C의 2.0X SSC 세척은 통상의 기술자에게 알려져 있다. 예를 들어, 세척 단계에서의 염 농도는 50°C의 약 2.0X SSC의 저 엄격성 내지 50°C의 약 0.2X SSC의 고 엄격성으로부터 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는 실온, 약 22°C의 저 엄격성 조건으로부터 약 65°C의 고 엄격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도 및 염은 모두 변경될 수 있거나, 또는 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지하면서 다른 변수는 변경될 수 있다. 그러한 선택 조건은 프로브와 주형 또는 표적 가닥 사이의 미스매치를 거의 허용하지 않는다. 혼성화를 통한 DNA 서열의 검출은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있고, 미국 특허 4,965,188 및 5,176,995의 개시내용은 예시적인 혼성화 분석 방법이다.

[0117] 특허 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 고 엄격성 조건 하에 그의 상보체 및 단편을 포함하는 본원에 예시되거나 제시된 하나 이상의 프라이머 (또는 앰플리콘 또는 다른 서열)에 특이적으로 혼성화할 것이다. 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 마커 핵산 분자는 예시된 서열 중의 하나에서 본원에 제시된 핵산 서열, 또는 그의 상보체 및/또는 단편을 갖는다.

[0118] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 마커 핵산 분자는 상기 핵산 서열과 80% 내지 100% 또는 90% 내지 100% 서열 동일성을 공유한다. 본 발명의 추가의 측면에서, 본 발명의 마커 핵산 분자는 상기 서열과 95% 내지 100% 서열 동일성을 공유한다. 상기 서열은 유전적 교배체의 자손체를 확인하기 위해 식물 육종 방법에서 마커로서 사용될 수 있다. 표적 DNA 분자에 대한 프로브의 혼성화는 통상의 기술자에게 알려진 임의의 많은 방법에 의해 검출될 수 있고, 이들은 형광 태그, 방사성 태그, 항체 기반 태그, 및 화학발광 태그를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0119] 특정 증폭 프라이머 쌍을 사용한 표적 핵산 서열의 증폭 (예를 들어, PCR에 의한)에 대해, "엄격한 조건"은 프라이머 쌍이, 상응하는 야생형 서열 (또는 그의 상보체)을 갖는 프라이머가 결합하는 표적 핵산 서열에만 혼성화하고 바람직하게는 특유한 증폭 생성물, 앰플리콘을 생산하도록 허용하는 조건이다.

[0120] 용어 "(표적 서열)에 대해 특이적인"은 프로브 또는 프라이머가 엄격한 혼성화 조건 하에 표적 서열을 포함하는 샘플 내의 표적 서열에만 혼성화함을 나타낸다.

[0121] 본원에서 사용되는 바와 같이, "증폭된 DNA" 또는 "앰플리콘"은 핵산 주형의 일부인 표적 핵산 서열의 핵산 증폭 생성물을 의미한다. 예를 들어, 유성 교배에 의해 생성된 대두 식물이 본 발명의 대두 식물로부터의 트랜스 제닉 이벤트 게놈 DNA를 함유하는지 결정하기 위해, 대두 식물 조직 샘플로부터 추출된 DNA는 삽입된 이종성 DNA의 삽입 부위에 인접한 식물의 게놈 내의 인접하는 서열로부터 유래된 프라이머, 및 이벤트 DNA의 존재에 대한 판단 근거가 되는 앰플리콘을 생산하기 위해 삽입된 이종성 DNA로부터 유래된 제2 프라이머를 포함하는 프라이머 쌍을 사용한 핵산 증폭 방법에 적용될 수 있다. 앰플리콘은 또한 이벤트에 대한 판단 근거가 되는 길이 및 서열을 갖는다. 앰플리콘의 길이의 범위는 프라이머 쌍 + 하나의 뉴클레오타이드 염기쌍의 조합된 길이, 및/또는 프라이머 쌍 + 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358,

359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 또는 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000개, 또는 그 초과와 뉴클레오티드 염기쌍 (± 상기 나열한 임의의 증분)의 조합된 길이일 수 있다. 별법으로, 프라이머 쌍은 전체 삽입체 뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘을 생산하기 위해 삽입된 DNA의 양 측면 상의 인접하는 서열로부터 유래될 수 있다. 식물 게놈 서열로부터 유래된 프라이머 쌍의 멤버는 삽입된 DNA 서열로부터 일정 거리에 위치할 수 있다. 상기 거리는 하나의 뉴클레오티드 염기쌍으로부터 약 2만 개 이하의 뉴클레오티드 염기쌍까지의 범위일 수 있다. 용어 "앰플리콘"의 사용은 DNA 열 증폭 반응에서 형성될 수 있는 프라이머 이량체를 구체적으로 제외한다.

[0122] 핵산 증폭은 증합효소 연쇄 반응 (PCR)을 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 다양한 핵산 증폭 방법에 의해 달성될 수 있다. 다양한 증폭 방법이 당업계에 공지되어 있고, 특히 미국 특허 4,683,195 및 미국 특허 4,683,202에 기재되어 있다. PCR 증폭 방법은 22 kb 이하의 게놈 DNA를 증폭하기 위해 개발되었다. 이들 방법 및 당업계에 공지된 다른 DNA 증폭 방법이 본 발명의 실행시에 사용될 수 있다. 이종성 도입유전자 DNA 삽입체의 서열 또는 본 발명의 대두 이벤트로부터의 인접하는 게놈 서열은 본원에서 제시되는 서열로부터 유래된 프라이머를 사용하여 이벤트로부터의 상기 서열을 증폭한 후, PCR 앰플리콘 또는 클로닝된 DNA의 표준 DNA 서열결정에 의해 확인 (및 필요한 경우 정정)될 수 있다.

[0123] 이들 방법에 의해 생산된 앰플리콘은 다수의 기술에 의해 검출될 수 있다. 아가로스 겔 전기영동 및 에티뮴 브로마이드를 사용한 염색은 DNA 앰플리콘을 검출하는 일반적인 공지된 방법이다. 또 다른 상기 방법은 이웃하는 인접 게놈 DNA 서열 및 삽입된 DNA 서열 둘 모두와 중첩되는 DNA 올리고뉴클레오티드가 설계되는 제네틱 비트 (Genetic Bit) 분석이다. 올리고뉴클레오티드는 마이크로웰 플레이트의 웰에 고정된다. 관심있는 영역의 PCR (삽입된 서열에 하나의 프라이머 및 이웃하는 인접 게놈 서열에 하나의 프라이머를 사용) 후에, 단일-가닥 PCR 생성물은 고정된 올리고뉴클레오티드에 혼성화하고, DNA 증합효소 및 예상되는 다음 염기에 특이적인 표지된 ddNTP를 사용한 단일 염기 연장 반응을 위한 주형으로서 기능할 수 있다. 판독은 형광 또는 ELISA를 기초로 할 수 있다. 신호는 성공적인 증폭, 혼성화, 및 단일 염기 연장에 의한 삽입체/인접하는 서열의 존재를 나타낸다.

[0124] 또 다른 방법은 문헌 [Winge, Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000]에 기재된 바와 같은 파이러씨퀀싱 (Pyrosequencing) 기술이다. 상기 방법에서, 이웃하는 게놈 DNA 및 삽입체 DNA 연결부와 중첩되는 올리고뉴클레오티드가 설계된다. 올리고뉴클레오티드는 관심있는 영역으로부터의 단일-가닥 PCR 생성물 (삽입된 서열에 하나의 프라이머 및 인접 게놈 서열에 하나의 프라이머)에 혼성화하고, DNA 증합효소, ATP, 술폰릴라제, 루시페라제, 아피라제, 아데노신 5' 포스포술폰레이트 및 루시페린의 존재 하에 인큐베이션된다. dNTP를 개별적으로 첨가하고, 통합은 광 신호의 측정을 유발한다. 광 신호는 성공적인 증폭, 혼성화, 및 단일 또는 다중-염기 연장에 의한 도입유전자 삽입체/인접하는 서열의 존재를 나타낸다.

[0125] 형광 편광은 본 발명의 앰플리콘을 검출하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 방법이다. 상기 방법에 따르면, 게놈 인접하는 및 삽입된 DNA 연결과 중첩되는 올리고뉴클레오티드가 설계된다. 올리고뉴클레오티드는 관심있는 영역으로부터의 단일-가닥 PCR 생성물 (삽입된 DNA에 하나의 프라이머 및 인접 게놈 DNA 서열에 하나의 프라이머)에 혼성화하고, DNA 증합효소 및 형광-표지된 ddNTP의 존재 하에 인큐베이션된다. 단일 염기 연장은 ddNTP의 통합을 유도한다. 통합은 형광계를 사용하여 편광의 변화로서 측정될 수 있다. 편광의 변화는 성공적인 증폭, 혼성화, 및 단일 염기 연장에 의한 도입유전자 삽입체/인접하는 서열의 존재를 나타낸다.

[0126] TAQMAN (피어 어플라이드 바이오시스템즈 (PE Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티)은 DNA 서열의 존재를 검출하고 정량하는 방법이다. 간단히 설명하면, 게놈 인접하는 및 삽입체 DNA 연결과 중첩되는 FRET 올리고뉴클레오티드 프로브가 설계된다. FRET 프로브 및 PCR 프라이머 (삽입체 DNA에 하나의 프라이머 및 인접 게놈 서열에 하나의 프라이머)를 열안정성 증합효소 및 dNTP의 존재 하에 사이클링시킨다. 특이적인 증폭 동안, Taq DNA 증합효소는 FRET 프로브 상의 켄칭 (quenching) 모이어티로부터 형광 모이어티를 청소하고 방출한다. 형광 신호는 성공적인 증폭 및 혼성화에 의한 인접하는/도입유전자 삽입체 서열의 존재를 나타낸다.

- [0127] 분자 비콘 (Molecular Beacon)은 서열 검출에서의 용도에 대해 설명되었다. 간단히 설명하면, 인접하는 게놈 및 삽입체 DNA 연결과 중첩되는 FRET 올리고뉴클레오타이드 프로브가 설계된다. FRET 프로브의 특유한 구조는 형광 및 켄칭 모이어티를 아주 근접하게 유지시키는, 그를 함유하는 2차 구조를 생성한다. FRET 프로브 및 PCR 프라이머 (삽입체 DNA 서열에 하나의 프라이머 및 인접 게놈 서열에 하나의 프라이머)를 사이클링시킨다. 성공적인 PCR 증폭 후에, 표적 서열에 대한 FRET 프로브의 혼성화는 프로브 2차 구조를 제거하고 형광 및 켄칭 모이어티를 공간적으로 분리시킨다. 형광 신호가 생성된다. 형광 신호는 성공적인 증폭 및 혼성화에 의한 인접하는 게놈/도입유전자 삽입체 서열의 존재를 나타낸다.
- [0128] 삽입에 매우 우수한 대두 게놈 내의 위치를 개시하였기 때문에, 본 발명은 또한 상기 게놈 위치에 또는 그 근처 주위에 적어도 하나의 비-aad12/pat/2mepsps 코딩 서열을 포함하는 대두 종자 및/또는 대두 식물을 포함한다. 한 방법은 본원에서 예시된 삽입체를 상이한 삽입체로 치환하는 것이다. 이들과 전반적으로 관련하여, 표적화된 상동성 재조합이 예를 들어 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 상기 종류의 기술은 예를 들어 WO 03/080809 A2 및 상응하는 U.S. 출원 공개 (U.S. 2003/0232410)의 주제이다. 따라서, 본 발명은 서열 1 및 서열 2로서 본원에서 확인된 인접하는 서열의 전부 또는 인식가능한 부분에 의해 인접된 이중성 삽입체 (예시된 삽입체의 다중 카피 대신에 또는 이와 함께)를 포함하는 식물 및 식물 세포를 포함한다. 예시된 삽입체 또는 임의의 그의 성분의 추가의 카피 (또는 추가의 카피들)이 또한 상기 방식(들)에서 삽입을 위해 표적화될 수 있다.
- [0129] 본원에서 언급되거나 인용되는 모든 특허, 특허 출원, 가출원, 및 공개는 본원의 명백한 개시내용과 모순되지 않는 정도로 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0130] 이하에서 본 발명을 실시하기 위한 절차를 예시하고 본 발명의 특정한 바람직한 실시양태를 예시하는 실시예가 제시된다. 이들 실시예는 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다. 통상의 기술자는 다음 실시예에 개시된 기술이 그의 실시예 바람직한 방식을 예시하기 위해 사용되는 구체적인 방법을 제시함을 이해하여야 한다. 그러나, 통상의 기술자는 본원의 개시내용에 비추어, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 동일하거나 유사한 결과를 계속 얻으면서 이들 구체적인 실시양태에 많은 변화가 이루어질 수 있음을 이해하여야 한다. 달리 나타내지 않으면, 모든 백분율은 중량 기준이고, 모든 용매 혼합물 비율은 달리 나타내지 않으면 부피 기준이다.
- [0131] 달리 나타내지 않으면 다음 약어를 사용한다.
- [0132] bp 염기쌍
- [0133] °C 섭씨 온도
- [0134] DNA 데옥시리보핵산
- [0135] DIG 디곡시게닌
- [0136] EDTA 에틸렌디아민테트라아세트산
- [0137] kb 킬로베이스
- [0138] μg 마이크로그램
- [0139] μl 마이크로리터
- [0140] mL 밀리리터
- [0141] M 몰 질량
- [0142] OLP 중첩 프로브
- [0143] PCR 중합효소 연쇄 반응
- [0144] PTU 식물 전사 단위
- [0145] SDS 나트륨 도데실 술페이트
- [0146] SOP 표준 작동 절차
- [0147] SSC 염화나트륨 및 시트르산나트륨의 혼합물을 포함하는 완충제 용액,
- [0148] pH 7.0

- [0149] TBE 트리스 (Tris) 염기, 붕산 및 EDTA의 혼합물을 포함하는 완충제 용
- [0150] 액, pH 8.3
- [0151] V 볼트
- [0152] **실시예**
- [0153] 실시예 1: 2mEPSPS 및 AAD-12 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 형질전환 및 선택
- [0154] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 함유하는 트랜스제닉 대두 (글리신 맥스)를 대두 자엽절 외식편의 아그로박테리움-매개 형질전환을 통해 생성하였다. T-가닥 DNA 영역 내에 선택가능 마커, pat v6, 및 관심있는 유전자, aad-12 v1 및 2mEPSPS v1을 함유하는 이원성 벡터 pDAB8264 (도 1)를 보유하는 디스암드 (disarmed) 아그로박테리움 균주 EHA101 (Hood et al., 1993)을 형질전환을 개시하기 위해 사용하였다.
- [0155] 아그로박테리움-매개 형질전환을 문헌 [Zeng et al. (2004)]의 변형된 절차를 사용하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 대두 종자 (cv 매버릭 (Maverick))를 기초 배지에 발아시키고, 자엽절을 단리하여 아그로박테리움으로 감염시켰다. 싹틔, 싹 성장, 및 발근 배지에 아그로박테리움의 제거를 위해 세포탁심, 티덴틴 및 반코마이신으로 보충하였다. 글루포시네이트 선택을 사용하여 비-형질전환된 싹의 성장을 억제하였다. 선택된 싹을 뿌리 발생을 위해 발근 배지로 옮긴 후, 묘목의 적응을 위해 토양 혼합물로 옮겼다.
- [0156] 선택된 묘목의 말단부의 작은 잎은 추정 형질전환체를 스크리닝하기 위해 글루포시네이트로 도포된 잎이었다. 스크리닝된 묘목을 온실로 옮겨 적응시킨 후, 내성을 재확인하기 위해 글루포시네이트로 잎을 도포하고, 추정 형질전환체로 간주하였다. 스크리닝된 식물의 샘플을 채취하고, 선택가능 마커 유전자 및/또는 관심있는 유전자의 확인을 위한 분자 분석을 수행하였다. T₀ 식물을 온실에서 자가수정시켜 T₁ 종자를 생성시켰다.
- [0157] 상기 이벤트, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 독립적인 형질전환된 단리물로부터 생성하였다. T₁ 식물을 역교배하고, 후속 세대에 걸쳐 엘리트 변종 내로 유전자 이입시켰다. 이벤트는 그의 특유한 특징, 예컨대 단일 삽입 부위, 정상적인 멘델 분리 및 안정적인 발현, 및 제초제 내성 및 작물 성능을 포함하는 매우 우수한 효능의 조합을 기초로 하여 선택되었다. 다음 실시예는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 특성을 규명하기 위해 사용된 데이터를 포함한다.
- [0158] 실시예 2: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 단백질 발현의 특성화
- [0159] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 발현된 재조합 AAD-12, 2mEPSPS 및 PAT 단백질의 생화학적 특성을 규명하였다. 정량적 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)은 단백질의 생화학적 특성을 규명하고 대두 이벤트에서 이들 단백질의 발현을 확인하기 위해 사용될 수 있는 당업계에서 공지된 생화학적 검정이다.
- [0160] 실시예 2.1: 식물 조직 내에서 PAT 단백질의 발현
- [0161] PAT 단백질의 수준을 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 결정하였다. 가용성의 추출가능한 PAT 단백질은 대두 잎 조직으로부터 정량적 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 방법을 사용하여 측정하였다.
- [0162] 대두 조직의 샘플을 시험 식물로부터 단리하고, 발현 분석을 위해 준비하였다. PAT 단백질은 1% 폴리비닐피롤리돈 (PVP)을 함유하는 세제 트윈(Tween)-20을 함유하는 포스페이트 완충 염수 용액 (PBST)을 사용하여 대두 식물 조직으로부터 추출하였다. 식물 조직을 원심분리하고; 수성 상청액을 수집하고, 필요한 경우에 적절한 완충제로 희석하고, PAT ELISA 키트를 샌드위치 (sandwich) 방식으로 사용하여 분석하였다. 키트를 제조자가 제안하는 프로토콜 (엔비롤로로지스 (Envirologix), 미국 메인주 포트랜드)에 따라 사용하였다. 상기 검정은 발현된 PAT 단백질을 측정하였다.
- [0163] 검출 분석은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 발현 안정성 및 유전성을 수직 (세대 사이) 및 수평 (세대 내의 혈통 (lineage) 사이) 둘 모두에서 조사하기 위해 수행하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 T₃ 내지 T₅ 세대에서, 발현은 안정하였고, 모든 혈통에 걸쳐 일관되었다.
- [0164] 실시예 2.2: 식물 조직에서 AAD-12 및 2mEPSPS 단백질의 발현
- [0165] AAD-12 및 2mEPSPS 단백질의 수준을 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 결정하였다. 가용성의 추출가능한 단백질은 대두 잎 조직으로부터 정량적 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 방법을 사용하여 측정하였다.
- [0166] 대두 조직의 샘플을 시험 식물로부터 단리하고, 발현 분석을 위해 준비하였다. AAD-12 및 2mEPSPS 단백질은 1%

소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 세제 트윈-20을 함유하는 포스페이트 완충 염수 용액 (PBST)을 사용하여 대두 식물 조직으로부터 추출하였다. 식물 조직을 원심분리하고; 수성 상청액을 수집하고, 필요한 경우에 적절한 완충제로 희석하고, 각각 AAD-12 및 GA21 ELISA 키트를 샌드위치 방식으로 사용하여 분석하였다. 키트를 제조자가 제안하는 프로토콜 (AAD-12: 카탈로그 번호 20-0161, 비콘 어널리티컬 시스템즈, 인크. (Beacon Analytical Systems, Inc., 미국 메인주 사코)); 2mEPSPS: 카탈로그 #7020100, 스트래티직 다이아그노스틱스 (Strategic Diagnostics, 미국 델라웨어주 뉴어크))에 따라 사용하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 T₄ 내지 T₆ 세대 에서, AAD-12 및 2mEPSPS 발현은 안정하였고, 모든 혈통에 걸쳐 일관되었다.

[0167] 실시예 2.3: 발현 효능 연구

[0168] V3 식물기에서 재배지 발현 수준 연구를 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대해 수행하였다. 발현 수준 연구는 모든 분무된 처리에 대해 및 비분무된 구획에 대해 수행하였다. 이들 실험은 이전에 설명된 프로토콜을 사용하여 완료하였다. 발현 값은 모든 분무된 처리에 대해 및 제초제의 조합으로 분무된 및 비분무된 구획에 대해 유사하였다 (표 2). 식물에 대한 유의한 손상은 임의의 연구 시점에서 관찰되지 않았다.

표 2

[0169] 단백질 발현 연구에 사용된 제초제 처리 및 제초제의 농도

처리 번호	처리 종류
1	비분무
2	글루포시네이트, 822g ae/ha
3	2,4-D 2240g ae/ha
4	글리포세이트 2240g ae/ha
5	글리포세이트 + 2,4-D, 각각 1120g ae/ha
6	글리포세이트 + 2,4-D, 각각 2240g ae/ha

[0170] 실시예 3: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 삽입체 및 인접하는 경계 영역 내의 DNA 서열의 클로닝 및 특성화

[0171] 계놈 삽입 부위를 특성화하고 설명하기 위해서, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 인접하는 계놈 T-DNA 경계 영역의 서열을 결정하였다. 1,246 bp의 5' 인접 경계 서열 (서열 1), 및 504 bp의 3' 인접 경계 서열 (서열 2)을 포함하는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 계놈 서열이 확인되었다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 경계 서열을 기초로 한 PCR 증폭은 경계 영역이 대두에서 기원하고, 연결 영역이 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 특유한 서열임을 입증하였다. 연결 영역은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 이벤트-특이적 확인을 위해 사용될 수 있다. 추가로, T-가닥 삽입 부위는 야생형의 비형질전환된 대두의 계놈으로부터 확인된 인접하는 경계 서열의 영역에 대응하는 계놈 단편을 증폭함으로써 특성화되었다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 야생형 계놈 서열과 비교함으로써 원래의 유전자좌로부터 약 38 bp 결실이 밝혀졌다. 전체적으로, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 삽입체 및 경계 서열의 특성화는 T-가닥의 무손상 (intact) 카피가 대두 계놈에 존재함을 나타내었다.

표 3

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 대두 게놈 DNA의 확인에 사용된 프라이머의 목록 및 그의 서열.

서열 번호:	프라이머 명칭	크기 (bp)	서열 (5'에서 3'으로)	목적
서열:3	4232-WF1	25	GATTCTGCATCATT ATGACCAGG	ED_v1_C1과 함께 사용된, 5' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:4	4232-WF3	25	TGTAATGCTTCACA ACATGAGTCA	ED_v1_C와 함께 사용된, 5' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:5	4232-WF4	25	ATGTAATGCTTCAC AACATGAGTC	ED_v1_C1과 함께 사용된, 5' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:6	4232-WR1	26	TTTCTACAGCTAGCA CAACAAGACCT	PAT_11과 함께 사용된, 3' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:7	4232-WR2	28	CGTATCTGATACTAA CCAGTTCGAATTC	PAT_11과 함께 사용된, 3' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:8	4232-WR3	25	AAGAGATACGAAGCG TTTCGCTATT	PAT_11과 함께 사용된, 3' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:9	4232-WR4	26	AAACACTACTACCAG AAACCAAGTGT	PAT_11과 함께 사용된, 3' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:10	ED_v1_C1	26	GAGTAAAGGAGACCG AGAGGATGGTT	4232-WF1, 4232-WF3 또는 4232-WF4와 함께 사용된, 5' 경계 게놈 DNA의 확인
서열:11	PAT_11	24	ACAGAGCCACAAACA CCACAAGAG	4232-WR1, 4232-WR2, 4232-WR3 또는 4232-WR4와 함께 사용된, 3' 경계 게놈 DNA의 확인

[0172]

표 4

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 경계 영역 및 이벤트-특이적 서열의

표준 PCR 증폭을 위한 조건

표적 서열	프라이머 세트	PCR 혼합물	예비변성 (°C/min)	변성 (°C/sec.)	어닐링 (°C/sec.)	연장 (°C/min:sec)	최종 연장 (°C/min)
5' 경계	4232-WF1/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
5' 경계	4232-WF3/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
5' 경계	4232-WF4/ED_v1_C1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
3' 경계	4232-WR1/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
3' 경계	4232-WR2/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
3' 경계	4232-WR3/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
3' 경계	4232-WR4/PAT_11	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
삽입체 유전자좌에 걸친	4232-WF1/4232-WR1	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			
삽입체 유전자좌에 걸친	4232-WF1/4232-WR2	D	95/3	98/10	63/30	68/4:00	72/10
				32 사이클			

[0173]

표 5

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에서 경계 영역 및 이벤트 특이적 서열의 표준 PCR 증폭을 위한 PCR 혼합물

PCR 혼합물 A		PCR 혼합물 B	
시약	1 x 반응 (μL)	시약	1 x 반응 (μL)
H2O	0.8	H2O	14.6
AccPrime pfx SuperMix	20	10X LA Taq 완충제	2
---	---	MgCl ₂ (25mM)	0.6
---	---	dNTP (2.5μM)	1.6
10μM 프라이머	0.2	10μM 프라이머	0.1
gDNA 소화	1	gDNA 소화	1
---	---	LA Taq (5U/μL)	0.1
반응 부피	22	반응 부피	20
PCR 혼합물 C		PCR 혼합물 D	
시약	1 x 반응 (μL)	시약	1 x 반응 (μL)
H2O	28	H2O	11.6
10X PCR 완충제 II (Mg-plus)	5	10X PCR 완충제 II (Mg-plus)	2
MgCl ₂ [25mM]	1.5	MgCl ₂ [25mM]	0.6
dNTP[2.5mM]	8	dNTP[2.5mM]	3.2
어댑터 PCR 프라이머 (10μM)	1	프라이머1 (10μM)	0.4
GOI 중첩 프라이머 (10μM)	1	프라이머2 (10μM)	0.4
DNA 결합 비드	5	DNA 주형	0.2
LA Taq (5U/μL)	0.5	LA Taq (5U/μL)	1.6
반응 부피	50	반응 부피	20

[0174]

[0175]

실시예 3.1: 대두 게놈 서열의 확인

[0176]

5' 및 3' 인접 경계는 염색체 15로부터의 글리신 맥스 전체 게놈 샷건 (shotgun) 서열에 정렬되었고, 이것은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 도입유전자가 대두 게놈 염색체 15에 삽입되었음을 나타낸다. 대두 게놈으로부터의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 도입유전자의 삽입 부위를 확인하기 위해서, PCR을 상이한 쌍의 프라이머 (도 2, 표 3, 표 4 및 표 5)를 사용하여 수행하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 및 다른 트랜스제닉 또는 비-트랜스제닉 대두 식물주로부터의 게놈 DNA를 주형으로서 사용하였다. 따라서, 5' 경계 서열이 적절한지 확인하기 위해서 2mEPS v1 특이적 프라이머, 예를 들어 ED_v1_C1, 및 4232-WF1, 4232-WF3 및 4232-WF4로 지정된, 클로닝된 5' 말단부 경계 서열 및/또는 대두 게놈 염색체 15 상의 그의 정렬 서열에 따라 지정된 프라이머를, 2mEPS v1 유전자를 5' 말단부 경계 서열에 걸치게 하는 DNA 절편을 증폭하기 위해 사용하였다. 유사하게, 클로닝된 3' 말단부 경계 서열의 확인을 위해, pat 특이적 프라이머, 예를 들어 PAT_11, 및 4232-WR1, 4232-WR2, 4232-WR3 및 4232-WR4로 지정된, 클로닝된 3' 말단부 경계 서열 및/또는 대두 게놈 염색체 15 상의 그의 정렬 서열에 따라 지정된 4개의 프라이머를, pat 유전자를 3' 말단부 경계 서열에 걸치게 하는 DNA 절편을 증폭하기 위해 사용하였다. 예상된 크기를 갖는 DNA 단편은, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 인접하는 경계에 위치하는 한 프라이머 및 하나의 도입유전자 특이적 프라이머로 이루어진 각각의 프라이머 쌍을 사용하여 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 DNA로부터만 증폭되었고, 다른 트랜스제닉 대두 식물주 또는 비-트랜스제닉 대조군으로부터의 DNA 샘플에서는 증폭되지 않았다. 결과는 클로닝된 5' 및 3' 경계 서열이 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 T-가닥 삽입체의 인접하는 경계 서열임을 나타낸다.

[0177]

대두 게놈 내의 T-가닥 DNA 삽입의 게놈 부위를 추가로 확인하기 위해서, 대두 경계 서열에 걸치는 PCR 증폭을, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 T-가닥 삽입체를 함유하지 않은 게놈 DNA에 대해 완료하였다. 5' 말단부 경계 서열에 따라 지정된 한 프라이머 4232-WF1, 및 3' 말단부 경계 서열에 대해 2개의 프라이머, 즉 4232-WR1 및 4232-WR2를 사용하여, pDAB8264 T-가닥이 통합된 5' 말단부 경계 서열 및 3' 경계 서열 DNA 절편을 증폭하였

다. 예상된 바와 같이, 4232-WF1 및 4232-WR1의 프라이머 쌍을 사용한 PCR 증폭은 비-트랜스제닉 대두 대조군 및 다른 대두 트랜스제닉 식물주의 게놈 DNA로부터 약 2.4 kb DNA 단편을 증폭하였지만, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1로부터는 증폭하지 않았다. 유사하게, PCR 반응은 4232-WF1 및 4232-WR2의 프라이머 쌍을 사용하여 완료하였고, 비-트랜스제닉 대두 대조군 및 다른 대두 트랜스제닉 식물주의 게놈 DNA로부터 약 2.5 kb DNA 단편을 생성하였지만, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1로부터는 생성하지 않았다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 확인된 5' 및 3' 경계 서열과 염색체 15로부터의 글리신 맥스 전체 게놈 샷건 서열의 정렬은 본래의 게놈 유전자좌로부터 38 bp 결실을 보여주었다 (도 3). 이들 결과는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 도입유전자가 대두 게놈 염색체 15의 부위 내로 삽입되었음을 입증하였다.

[0178] 실시예 4: 서던 블롯 (Southern blot)을 통한 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 특성화

[0179] 서던 블롯 분석을 사용하여 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 통합 패턴을 확립하였다. 이들 실험은 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 도입유전자의 대두 게놈 내의 통합 및 완전성을 입증하는 데이터를 생성하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 플라스미드 pDAB8264로부터의 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 PTU의 단일 카피를 함유하는 전체 길이의 간단한 통합 이벤트로서 특성화되었다.

[0180] 서던 블롯 데이터는 전장 T-가닥 단편이 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 내로 삽입됨을 제시하였다. 상세한 서던 블롯 분석은 pDAB8264의 T-가닥 통합 영역에 함유된 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 유전자에 특이적인 프로브, 및 플라스미드 내에 위치한 절단 부위를 갖고 플라스미드 내부의 혼성화 단편 또는 대두 게놈 DNA와 플라스미드의 연결에 걸치는 단편 (경계 단편)을 생성하는 기술적 (descriptive) 제한 효소를 사용하여 수행하였다. 제한 효소 및 프로브의 조합에 대해 서던 혼성화로부터 나타난 분자량은 이벤트에 대해 특유하고, 그의 확인 패턴을 확립하였다. 이들 분석은 또한 플라스미드 단편이 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 PTU의 재정렬 없이 대두 게놈 DNA 내로 삽입되었음을 보여주었다.

[0181] 실시예 4.1: 대두 잎 샘플 수집 및 게놈 DNA (gDNA) 단리

[0182] 게놈 DNA는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 함유하는 개개의 대두 식물로부터 수거한 잎 조직으로부터 추출하였다. 또한, gDNA는 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 유전자가 없는, 물질 계통을 나타내는 유전적 배경을 갖는 통상적인 대두 식물인 매버릭으로부터 단리하였다. 개별적인 게놈 DNA를 표준 CTAB 방법 (Sambrook et al. (1989))에 따라 동결건조된 잎 조직으로부터 추출하였다. 추출 후에, 피코 그린 (PICO GREEN) 시약 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드))을 사용하여 분광형광계로 DNA를 정량하였다. 이어서, DNA를 피코 그린 분석으로부터 농도를 확인하고 DNA 품질을 결정하기 위해서 아가로스 겔 상에 가시화하였다.

[0183] 실시예 4.2: DNA 소화 및 분리

[0184] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 서던 블롯 분자 특성화를 위해, 10 µg의 게놈 DNA를 소화시켰다. 대두 pDAB8264.42.32.1 및 비-트랜스제닉 대두 식물주 매버릭으로부터의 게놈 DNA를, 1 µg의 DNA당 약 5 단위의 선택된 제한 효소 및 상응하는 반응 완충제를 각각의 DNA 샘플에 첨가함으로써 소화시켰다. 각각의 샘플을 약 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 제한 효소 HindIII, NcoI, NsiI 및 PacI을 소화물에 대해 개별적으로 사용하였다 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 Ipswich). 또한, 양성 혼성화 대조군 샘플은 플라스미드 DNA인 pDAB8264를 비-트랜스제닉 대두 변종인 매버릭으로부터의 게놈 DNA와 조합함으로써 제조하였다. 플라스미드 DNA/게놈 DNA 콕테일 (cocktail)을 시험 샘플과 동일한 절차 및 제한 효소를 사용하여 소화시켰다. 소화물을 밤새 인큐베이션한 후, 25 µl QUIK-PRECIP PLUS 용액 (에지바이오시스템즈 (EdgeBiosystems), 미국 메릴랜드주 게이터스버그)을 첨가하고, 소화된 DNA 샘플을 이소프로판올로 침전시켰다. 침전된 DNA 펠렛을 15 µl의 1X 로딩 완충제 (0.01% 브로모페놀 블루, 10.0 mM EDTA, 10.0% 글리세롤, 1.0 mM 트리스 pH 7.5)에 재현탁시켰다. 이어서, DNA 샘플 및 분자 크기 마커를 단편 분리를 달성하기 위해 35 볼트에서 약 18-22시간 동안 0.4X TAE 완충제를 사용하여 0.85% 아가로스 겔을 통해 전기영동하였다. 겔을 에티듐 브로마이드로 염색하고, DNA를 자외선 (UV) 광 하에 가시화하였다.

[0185] 실시예 4.3: 서던 전달 및 막 처리

[0186] 서던 블롯 분석을 본질적으로 문헌 [Memelink, et al. (1994)]에 설명된 바와 같이 수행하였다. 간단히 설명하면, DNA 단편의 전기영동적 분리 및 시각화 후에, 겔을 0.25M HCl로 약 20분 동안 퓨린을 제거한 후, 변성 용액 (0.4 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 약 30분 동안, 이어서 중화 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M 트리스 pH 7.5)에 적어도 30분 동안 노출시켰다. 서던 전달은 10X SSC를 이용하는 위킹 (wicking) 시스템을 사용하여 나일론 막에 대해 밤새 수행하였다. 전달 후에 DNA는 UV 가교결합에 의해 막에 결합되었고, 막을 2X SSC 용액으로 짧게

세척하였다. 이 과정을 통해 혼성화가 준비된 서던 블롯 막이 생성되었다.

[0187] 실시예 4.4: DNA 프로브 표지 및 혼성화

[0188] 나일론 막에 결합된 DNA 단편은 표지된 프로브를 사용하여 검출하였다. 프로브는 유전자 요소에 특이적인 프라이머를 사용하여 플라스미드 pDAB8264로부터 증폭된 DNA 단편 내로 디곡시게닌 (DIG) 표지된 뉴클레오티드 [DIG-11]-dUTP의 PCR-기반 통합에 의해 생성되었다 (표 6). PCR 합성에 의한 DNA 프로브의 생성은 제조자의 권장 절차에 따라 PCR DIG 프로브 합성 키트 (로슈 다이어그노스틱스 (Roche Diagnostics), 미국 인디애나주 인디애나폴리스)을 사용하여 수행하였다.

[0189] 표지된 프로브를 그의 품질 및 양을 결정하기 위해 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 이어서, 요구되는 양의 표지된 프로브를, 본질적으로 DIG EASY HYB 용액 (로슈 다이어그노스틱스, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)에 대해 설명된 바와 같은 절차를 이용하여 특이적인 단편의 검출을 위해 나일론 막에 대한 표적 DNA의 혼성화를 위해 사용하였다. 간단히 설명하면, 고정된 DNA를 함유하는 나일론 막 블롯을 2X SSC로 짧게 세척하고, 혼성화 오븐에서 약 2시간 동안 약 45-55°C에서 혼성화 병 내에서 20-25 mL의 예온된 DIG EASY HYB 용액으로 예비-혼성화하였다. 이어서, 예비-혼성화 용액을 경사분리하고, 수조 내에서 약 5분 동안 비등시킴으로써 변성된 요구되는 양의 특이적 프로브를 함유하는 ~15 mL의 예온된 DIG EASY HYB 용액으로 교체하였다. 혼성화 단계는 약 45-55°C에서 혼성화 오븐에서 밤새 수행하였다.

[0190] 프로브 혼성화 종료시에, 프로브 함유 DIG EASY HYB 용액을 깨끗한 튜브 내로 경사분리하고, 약 -20°C에서 보관하였다. 이들 프로브는 제조자의 권장 절차에 따라 2회 재사용할 수 있다. 막 블롯을 짧게 세척하고, 깨끗한 플라스틱 용기 내에서 약 5분 동안 실온에서 저 엄격성 세척 완충제 (2X SSC, 0.1% SDS)로 2회 세척한 후, 고 엄격성 세척 완충제 (0.1X SSC, 0.1% SDS)로 각각 15분 동안 약 65°C에서 2회 세척하였다. 막 블롯을 디그와 쉬 앤드 블록 (DIG WASH AND BLOCK) 완충제 세트 (로슈 다이어그노스틱스, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)로부터의 1X 말레산 완충제로 약 5분 동안 세척하였다. 이어서, 1X 차단 완충제 내에서 2시간 동안 차단을 수행하고, 또한 1X 차단 완충제 내에서 최소 30분 동안 항-DIG-AP (알칼리성 포스파타제) 항체 (로슈 다이어그노스틱스, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)와 함께 인큐베이션하였다. 1X 세척 완충제로 2-3회 세척한 후, 특이적 DNA 프로브는 막 블롯에 결합된 상태로 유지되고, DIG-표지된 DNA 표준물을 제조자의 권장사항에 따라 CDP-STAR 화학발광 핵산 검출 시스템 (로슈 다이어그노스틱스, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)을 이용하여 가시화하였다. 블롯을 혼성화 단편을 검출하고 분자 크기 표준물을 가시화하기 위해 하나 이상의 시점 동안 화학발광 필름에 노출하였다. 필름을 ALL-PRO 100 PLUS 필름 현상기 (코니카 미놀타 (Konica Minolta), 일본 오사카)로 현상하고, 영상을 스캐닝하였다. 검출된 밴드의 수 및 크기를 각각의 프로브에 대해 기록하였다. 설명된 바와 같은 DIG 검출 후에 가시적인 DIG-표지된 DNA 분자량 마커 II (DIG MWM II) 및 DIG-표지된 DNA 분자량 마커 VII (DIG MWM VII)을 사용하여 서던 블롯 상의 혼성화 단편 크기를 결정하였다.

표 6

서던 분석에 사용된 프로브의 위치 및 길이

[0191]

프로브 명칭	유전 요소	길이 (bp)
2mEPSPS	2mEPSPS v1	1238
aad-12	aad-12 v1	671
specR	스펙티노마이신 내성 유전자	750
OriRep	Ori Rep	852
trfA	복제 개시 단백질 trfA	1119

[0192] 실시예 4.5: 서던 블롯 결과

[0193] aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 PTU의 공지의 제한 효소 부위를 기초로 하여 특정 소화 및 프로브를 사용하여 예상되고 관찰된 단편 크기를 표 7에 제시한다. 두 종류의 단편이 이들 소화 및 혼성화로부터 확인되었다: 공지의 효소 부위가 프로브 영역에 인접하고 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 PTU의 삽입 영역 내에 완전히 함유된 내부 단편, 및 공지의 효소 부위가 프로브 영역의 한 말단부에 위치하고 제2 부위가 대두 계놈에 예상되는 경계 단편. 경계 단편 크기는 이벤트에 따라 상이하고, 그 이유는 대부분의 경우에 DNA 단편 통합 부위가 각각의 이벤트에 대해 특유하기 때문이다. 경계 단편은 통합된 DNA에 대한 제한 효소 부위를 위치시키고 DNA 삽입의 수를 평가하기 위한 수단을 제공한다. 여러 세대의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대해 완료된 서던 블롯 분석은 플라스

미드 pDAB8264로부터의 저 카피의 무손상 aad-12 v1 및 2mEPSPS v1 PTU가 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 대두 계놈 내로 삽입되었음을 제시하는 데이터를 생성하였다.

표 7

서던 블롯 분석에서 예상 및 관찰된 혼성화 단편. 1. 예상된 단편 크기는 pDAB8264의 플라스미드 지도를 기초로 한 것이다. 2. 관찰된 단편 크기는 이들 분석으로부터 대략적으로 고려된 것이고, DIG-표지된 DNA 분자량 마커 II 및 마커 VII 단편의 표시된 크기를 기초로 한다.

DNA 프로브	제한 효소	샘플	예상된 단편 크기 (bp) ¹	관찰된 단편 크기 (bp) ²
aad-12	Hind III	대두 이벤트	4731	4700
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	>4078	4100
	Nco I	pDAB8264	7429	7400
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	>3690	6700
	Nsi I	pDAB8264	4974	4900
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	4974	4900
2mEPSPS	Hind III	pDAB8264	9322	9300
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	>4260	5300
	Nco I	pDAB8264	5203	5200
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	>3749	18000
	Nsi I	pDAB8264	11044	11000
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	>5199	7500
	Pac I	pDAB8264	6768	6700
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	6768	6700
SpecR	Hind III	pDAB8264	9322	9300
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	없음	없음
	Nco I	pDAB8264	5203	5200
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	없음	없음
OriRep	Nco I	pDAB8264	7429	7400
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	없음	없음
trfA	Hind III	pDAB8264	9322	9300
		매버릭	없음	없음
		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	없음	없음

[0194]

[0195]

제한 효소 HindIII 및 NcoI은 플라스미드 pDAB8264 내의 특유한 제한 부위에 결합하고 이를 절단한다. 이들 효소는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내의 aad-12 v1 유전자 삽입체를 특성화하기 위해 선택되었다. >4078 bp 또는 >3690 bp의 경계 단편이 각각 HindIII 또는 NcoI 소화 후에 프로브와 혼성화할 것으로 예상되었다 (표 7). ~4100 bp 및 ~6700 bp의 단일 aad-12 v1 혼성화 밴드가 각각 HindIII 또는 NcoI 사용시에 관찰되었다. 프로브의 상기 크기의 밴드에 대한 혼성화는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 계놈 내의 aad-12 v1 유전자에 대한 단일 삽입 부위의 존재를 제시한다. 제한 효소 NsiI는 aad-12 v1 식물 전사 단위 (PTU; 프로모터/유전자/종료자)를 함유하는 단편을 방출하기 위해 선택되었다 (표 7). 예상된 ~4900 bp 단편은 NsiI 소화 후에 프로브를 사용할 때 관찰되었다. pDAB8264.42.32.1 샘플의 효소 소화, 이어서 프로브 혼성화를 사용하여 얻은 결과는 플

라스미드 pDAB8264로부터의 무손상 aad-12 v1 PTU가 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 내로 삽입되었음을 나타내었다.

[0196] 제한 효소 HindIII, NcoI 및 NsiI은 플라스미드 pDAB8264 내의 제한 부위에 결합하고 이를 절단한다. 이들 효소는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내의 2mEPSPS v1 유전자 삽입체를 특성화하기 위해 선택되었다. >4260 bp, >3749 또는 >5199 bp의 경계 단편이 각각 HindIII, NcoI 및 NsiI 소화 후에 프로브와 혼성화할 것으로 예상되었다 (표 7). ~5300 bp, 18000 및 ~7500 bp의 단일 2mEPSPS v1 혼성화 밴드가 각각 HindIII, NcoI 및 NsiI 사용시에 관찰되었다. 프로브의 상기 크기의 밴드에 대한 혼성화는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 내의 2mEPSPS v1 유전자에 대한 단일 삽입 부위의 존재를 제시한다. 제한 효소 PacI는 2mEPSPS v1 식물 전사 단위 (PTU; 프로모터/유전자/종료자)를 함유하는 단편을 방출하기 위해 선택되었다 (표 7). 예상된 ~6700 bp 단편은 PacI 소화 후에 프로브를 사용할 때 관찰되었다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 샘플의 효소 소화, 이어서 프로브 혼성화를 사용하여 얻은 결과는 플라스미드 pDAB8264로부터의 무손상 2mEPSPS v1 PTU가 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 대두 게놈 내로 삽입되었음을 나타내었다.

[0197] 실시예 4.6: 백본 서열의 부재

[0198] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내의 스펙티노마이신 내성 유전자 (specR), Ori Rep 요소 및 복제 개시 단백질 trfA (trfA 요소)의 부재를 확인하기 위해 서던 블롯 분석을 또한 수행하였다. 적절한 양성 (매버릭 게놈 DNA에 첨가된 pDAB8264 플라스미드 DNA) 및 음성 (매버릭 게놈 DNA) 대조군이 서던 분석에 포함될 때, 스펙티노마이신 내성, Ori Rep 요소 또는 trfA 요소에 대한 어떠한 특이적 혼성화도 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 샘플에서 예상되지 않는다. HindIII 또는 NcoI 소화 및 specR 특이적 프로브를 사용한 혼성화 후에, ~9300 bp 또는 ~5200 bp의 하나의 예상된 크기 밴드가 각각 양성 대조군 샘플 (매버릭 게놈 DNA에 첨가된 pDAB8264)에서 관찰되었다. specR 프로브는 음성 대조군 및 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 샘플에 혼성화하지 않았다. 유사하게, NcoI 소화 및 OriRep 특이적 프로브와의 혼성화 후에, ~7400 bp의 하나의 예상된 크기 밴드가 양성 대조군 샘플 (매버릭 게놈 DNA에 첨가된 pDAB8264)에서 검출되었지만, 음성 대조군 및 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 샘플에는 존재하지 않았다. 또한, HindIII 소화 및 trfA 특이적 프로브와의 혼성화 후에, ~9,300 bp의 단지 하나의 예상된 크기 밴드가 양성 대조군 샘플 (매버릭 게놈 DNA에 첨가된 pDAB8264)에서 검출되었지만, 음성 대조군 및 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 샘플에는 존재하지 않았다. 이들 데이터는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 스펙티노마이신 내성 유전자, Ori Rep 요소 및 복제 개시 단백질 trfA가 존재하지 않음을 나타낸다.

[0199] 실시예 5: 작물학상 및 수율 재배지 시험 및 제초제 내성

[0200] 반복된 작물 시험은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 작물학상 특징을 평가하기 위해 실시하였다. 대부분의 재배지 시험은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1를 함유하는 대두 변종이 재배되는 미국 전역에 걸친 별개의 지리적 위치에서 실시되었다. 3 세트의 실험을 완료하였다. 제1 계열의 실험은 제초제 2,4-D 및 글리포세이트가 분무된 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물의 작물 효능을 제초제가 분무되지 않은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물과 비교하였다. 제2 계열의 실험은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물의 작물 효능을 근 동질계통 (near isolate) 매버릭 대조군 식물과 비교하였다. 마지막으로, 제3 계열의 실험은 글루포시네이트 적용에 대한 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물의 내성을 시험하기 위해 완료하였다.

[0201] 제1 실험은 1120 g ae/ha에서 2,4-D 디메틸아민 염 (Weedar (위다르) 64, 누팜 (Nufarm), 미국 일리노이주 버리지) 및 1120 g ae/ha에서 글리포세이트 (두랑고 (Durango), 다우 아그로사이언시스 (Dow AgroSciences, Indianapolis), 미국 인디애나주 인디애나폴리스)를 분무한 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물을 분무하지 않은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물과 비교하였다. 제초제 처리는 V3 및 R2 성장기에 실시하였다. 분무된 및 비-분무된 섹션으로 이루어진 재배지 시험은 2개의 별개의 성장 연도에 대한 무작위 완전 블록 설계로서 수립되었다. 2010 재배지 시험은 각각의 블록에 25개의 엔트리당 2개의 반복 실험으로 이루어졌고, 2011 재배지 시험은 각각의 블록에 26개의 엔트리당 4개의 반복 실험으로 이루어졌다. 두 실험을 위해, 각각의 구획은 2열, 12.5 피트 길이로 이루어졌고, 구획 사이에 2.5 피트 통로가 존재하고, 30 인치 간격으로 식재되었다. 시기 전체에 걸쳐, 재배지 구획은 통상적인 작물 재배 방식 하에 유지되었고, 잡초가 없도록 관리하였다. 시기 전체에 걸쳐 많은 작물 특징을 측정하였다. 이들 특징 및 데이터가 수집된 성장기가 표 8에 제시된다.

[0202]

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 매버릭과 비교하기 위해 재배지 시험에 에서 측정된 작물 특징의 목록

측정된 작물학상 특징 또는 형질	측정이 실시된 성장기
발아: (서 있는 식물의 수/1 미터 섹션에 심은 종자의 수) x 100	일찍 서 있는 식물의 수를 기초로 계산
묘목 성장력: 0%는 모든 식물이 죽은 구획을 나타내고, 100%는 매우 건강하게 보이는 구획을 나타내는 성장력 %	V1-V3
개화까지의 일수: 구획 내의 50%의 식물이 개화하기 시작하는, 식재시로부터의 일	R1
R2에서 서 있는 식물의 수: R2 성장기에서 열의 대표적인 1 미터 섹션 내의 식물의 수	R2
질병 발생률: 0-100%의 규모로 평가된, 구획 내의 질병의 중증도	R6
곤충 피해: 곤충에 의해 손상된 구획 내의 식물 조직의 비율	R6
식물 높이: 잎이 떨어진 후 토양 표면으로부터 끝까지 측정된 각각의 구획 내의 식물의 평균 높이 (cm)	R8
도복: 수확시 도복 비율: 0% = 도복 없음 및 100% = 구획 내의 모든 식물이 지면으로 쓰러짐.	R8
성숙시까지의 일수: 식재시로부터 구획 내의 95%의 꼬투리가 그의 마른 색깔에 도달할 때의 일수	R8
부서짐: 구획당 부서지는 꼬투리의 비율	R8
수확량: 13% 습도로 조정된 에이커당 부셀 (bushel)	R8
100 종자 중량: 각각의 구획당 100개의 종자를 계수하고 중량 (g)을 기록한다.	R8
종자 착색: 1 내지 5의 규모로 담갈색 착색의 정도를 평가한다.	1 = 담갈색 착색 없음 내지 5 = 심한 갈색 착색
적용 1 손상 1 daa (%): V3 화학물질 적용 6 내지 24시간 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가. 2,4-D 손상에 일반적인 임의의 편생장 징후 조사. 이것은 잎 및 줄기의 뒤틀림 및 아래로 처짐으로 나타난다.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)
적용 1 손상 7 daa (%): V3 화학물질 적용 7일 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)
적용 1 손상 14 daa (%): V3 화학물질 적용 14일 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)
적용 2 손상 1 daa (%): R2 화학물질 적용 6 내지 24시간 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가. 2,4-D 손상에 일반적인 임의의 편생장 징후 조사. 이것은 잎 및 줄기의 뒤틀림 및 아래로 처짐으로 나타난다.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)
적용 1 손상 7 daa (%): R2 화학물질 적용 7일 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)
적용 1 손상 14 daa (%): R2 화학물질 적용 14일 후에 전체적인 가시적인 작물 손상, 백화 현상 및 괴사를 평가.	0 내지 100% 규모 (0 = 손상 없음, 100 = 완전한 식물 사멸)

[0203]

성장 시기 종료시에, 모든 위치로부터의 데이터를 모으고, 위치에 걸친 (across location) 분석을 수행하였다. 데이터 분석을 수행하고, 분석으로부터의 최소 제곱 평균을 표 9에 상이한 작물 특징에 대해 보고하였다. 유의한 도입 효과가 측정되는 변수에 대해, 후속 평균치간 비교 (mean separation)는 분무된 및 비분무된 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물 사이를 비교하기 위해 스튜던트 (Student) T 시험을 사용하여 수행하였다. 유의성을 결정하기 위한 확률 수준은 p=0.05에서 설정되었다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 2,4-D 및 글리포세이트 탱크 혼합물에 내성을 보였다. 이와 대조적으로, 2,4-D 및 글리포세이트 탱크 혼합물이 분무된 매버릭 식물은 제초제 처리에 내성을 보이지 않았다.

표 9

2010년도와 2011년도에 걸쳐 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 분무된 식물을 비분무된 식물과 비교하는 위치에 걸친 분석으로부터의 최소 제공 평균. 각각의 형질에 대해, 동일한 문자가 뒤따르지 않는 값은 스튜던트 T 시험에서 상이하다.

작물학상 특징 또는 형질	대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1			
	분무		비분무	
발아 (%)	70.3	A	71.4	A
생장력 V1-V3 (%)	48.0	A	48.8	A
적용 1 손상 1 daa (%)	1.6	A	0.0	B
적용 1 손상 7 daa (%)	1.0	A	0.0	B
적용 1 손상 14 daa (%)	0.0	A	0.0	A
개화시까지의 일수 (식재시로부터의 일수)	40.1	A	39.8	A
서 있는 식물의 수 R2	20.1	A	20.7	A
적용 2 손상 1 daa (%)	3.4	A	0.1	B
적용 2 손상 7 daa (%)	2.3	A	0.0	B
적용 2 손상 14 daa (%)	1.3	A	0.1	A
질병 발생률 (%)	7.9	A	3.4	B
곤충 피해 (%)	10.1	A	8.7	A
높이 (cm)	111.1	A	108.2	A
성숙 (식재시로부터의 일수)	115.9	A	115.1	A
도복 (%)	15.2	A	12.8	A
부서짐 (%)	0.4	A	0.1	A
수량량 (bu/에이커)	44.6	A	42.9	A
100 종자 중량 (g)	12.4	A	11.9	B
종자 착색 (1 (없음) 내지 5 (심함))	2.1	A	1.9	A

[0204]

[0205]

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 성장 발달의 V3 및 R2 기 둘 모두에서 글리포세이트 및 2,4-D의 탱크 혼합물 적용에 대한 안정적인 내성을 제공하였다. 제초제를 초기에 적용할 때 경미한 손상이 존재하지만, 식물은 유의하게 손상되지 않았고, 적용 후 14일까지 손상 반응을 보이지 않고 성장하였다. 100개 종자 중량 및 질병 발생률을 제외하고 측정된 모든 형질은 제초제로 처리된 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물과 제초제로 처리되지 않은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물 사이에 동등성을 보였다. 따라서, 2,4-D 및 글리포세이트를 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물에 재배지 비율로 적용하는 것은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물의 작물 성능에 유해할 임의의 의미있는 작물 특징 또는 형질의 변화를 야기하지 않는다.

[0206]

제2 실험은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1과 근 동질계통 매버릭 대조군 식물 사이의 선택된 작물 특징에 대해 작물 성능을 비교하였다. 재배지 시험은 2개의 별개의 성장 연도에 대한 무작위 완전 블록 설계로서 수립되었다. 2010 재배지 시험은 각각의 블록에 25개의 엔트리당 2개의 반복 실험으로 이루어졌고, 2011 재배지 시험은 각각의 블록에 26개의 엔트리당 4개의 반복 실험으로 이루어졌다. 두 실험을 위해, 각각의 구획은 2열, 12.5 피트 길이로 이루어졌고, 구획 사이에 2.5 피트 통로가 존재하고, 30 인치 간격으로 식재되었다. 시기 전체에 걸쳐, 재배지 구획은 통상적인 작물 재배 방식 하에 유지되었고, 잡초가 없도록 관리하였다. 시기 전체에 걸쳐 많은 작물 특징을 측정하였다. 이들 특징 및 데이터가 수집된 성장기가 표 8에 제시된다.

[0207]

성장 시기 종료시에, 모든 위치로부터의 데이터를 모으고, 위치에 걸친 분석을 수행하였다. 데이터 분석을 수행하고, 분석으로부터의 최소 제공 평균을 표 10에 상이한 작물 특징에 대해 보고하였다. 유의한 도입 효과가 측정되는 변수에 대해, 후속 평균치간 비교는 매버릭과 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물 사이를 비교하기 위해 스튜던트 T 시험을 사용하여 수행하였다. 유의성을 결정하기 위한 확률 수준은 p=0.05에서 설정되었다.

표 10

2010년도와 2011년도에 걸쳐 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물을 매버릭 식물과 비교하는 위치에 걸친 분석으로부터의 최소 제곱 평균. 각각의 형질에 대해, 동일한 문자가 뒤따르지 않는 값은 스튜던트 T 시험에서 상이하다.

작물학상 특징 또는 형질	매버릭		대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1	
	값	등급	값	등급
발아 (%)	72.5	A	72.2	A
성장력 V1 (1 불량 - 9 양호)	48.2	A	49.2	A
개화시까지의 일수 (식재시로부터의 일수)	42.3	A	42.1	A
서 있는 식물의 수 R1	19.6	A	20.8	A
질병 발생률 (%)	6.4	A	7.0	A
곤충 피해 (%)	12.8	A	12.9	A
높이 (cm)	114.6	A	112.5	A
성숙 (식재시로부터의 일수)	119.7	A	119.0	A
도복 (%)	15.8	A	14.0	A
부서짐 (%)	0.1	A	0.4	A
수확량 (bu/에이커)	47.2	A	45.7	A
100 종자 중량 (g)	13.0	A	12.6	A
종자 착색 (1 (없음) 내지 5 (심함))	1.3	B	1.8	A

[0208]

[0209]

종자 착색을 제외하고 측정된 모든 형질은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1과 매버릭 사이에 동등성을 보였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 식물은 1.8의 종자 착색 등급을 생성한 반면, 매버릭 식물은 1.3의 종자 착색 등급을 생성하였다. 이러한 차이는 생산자에게 심각한 차이가 아니고, 작물 성능을 손상시키지 않거나, 상기 차이는 작물 성능을 손상시키는 의미있는 작물 차이를 야기하지 않는다. 이 결과는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1이 몇몇 작물 특징에 대해 매버릭과 상이하게 발달할 수 있지만, 그 차이는 최소이고, 상업적으로 성장한 대두의 정상 범위를 벗어나지 않음을 나타낸다.

[0210]

대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 글루포시네이트 제초제 내성을 시험하기 위해서, 이벤트를 2010년 성장 시기 동안 인디애나에서 효능 시험지에 식재하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 생산하기 위해 본래 형질전환된 재배종 매버릭을 각각의 묘판에 식재하고, 실험에 대조군으로서 포함되었다. 이벤트를, 동일한 시험 시기에 존재하고 4개의 반복 실험체로 이루어진 다른 이벤트와 함께 무작위로 선발하였다. 매버릭은 비-형질전환된 대조군으로서 포함되었다. 시험은 전체 구획으로서 처리 및 하위구획으로서 이벤트를 사용하는 변형된 분할 구획 (split-plot) 설계로서 수립되었다. 822 g ae/ha로 적용된 글루포시네이트 처리 및 비-분무된 대조군 처리를 대두 식물에 적용하였다. 처리는 V5 및 R2 성장기에 적용하였다. 제초제 내성은 처리 후 6시간 및 7일에 손상에 대해 식물을 평가함으로써 측정하였다. 손상은 백화 현상, 잎 괴사 및 식물 사멸을 가시적으로 조사함으로써 평가하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 글루포시네이트 제초제 적용에 대해 안정적인 내성을 보였다. 이와 대조적으로, 매버릭 식물은 제초제 처리에 내성을 보이지 않았다.

[0211]

실시예 6: 이벤트 특이적 TaqMan 검정

[0212]

육종 집단에서 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 존재를 검출하고 식물의 접합성 상태를 결정하기 위해 이벤트 특이적 TAQMAN 검정을 개발하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1은 이원성 벡터 pDAB8264의 T-가닥을 함유한다 (도 4). 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 특이적 검출을 위해, 특이적 TAQMAN 프라이머 및 프로브를 5' (서열 19) 또는 3' (서열 20) 삽입체로부터 식물까지의 연결에 위치한 DNA 서열에 따라 설계하였다 (도 4). 그의 5' 말단부에 FAM 리포터를 함유하는, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) (ABI)에 의해 합성된 2개의 프라이머 및 표적-특이적 MGB 프로브를 사용하여 3' 통합 연결에 걸치는 131 bp DNA 단편을 특이적으로 검출하기 위해 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 하나의 이벤트 특이적 검정을 설계하였다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 상기 TAQMAN 검출 방법의 특이성을, 대두 특이적 내인성 참조 유전자, GMFL01-25-J19 (글리신 맥스 cDNA, 젠뱅크: AK286292.1)를 사용하여 이중 방식으로 2mEPSPS v1 및 aad-12 v1 PTU를 함유하는 11개의 상이한 이벤트 및 대조군 비-트랜스제닉 대두 변종 (매버릭)에 대해 시험하였다.

[0213]

실시예 6.1: gDNA 단리

[0214]

11개의 상이한 대두 이벤트 및 비-트랜스제닉 대두 변종의 게놈 DNA (gDNA) 샘플을 본 연구에서 시험하였다.

계놈 DNA는 변형된 퀴아젠 (Qiagen) 마가트랙트 플랜트 디엔에이 (MAGATTRACT PLANT DNA) 키트 (퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아)를 사용하여 추출하였다. 샘플당 8개의 신선한 대두 잎 절편을 gDNA 추출을 위해 사용하였다. 샘플을 DNase-미함유 물로 희석하여 본 연구의 목적을 위한 약 10 ng/ μ l의 농도로 만들었다.

[0215] 실시예 6.2: TaqMan 검정 및 결과

[0216] 특이적인 TAQMAN 프라이머 및 프로브를 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 특이적 TAQMAN 검정을 위해 설계하였다. 이들 시약은 아래 나열된 조건을 사용하여 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 표 11은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 특이적으로 검출하기 위해 개발된 프라이머 및 프로브 서열을 제시한다.

표 11

TAQMAN PCR 프라이머 및 프로브.

이벤트 표적 반응			
	명칭	설명	서열
서열:12	4232_3'F	이벤트 특이적 전방향 프라이머	CGCAATGTGTATTATAAGTTGTCTAAGC
서열:13	4232_3'R	이벤트 특이적 역방향 프라이머	CTCTATCGGTTTAATTGGGATCCTAT
서열:14	4232_3'P	4232_3'F 및 4232_3'R과 함께 사용된 이벤트 특이적 프로브	5'FAM/ATGCCAATTACCAACAAT-MGB

참조 표적 반응			
	명칭	설명	서열
서열:15	GMS116 F	전방향 프라이머	GTAATATGGGCTCAGAGGAATGGT
서열:16	GMS116 R	역방향 프라이머	ATGGAGAAGAACATTGGAATTGC
서열:17	GMS116 프로브	프로브	5'HEX/CCATGGCCCGGTACCATCTGGTC/3BHQ_1/3'

[0217]

[0218] 증폭을 위한 다중 PCR 조건은 다음과 같다: 1X 로슈 PCR 완충제, 0.4 μ M 이벤트 특이적 전방향 프라이머, 0.4 μ M 이벤트 특이적 역방향 프라이머, 0.4 μ M 프라이머 GMS116 F, 0.4 μ M 프라이머 GMS116 R, 0.2 μ M 이벤트 특이적 프로브, 0.2 μ M GMS116 프로브, 0.1% PVP, 6-20 ng gDNA (총 반응 부피 10 μ l). 각테일을 다음 조건을 사용하여 증폭하였다: i) 95 $^{\circ}$ C, 10 min., ii) 95 $^{\circ}$ C, 10 sec, iii) 60 $^{\circ}$ C, 40 sec, iv) 40 사이클 동안 단계 ii-iii의 반복, v) 40 $^{\circ}$ C 유지. 실시간 PCR을 ROCHE LIGHTCYCLER 480에서 수행하였다. 데이터 분석은 형광 변화율이 그의 최대치에 도달하는 PCR 사이클 수인, LIGHTCYCLER 480 소프트웨어에 의해 결정된 교차점 (Cp 값)의 측정치를 기초로 하였다.

[0219] 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1에 대한 TAQMAN 검출 방법을, 대두 특이적 내인성 참조 유전자, GMFL01-25-J19 (젠뱅크: AK286292.1)를 사용하여 이중 방식으로 2mEPSPS v1 및 aad-12 v1 PTU를 함유하는 11개의 상이한 이벤트 및 비-트랜스제닉 대두 변종에 대해 시험하였다. 검정은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 특이적으로 검출하였고, 대조군으로부터 임의의 위 양성 결과를 생성하거나 증폭하지 않았다 (즉, 2mEPSPS v1 및 aad-#2 v1 PTU를 함유하는 11개의 상이한 이벤트 및 비-트랜스제닉 대두 변종). 이벤트 특이적 프라이머 및 프로브는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 검출을 위해 사용될 수 있고, 이들 조건 및 시약은 접합성 검정에 적용가능하다.

[0220] 실시예 7: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 예상된 서열

[0221] 서열 18은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 예상된 서열을 제공한다. 상기 서열은 5' 계놈 인접 서열, pDAB8264의 예상된 T-가닥 삽입체 및 3' 계놈 인접 서열을 포함한다. 서열 18에 대해, 잔기 1-1246은 5' 계놈 인접 서열이고, 잔기 1247-11507은 pDAB8264 T-가닥 삽입체의 잔기이고, 잔기 11508-12011은 3' 계놈 인접 서열이다. 따라서, 삽입체의 5' 말단부에 대한 연결 서열 또는 전이는 서열 18의 잔기 1246-1247에서 발생한다. 삽입체의 3' 말단부에 대한 연결 서열 또는 전이는 따라서 서열 18의 잔기 11507-11508에서 발생한다.

[0222] 서열 18은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 예상된 서열의 제시이고, 서열 19, 서열 20, 및 pDAB8264의 t-가닥의 정렬로부터 조합되었음을 유의하여야 한다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 T-가닥 삽입체의 실제 서열은 서열 18 (예를 들어, 잔기 1247-11507)과 경미하게 상이할 수 있다. T-가닥 삽입체를 식물 세포의 계놈 내로 도입하는 형질전환 과정 동안, 삽입체의 몇몇의 결실 또는 다른 변경이 발생하는 것은 드물지 않다. 또한, PCR

증폭시의 오류가 발생할 수 있고, 이것은 작은 서열결정 오류를 야기할 수 있다. 예를 들어, 본원에 나열된 인접하는 서열은 대두 게놈 DNA로부터 앰플리콘을 생성한 후, 앰플리콘을 클로닝하고 서열결정함으로써 결정되었다. 게놈 DNA로부터 서열결정을 위한 충분한 앰플리콘을 생성하기 위해 필요한 많은 라운드의 증폭을 고려할 때, 상기 방식으로 생성되고 결정된 서열에서 경미한 차이 및 작은 불일치를 발견하는 것은 드물지 않다. 통상의 기술자는 이러한 종류의 통상적인 서열결정 오류 또는 불일치 때문에 필요한 임의의 조정이 본 발명의 범위 내에 포함됨을 알아야 하고, 통지를 받아야 한다. 따라서, 본원에서 제공되는 플라스미드 서열의 관련 절편은 몇몇의 작은 변이를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 삽입체 서열과 일정 범위의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 식물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 서열 18의 서열, 또는 본원에서 논의되는 그의 임의의 절편에 대한 동일성을 갖는 서열은 본원에 예시되거나 설명된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 인접하는 서열 + 삽입체 서열의 서열은 기탁된 종자를 참고로 하여 확인될 수 있다. 따라서, 서열 18과 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 실제 T-가닥 삽입체 사이의 일부 차이는 확인될 수 있고, 본 발명의 범위에 포함된다.

[0223] 실시예 8: 표적화된 통합을 위한 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 삽입 부위의 용도

[0224] 재배지 조건 하에서 몇 세대에 걸친 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 도입유전자의 일관된 작물 성능은 염색체 15 상의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 삽입 부위 주위의 상기 확인된 영역이 관심있는 다른 트랜스제닉 유전자의 표적화된 통합을 위한 우수한 게놈 위치를 제공함을 제시한다. 상기 표적화된 통합은 소위 "위치 효과"의 문제, 및 도입유전자가 숙주 내로 통합될 때 게놈에 돌연변이를 생성할 위험을 극복한다. 상기 표적화된 통합의 추가의 이점은 숙주 게놈 내의 중요한 유전자와 내로의 도입유전자의 부적절한 삽입에 의해 발생하는 이상을 보이지 않으면서 요구되는 수준의 도입유전자 발현을 보이는 트랜스제닉 식물을 얻기 전에 스크리닝 및 시험되어야 하는 형질전환 이벤트의 매우 많은 수의 감소를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 표적화된 통합은 두 유전자를 모두 갖는 엘리트 식물주의 육종을 보다 효율적으로 만드는 도입유전자의 집적을 허용한다.

[0225] 개시된 교시내용을 사용하여, 통상의 기술자는 관심있는 폴리핵산을, 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내의 것과 동일한 삽입 부위로 또는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내의 삽입 부위에 아주 근접한 부위로 표적화할 수 있다. 그러한 방법의 하나는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 국제 특허 출원 W02008/021207에 개시되어 있다.

[0226] 간단히 설명하면, 상동성 재조합을 통해 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 내로의 삽입이 의도되는 관심있는 유전자 또는 유전자들에 인접하도록 삽입 부위 서열 18의 5'에 인접하는 20 Kb 이하의 게놈 서열 및 삽입 부위의 3'에 인접하는 20 Kb 이하의 게놈 서열을 사용하였다. 관심있는 유전자 또는 유전자들은 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 삽입 부위에서와 동일하게 위치할 수 있거나, 식물에 대한 유해한 효과를 보이지 않으면서 일관된 수준의 도입유전자 발현을 부여하기 위해 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 삽입 부위 주위의 20 Kb 영역 내의 임의의 부위에 위치할 수 있다. 관심있는 유전자 또는 유전자들 및 인접하는 서열을 함유하는 DNA 벡터는 아그로박테리움-매개 형질전환을 포함하고 이로 제한되지 않는, 통상의 기술자에게 알려진 몇몇 방법 중의 하나를 통해 식물 세포 내로 전달될 수 있다. 공여자 DNA 벡터의 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 표적 부위 내로의 삽입은 재조합 향상 유전자의 동시-발현 또는 상향조절 또는 내인성 재조합 억제 유전자의 하향조절을 포함하고 이로 제한되지 않는 몇몇 방법 중 하나에 의해 추가로 향상될 수 있다.

[0227] 또한, 게놈 내의 특이적 서열의 이중 가닥 절단은 상동성 재조합 빈도를 증가시키기 위해 사용될 수 있음이 당 업계에 공지되어 있고, 따라서 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 삽입 부위 및 그의 인접하는 영역 내로의 삽입은 이들 서열을 절단하기 위한 천연 또는 설계된 서열-특이적 엔도뉴클레아제의 발현에 의해 향상될 수 있다. 따라서, 본원에 제시되는 교시내용을 사용하여, 임의의 이중성 핵산은 서열 1 및 서열 2 사이에 또는 이에 근접하여 위치하는, 및 몇몇 경우에 서열 18 내에 또는 이에 근접하여 위치하는 표적 부위에서 삽입될 수 있다.

[0228] 실시예 9: 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1로부터 pat 유전자 발현 카세트의 절제

[0229] 선택가능 마커 유전자 발현 카세트의 제거는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1 내로의 표적화된 삽입을 위해 유익할 수 있다. 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1로부터 pat 선택가능 마커의 제거는 후속 대두 세대에서도 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1의 게놈 위치 내의 폴리핵산의 표적화된 통합에서 pat 선택가능 마커의 재사용을 허용한다.

[0230] 개시된 교시내용을 이용하여, 통상의 기술자는 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1로부터 관심있는 폴리핵산을 절제할 수 있다. 상기 방법의 하나는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 US 특허 출원 번호 13/011,666에 개시되어 있다.

[0231]

간단히 설명하면, 유전자 발현 카세트에 인접하는 특이적 DNA 서열을 인식하고 결합하고 절단하는 서열-특이적 엔도뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제가 설계된다. 아연 핑거 뉴클레아제는 트랜스제닉 아연 핑거 뉴클레아제 발현 카세트를 함유하는 모 식물을 대두 이벤트 pDAB8264.42.32.1을 함유하는 제2 모 식물에 교배함으로써 식물 세포 내로 전달된다. 생성되는 자손체는 성숙할 때까지 성장하고, 글루포시네이트를 함유하는 제초제로 있을 도포함으로써 pat 발현 카세트의 상실에 대해 분석된다. 제초제에 저항성이 아닌 자손체 식물은 분자 차원에서 확인되고, 자가-수정시킨다. pat 발현 카세트의 절제 및 제거는 자가-수정으로부터 얻어진 자손체에서 분자 차원에서 확인된다. 본원에 제공된 교시내용을 이용하여, 임의의 이중성 핵산은 서열 1과 서열 2 사이에, 바람직하게는 서열 18 내에 위치하는 표적 부위에서 대두 염색체 15로부터 절제될 수 있다.

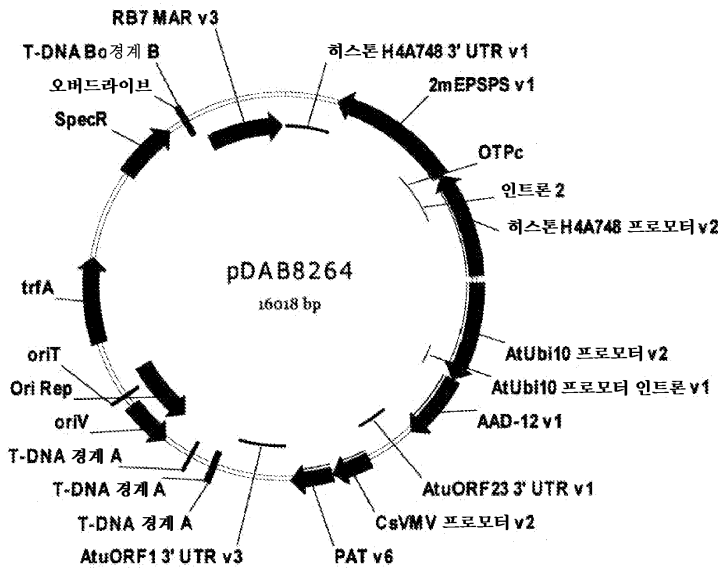
수탁번호

[0232]

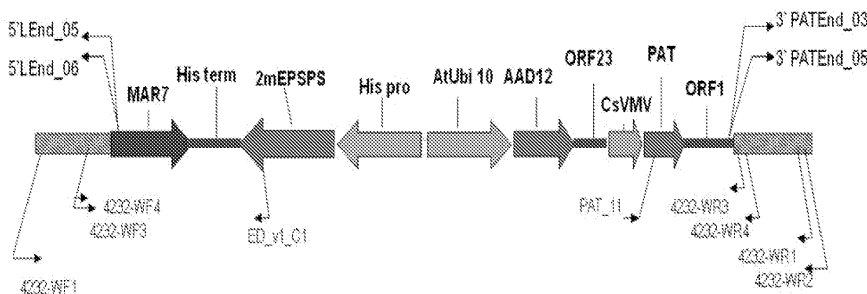
기탁기관명 : ATCC
 수탁번호 : PTA-11993
 수탁일자 : 20110711

도면

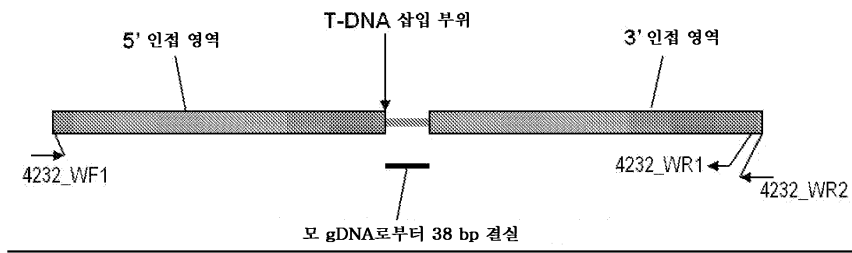
도면1



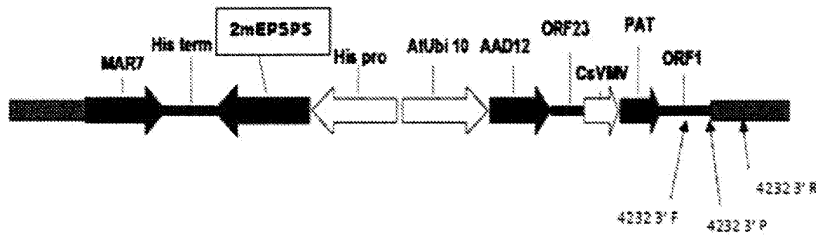
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Dow AgroSciences LLC
- MS Technologies, LLC
- Hoffman, Thomas
- Parkhurst, Dawn M.
- Zhou, Ning
- Pareddy, Dayakar
- Cui, Yunxing C.
- Bard, Nathan
- Toledo, Sandra G.
- Bradfish, Gregory A.
- Held, Bruce
- Sekar, Vaithilingam
- Wang, Yang
- Clark, Lauren
- Russell, Sean M.
- Smith, Kelley A.
- Wright, Terry R.

<120> STACKED HERBICIDE TOLERANCE EVENT 8264.42.32.1, RELATED

TRANSGENIC SOYBEAN LINES, AND DETECTION THEREOF

<130> DAS-P0211
 <150> 61/507,444
 <151> 2011-07-13
 <150> 61/515,634
 <151> 2011-08-05
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1246
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 5' border
 <400> 1

agcttatggg ttgtttcaa tacaaggaga caataaatta gtttagaata ttatTTTTga 60
 AACCTatatt attacaatta tatggacata ttagacacat gacaagtata atttgtTTTT 120
 tttttacctc tctaataat cctcatttgt taccatttct ccacacagtt taagttgaga 180

attaatTTTc aatattgcaa agttatactt atgatttgaa aatcttgtaa acacaaatga 240
 atccgatttt ttttttttt taaagggaaa gcaaatgaat ctgattatgt atgtatgtgt 300
 tttttctttt ctctgcgtaa tcatatatct cttttaaaca cttcaaaaca agatttagaa 360
 ttttcattgt aagatattca atcttcaacg cttctttaag gaggtgacat ttttttatt 420
 actttaggct ttttttatt agatatttgg ttcatttctt taatagtacc accaagacca 480
 ttgcatTTa aatgaatact agcatctaag attcaaaata aataattctt tccaacgaca 540
 tcaattaaga gcataaattt gagttcaaca aaatttgaca ttccgtatta tcataagata 600

atacaagtta tacaacatcc acaaagaata aaggtgtatc atttaaatga cagctaacat 660
 caaacaaga tgictgTaaa aaaaaacatc aagcaaagat gaagaatttt tttttttct 720
 tctgtgtgtg tgataagcaa caaagaaaat cccacatgct tggacaggaa aagaggaaaa 780
 aaacttcata aatatgTaaa tgcttcacaa catgagTcat gctaataatta attatgttat 840
 aagaaaaatt caataaaaag aaaaagtata gagtagaaag aaaggtgtat agaaaaaaga 900
 tagagaagag gtgtgtTTaa tttctttctt tctttttata tgtgtTTaac tctttTTaac 960
 ataataaata tttatacata taataagtag aagtagaaga caattagaga aaacttagaa 1020

agTcatatta tatacatttt tataatattt tcttagaac acattcttat tcttatgtt 1080

aaaagaaact aatcatatta tacccttacc agcaggagaa gtcaattcaa atttaacaaa 1140
 aggatgaata tttataaaat aataattttt tttgacataa tttataacaa aaaataattt 1200
 tttttttgt aactagaggt ttctatccta attttttatt ctctga 1246
 <210> 2
 <211> 504
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 3' border
 <400> 2
 tacacatgta tgacccttg atttattaat tttaaaaat gtgcatgcca attaccaaca 60
 ataccaatag gatcccaatt aaaccgatag agaaagcgag gtaatcatac acccgtttc 120

 ggctacatgg gggagggtgag gcgatgctat tctcacatgc catttctgtt cctactacga 180
 ccgctccaac catcatctcg aattccattg tcggtggaga aaccaaggc ccgcatgga 240
 cagtgacgac agtgaggta acgctatcag aatgcgtgcg catcaagcag ccaaaacgac 300
 ggcgttggca ttiacgaagt ggcgttttgg ttgtatccga agcggcagag gggcgtttag 360
 gtaaattcgg gaagcgaaaa gcaatgagaa atagcgaac gcttcgtatc tcttcactac 420
 tactactact actacacttg gtttctggta gtagtgtttt ttgttacgca cacaccaaaa 480
 cggctctctc gcagcccaaa agct 504

 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WF1
 <400> 3
 gatttctgca tcatttatga ccagg 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WF3
 <400> 4
 tgtaaatgct tcacaacatg agtca 25
 <210> 5

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WF4
 <400> 5
 atgtaaagtc ttcacaacat gagtc 25

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WR1
 <400> 6
 tttctacagc tagcacaaca agacct 26

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WR2
 <400> 7
 cgtatctgat actaaccagt tcgaattc 28

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WR3
 <400> 8
 aagagatagc aagcgtttcg ctatt 25

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer 4232-WR4
 <400> 9

aaacactact accagaaacc aagtgt 26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer ED_v1_C1

<400> 10

gagtaaagga gaccgagagg atggtt 26

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer PAT_11

<400> 11

acagagccac aaacaccaca agag 24

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer 4232_3'F

<400> 12

cgcaatgtgt tattaagttg tctaagc 27

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer 4232_3'R

<400> 13

ctctatcggt ttaattggga tcctat 26

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer 4232_3'P labeled with FAM and MGB

<400> 14	
atgccaatta ccaacaat	18
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer GMS116 F	
<400> 15	
gtaatatggg ctcagaggaa tgggt	24
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Primer GMS116 R	
<400> 16	
atggagaaga acattggaat tgc	23
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Probe GMS116 labeled with HEX and BHQ1	
<400> 17	
ccatggcccc gtaccatctg gtc	23
<210> 18	
<211> 12011	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> pDAB8264 T-strand insert and partial flanking sequences	
<400> 18	
agcttatggt tttgtttcaa tacaaggaga caataaatta gtttagaata ttatttttga	60
aacctatatt attacaatta tatggacata ttagacacat gacaagtata atttgTTTT	120
TTTTTaccctc tctaataat cctcatttgt taccatttct ccacacagtt taagttgaga	180
attaattttc aatattgcaa agttatactt atgatttgaa aatcttgtaa acacaaatga	240

atccgatttt ttttttttt taaagggaaa gcaaatgaat ctgattatgt atgtatgtgt 300

ttttttcttt ctctgcgtaa tcatatatct cttttaaaca cttcaaaaca agatttagaa 360

ttttcattgt aagatattca atcttcaacg cttctttaag gaggtgacat tttttttatt 420

actttaggct tttttttatt agatatttgg ttcatttctt taatagtacc accaagacca 480

tttgcattha aatgaatact agcatctaag attcaaaata aataattctt tccaacgaca 540

tcaattaaga gcataaattt gagttcaaca aaatttgaca ttccgtatta tcataagata 600

atacaagtta tacaacatcc acaaagaata aagggtgtatc atttaaatga cagctaacat 660

caaacaaga tgtctgtaaa aaaaaacatc aagcaaagat gaagaatttt ttttttttct 720

tctgtgtgtg tgataagcaa caaagaaaat cccacatgct tggacaggaa aagaggaaaa 780

aaacttcata aatatgtaaa tgcttcacaa catgagtcac gctaataatta attatgttat 840

aagaaaaatt caaataaaa aaaaagtata gtagtagaaag aaagggtgat agaaaaaaga 900

tagagaagag gtgtgtttaa tttctttctt tctttttata tgtgtttaa cttctttaac 960

ataataaata tttatacata taataagtag aagtagaaga caattagaga aaacttagaa 1020

agtcatatta tatacatttt tataatattt tcttagaaac acattcttat tcttattgtt 1080

aaaagaaact aatcatatta tacccttacc agcaggagaa gtcaattcaa atttaacaaa 1140

aggatgaata tttataaaat aataattttt ttgacataa tttataacaa aaaataattt 1200

ttttttttgt aactagaggt ttctatccta attttttatt ctctgaccag tcagcatcat 1260

cacacaaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaaag ctcgcaattg aggtctacag 1320

gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctaccggat cctaaccggt gtgatcatgg 1380

gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag tttggatttg agtaaaacaa 1440

attcgaacca aacaaaaata taaatatata gtttttatat atatgccttt aagacttttt 1500

atagaatttt ctttaaaaaa tatctagaaa ttttgcgac tcttctggca tgtaatattt 1560

cgtaaatat gaagtgtccc atttttatta actttaaata attggttgta cgatcacttt 1620

cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tctttgttct tccatattca tatgtcaaaa 1680

cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg aaatttcgat aatttaaaat 1740

taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt tatacttaat tactaaattt 1800

ggttaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa acgactaaaa taataaata 1860

tcatgtgtta ttaagaaaaa tctctataa gaatatttta atagatcata tgtttgtaaa 1920

aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa aatttgacaa agtaagatta 1980

aaataatatt catctaaca aaaaaaaccc agaaaatgct gaaaaccggg caaaaccgaa 2040
 ccaatccaaa ccgatatagt tggtttgggt tgattttgat ataaaccgaa ccaactcggg 2100
 ccatttgcac ccctaatcat aatagcttta atatttcaag atattattaa gftaacgttg 2160
 tcaatatcct ggaaattttg caaaatgaat caagcctata tggctgtaat atgaatttaa 2220
 aagcagctcg atgtgggtgt aatatgtaat ttacttgatt ctaaaaaaat atcccaagta 2280
 ttaataatth ctgctaggaa gaaggttagc tacgatttac agcaaagcca gaatacaatg 2340
 aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca aatattttta aaaaaatagc 2400

 caatgacttg gaacaaaaga aagtgatata tttttgttc ttaaacaagc atcccctcta 2460
 aagaatggca gttttccttt gcatgtaact attatgctcc cttcgttaca aaaatthgg 2520
 actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc ttaattaagg cgcgccgacg 2580
 aatgtcccc atcaaatctg agggacgtta aagcgatgat aaattggaac cagaatatag 2640
 aatctttgtt ctgctctagc tttcttctg tacatthttt acgatttagc tatgatthtc 2700
 attcaataac caaaatctg aagtttgtca tcaagttgct caatcaaac tgtaccggtt 2760
 tgtttcggtt ttatatcagc tcactgttac actttaacca aaatcggttt atgtcttaat 2820

 aaaggaattg agtcggttta actcatatcc gtaccaatgc gacgtcgtgt ccgctttca 2880
 gtagctttgc tcattgtctt ctacgggaac tttcccggac ataggaaccg ccctttcgtt 2940
 atcctcatcc atcgtgaaat caggaataaa atgttcgaag atttgaggtc aaaagtcgaa 3000
 tttcatgttg tctcttctat ttagatacaa aattgaagca atthtcacca atthaatgcc 3060
 aaaatthaaa acaacgtcga taaagtgaat cttgatcga tthtatthtc aaccgaaact 3120
 gctgaagcaa gaagaaaaag cgtaattaca cataacaaga acgctaccgc aaactactaa 3180
 acgccaacc caatacaaaa gtaaacgca gacgcttaag tgagaaacc agaaaacaca 3240

 aacgcggatc ggggatcca ctagtcttag agcttaattc ttgacgaaag tgctcagcac 3300
 atcgaagtag tcgggaagg tcttcgggt gcaccagggt tcccggatgg tgacggggac 3360
 ctcggcacag gcgcaagg agaaagccat cgccatctg tggctgctgt acgtgtcgat 3420
 cgccgtcacg ttcagcttct ccggcggcgt gatgatgcag tagtccggcc ctctctcaac 3480
 agatgtccc agcttgggta gctccgtccg gatcgcaacc atcctctcgg tctctttac 3540
 tctccaggaa gccagctctc tgatggctgt cggccatcg gcaaagagg caaccacagc 3600
 aagagtcagc gcgacatcag gcatctgtt catgttgaca tcaatcgct tgagggttt 3660

 cctcccaaat ggtcccgcg gtggccagc aacagttac ctagtctcgg tccatgtaac 3720
 ctctctccc atcatctcca gtacctcagc aaacttcaca tcacctgca aactggtggg 3780
 gccacaacct tccacagcga cagtcctcc agtaattgca gcaccagcca agaaatagct 3840

tgcgcttgag gcatcacctt caacataggc atttttaggg gacttgtatt ttgacctcc 3900
 cttaatgtag aatctgtccc agctatcaga atgctctgct ttcacaccaa aacgtccat 3960
 caatctcaat gtcatttcga cgtacggaat ggagattaat ttatcaatga tttcaatctc 4020
 cacatcccca agagccaaag gagcagccat cagcaaggca ctcaagtact gactgctgat 4080

 ggagccagac agcttgacct tgccaccagg tagccctccg attccattga cacgaacagg 4140
 tgggcagtca gtgccaagga aacaatcaac atctgcacca agctgcttca atccgacaac 4200
 caagtgcga atgggtctct ccctcattct tggfactcca tcaagcacgt aagttgcatt 4260
 tccaccagca gcagtaacag ctgctgtcaa ggaccgcatt gcgattccag cattccccaa 4320
 gaagagctgc acttctctt tagcatctc aactgggaac tttccaccac agccaacaac 4380
 tacagctctt ttggcagctt tgtccgcttc gacagagaga ccaagagtcc tcaagcccc 4440
 gagcatgtag tggacatcct cactgttcag caggttatca accactgttg tcccctcgga 4500

 cagggcggcg agtaggagga tccggttga aagcgacttg gaccccgca gcttgacggt 4560
 gccggagatc tccttgatgg gctgcagcac gatctctcgc gcgccggcca tgcaccggat 4620
 ctttccgccc ttgtcagctt tgccgaggtc tctggaggag cggcgggcca cggggaggtc 4680
 ggcggtggac ttgagccctt ggaacggagc gacggcgggt gccgacgagg ccatcatcac 4740
 ggtggcgccc atagacagcg gcggcaggta cgacagcgtc tcgaacttct tgttgccgta 4800
 ggccggccac acctgcatac attgaactct tccaccgttg ctgggaaggg tggagaagtc 4860
 gttagccttc ttggtggtgg ggaaggcggc gttggactta aggccggtga acggagccac 4920

 catgttggcc tgagcagggg cggctccggt aacggtcgcg actgaggagg agatcgaagc 4980
 catggggatc tgcgcattta acaagaaat gaacagtcaa ttggggattt tcattatcca 5040
 taactaaatt ttgaagaaat tgaataacta aacgtacca cttaaaacce taatccagat 5100
 gaatcgttat cgaaccagat ataacaaaaa ggggcaaaat tgactcgaac accctagttc 5160
 tcgatacacg gctaggtaat gacaatcgca cacagacaaa tctggttata cagaacttcg 5220
 aagcaagaaa aaaacgatga agaatggatc atccaataaa tcgactagac tcaatcttca 5280
 caggtttatc gatccagcaa acttaaaaga cggaccttta tttcacaact ggaatgggac 5340

 aaaacccgaa actctatigt cgtaaaatca gatcgcggag acagtaacag aaaaaacatt 5400
 aaaaagtaat ggaagacctt aaaccctga tctaattaca aacaaatcat acctgttctt 5460
 cgcctgaggg gttcgaaatc gataagcttg gatcctctag agtcgagaga aattgatgtc 5520
 tgtagaagaa gaagaacggt taagagtaga ttgggtgag aaagatgtga aattgttttt 5580
 ataggcaaag acggagagtc tattttttga gcaatcagat cgcatattaa atctaacggc 5640
 tgagatatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct gttttaatcg 5700

acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc gtcttttggt 5760

 ttacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaaac tcggaaaata 5820
 aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttatttttaa aacccacgaa 5880
 ttacaagtta caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tatactaatt ttgtagtagc 5940
 ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagttatc 6000
 gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca 6060
 ccaaatttac aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg tcaacatfff 6120
 aatttcctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa agtaactatt 6180

 tacataagag gttttaaata cacattaaca aaaataatta ccaaccggca ctcaaaaata 6240
 caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtggg ggtttcatta 6300
 caattgtgct acttgcagca caaactatct tgcctcggga atcatctcag catcaaagat 6360
 catgctcact tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc tctcgcacat 6420
 gcacctcga ggggcgcgcc atgcccgggc aagcggccgc acaagtttgt acaaaaaagc 6480
 aggctccgag gtgactgact gaaaagcttg tcgacctgca ggtcaacgga tcaggatatt 6540
 cttgtttaag atgttgaact ctatggaggt ttgtatgaac tgatgatcta ggaccggata 6600

 agttcccttc ttcatagcga acttattcaa agaatgtttt gtgtatcatt ctgtttacat 6660
 tgttattaat gaaaaaatat tattggtcat tggactgaac acgagtgtta aatatggacc 6720
 aggcccaaaa taagatccat tgatatatga attaaataac aagaataaat cgagtcacca 6780
 aaccacttgc ctttttaac gagacttgtt caccaacttg atacaaaagt cattatccta 6840
 tgcaaatcaa taatcataca aaaatatcca ataacactaa aaaattaaaa gaaatggata 6900
 atttcacaat atgttatagc ataaagaagt tacttttcca agaaattcac tgattttata 6960
 agcccacttg cattagataa atggcaaaaa aaaacaaaaa ggaaaagaaa taaagcacga 7020

 agaattctag aaaatacga atacgttca atgcagtggg acccacggtt caattattgc 7080
 caattttcag ctccaccgta tatttaaaaa ataaaacgat aatgctaaaa aatataaat 7140
 cgtaacgac gttaaatctc aacggctgga tcttatgacg accgttagaa attgtggttg 7200
 tcgacgagtc agtaataaac ggcgtcaaag tggttgcagc cggcacacac gagtctgtt 7260
 tatcaactea aagcacaat acttttctc aacctaaaa taaggcaatt agccaaaaac 7320
 aactttgcgt gtaacaacg ctcaatacac gtgtcatttt attattagct attgcttcac 7380
 cgcttagct ttctcgtgac ctagtcgtcc tcgtcttttc ttcttcttct tctataaaac 7440

aatacaccaaa gcttcttctt cacaattcag atttcaattt ctcaaaatct taaaaacttt 7500
ctctcaattc tctctaccgt gatcaaggta aatttctgtg ttccttattc tctcaaaatc 7560
ttcgattttg ttttcgttcg atcccattt cgtatatgtt ctttggttta gattctgtta 7620
atcttagatc gaagacgatt ttctgggttt gatcgttaga tatcatctta attctcgatt 7680
agggtttcat aaatatactc cgatttgttc aaataattg agttttgtcg aataattact 7740
cttcgatttg tgatttctat ctgatctgg ttttagttc tagtttgtgc gatcgaattt 7800
gtcgattaat ctgagttttt ctgattaaca gagatctcca tggctcagac cactctccaa 7860

atcacacca ctggtgccac cttgggtgcc acagtcaactg gtgttcacct tgccacactt 7920
gacgatgctg gtttcgctgc cctccatgca gcctggcttc aacatgact ctgatcttc 7980
cctgggcaac acctcagcaa tgaccaacag attaccttg ctaaagcctt tggagcaatt 8040
gagaggattg gcggaggtga cattgttgc atatccaatg tcaaggcaga tggcacagtg 8100
cgccagcact ctctgctga gtgggatgac atgatgaagg tcattgtggg caacatggcc 8160
tggcacgcc actcaaccta catgccagtc atggctcaag gagctgtgtt cagcgcagaa 8220
gttgtccag cagtggggg cagaacctgc tttgctgaca tgagggcagc ctacgatgcc 8280

cttgatgagg caaccctgc tcttgttcac caaaggctg ctcgtcactc ctttgtgat 8340
tctcagaca agttgggaca tgtccaacag gccgggtcag cctacatagg ttatggcatg 8400
gacaccactg caactectct cagaccattg gtcaaggctc atcctgagac tgggaaggccc 8460
agcctcttga tcggccgcca tgccatgcc atccctggca tggatgcagc tgaatcagag 8520
cgcttccttg aaggacttgt tgactgggcc tgccaggctc ccagagtcca tgctcaccaa 8580
tgggctgctg gagatgtgtt tgtgtgggac aaccgctgtt tgctccaccg tgctgagccc 8640
tgggatttca agttgccag tgtgatgtgg cactccagac tcgctggacg cccagaaact 8700

gagggtgctg ccttggtttg agtagttagc ttaatcacct agagctcgtt caccagcata 8760
attttatta atgtaactaa ttactgtttt gttaaatgca attttgctt ctcgggattt 8820
taatatcaaa atctatttag aaatacacia tattttgttg caggcttctt ggagaatcga 8880
tctgctatca taaaaattac aaaaaattt tatttgcctc aattatttta ggattggtat 8940
taaggacgct taaattattt gtcgggtcac tacgcatcat tgtgattgag aagatcagcg 9000
atacgaata ttcgtagtac tatcgataat ttatttgaat attcataaga aaagcaaacg 9060
ttacatgaat tgatgaaaca atacaagac agataaagcc acgcacattt aggatattgg 9120

ccgagattac tgaatatfga gtaagatcac ggaatttctg acaggagcat gtcttcaatt 9180
cagcccaaat ggcagttgaa atactcaaac cgcccatat gcaggagcgg atcattcatt 9240
gtttgtttgg ttgcctttgc caacatggga gtccaaggtt gcggccgagc gccgaccag 9300

ctttcttgta caaagtgggt gcggccgctt aattaaattt aaatgcccg gcgtttaaac 9360
 gcggccgctt aattaagcc ggcctgcagc aaaccagaa ggtaattatc caagatgtag 9420
 catcaagaat ccaatgttta cgggaaaaac tatggaagta ttatgtaagc tcagcaagaa 9480
 gcagatcaat atgcccaca tatgcaacct atgttcaaaa atgaagaatg tacagataca 9540

 agatcctata ctgccagaat acgaagaaga atacgtagaa attgaaaaag aagaaccagg 9600
 cgaagaaaag aatcttgaag acgtaagcac tgacgacaac aatgaaaaga agaagataag 9660
 gtcggtgatt gtgaaagaga catagaggac acatgtaagg tggaaaatgt aagggcggaa 9720
 agtaacctta tcacaaagga atcttatccc cactactta tcttttata tttttccgtg 9780
 tcatttttgc ccttgagttt tcttatataa ggaaccaagt tcggcatttg tgaanaaag 9840
 aaaaaattg gtgtaagcta ttttcttga agtactgagg atacaacttc agagaaattt 9900
 gtaagtttgt agatctccat gtctccggag aggagaccag ttgagattag gccagctaca 9960

 gcagctgata tggcccggtt ttgtgatatc gttaccatt acattgagac gtctacagtg 10020
 aactttagga cagagccaca aacaccaca gagtggattg atgatctaga gaggttgcaa 10080
 gatagatacc cttaggttgg tgctgagggt gagggtgttg tggctggat tgcttacgct 10140
 gggccctgga aggctagaa cgcttacgat tggacagtgt agagtactgt ttacgtgtca 10200
 cataggcacc aaaggttggg cctaggatcc acattgtaca cacatttgc taagtctatg 10260
 gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttgc gttataggcc tccaaacga tccatctgtt 10320
 aggttgcag aggctttggg atacacagcc cgggtacat tgcgcgcagc tggatacaag 10380

 catggtggat ggcatgatgt tggtttttg caaagggtt ttgagttgcc agctctcca 10440
 aggccagtta ggccagttac ccagatctga ggtaccctga gcttgagctt atgagcttat 10500
 gagcttagag ctcgatcca ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttgact 10560
 agataggcgc ccagatcggc ggcaatagct tcttagcgcc atcccgggtt gatcctatct 10620
 gtgttgaat agttgcggtg ggcaaggctc tctttcagaa agacaggcgg ccaaaggaac 10680
 ccaaggtgag gtggctatg gctctcagtt ccttgtggaa gcgcttggtc taaggtgcag 10740
 aggtgttagc gggatgaagc aaaagtgtcc gattgtaaca agatattgtg atcctacgta 10800

 aggatattaa agtatgtatt catcactaat ataactcagtg tattccaata tgtactacga 10860
 tttccaatgt ctttattgct gccgatgta atcgcgctca caaataatc cccggtgact 10920
 tcttttaat ccaggatgaa ataatatgtt attataattt ttgcgatttg gtccgttata 10980
 ggaattgaag tgtgcttgcg gtcgccacca ctcccattc ataattttac atgtatttga 11040
 aaaaataaaa tttatggtat tcaattttaa cacgtatact tgtaagaat gatatttga 11100
 aagaaatata gtttaaatat ttattgataa aataacaagt caggtattat agtccaagca 11160

aaaacataaa tttattgatg caagtttaaa ttcagaaata tttcaataac tgattatattc 11220

 agctgtgaca ttgccgtaga tgaagactg agtgcgatat tatggtgtaa tacatagcgg 11280
 ccgggtttct agtcaccggt taggatccgt ttaaacctga ggctagcgca tgcacataga 11340
 cacacacatc atctcattga tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag 11400
 atgcactcga aatcagccaa ttttagacaa gatatcaaac gatgtgactt cagtacatta 11460
 aaaacgtccg caatgtgta ttaagtgtc taagcgtcaa tttgatttac acatgtatga 11520
 ccccttgatt tattaatfff aaaaaatgtg catgccaatt accaacaata ccaataggat 11580
 cccaattaaa ccgatagaga aagcagggtta atcatacacc cgttttcggc tacatggggg 11640

 tggtagggcg atgctattct cacatgccat tttcgttct actacgaccg ctccaacat 11700
 catctcgaat tccattgtcg gtggagaaac ccaaggcccg cattggacag tgacgacagt 11760
 gagggtaacg ctatcagaat gcgtgcgcat caagcagcca aaacgacggc gttggcattt 11820
 acgaagtggc gttttggtg tatccgaagc ggcagagggg cgtttaggta aattcgggaa 11880
 gcgaaaagca atgagaaata gcgaaacgct tcgtatctct tcaactactac tactactact 11940
 acacttgggt tctggtagta gtgttttttg ttacgcacac accaaaacgg ctctctcgca 12000
 gcccaaaagc t 12011

<210> 19

<211> 1550

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 5' border and T-strand insert

<220><221> T-strand insert

<222> (1247)..(1550)

<400> 19

agcttatggt tttgtttcaa tacaaggaga caataaatta gtttagaata ttatttttga 60
 aacctatatt attacaatta tatggacata ttagacacat gacaagtata atttgtttt 120
 tttttaccte tctaataat cctcatttgt taccatttct ccacacagtt taagttgaga 180
 attaattttc aatattgcaa agttatactt atgatttgaa aatcttgtaa acacaaatga 240
 atccgatttt ttttttttt taaagggaag gcaaatgaat ctgattatgt atgtatgtgt 300

 tttttcttt ctctgcgtaa tcatatatct cttttaaaca cttcaaaaca agatttagaa 360
 ttttcattgt aagatattca atcttcaacg cttctttaag gaggtgacat tttttttatt 420
 actttaggct tatttttatt agatatttgg ttcatttctt taatagtacc accaagacca 480

ttgcattha aatgaatact agcatctaag attcaaaata aataattctt tccaacgaca 540
 tcaattaaga gcataaattt gagttcaaca aaatttgaca ttccgtatta tcataagata 600
 atacaagtta tacaacatcc acaagaata aagggtgtatc atttaaatga cagctaacat 660
 caaacaaga tgictgtaaa aaaaaacatc aagcaaagat gaagaatfff tttttttct 720

 tctgtgtgtg tgataagcaa caaagaaaat cccacatgct tggacaggaa aagaggaaaa 780
 aaacttcata aatatgtaaa tgcttcacaa catgagtcac gctaataatta attatgttat 840
 aagaaaaatt caaataaaag aaaaagtata gagtagaaag aaagggtgat agaaaaaga 900
 tagagaagag gtgtgtttaa tttctttctt tctttttata tgtgtttaac ttcttttaac 960
 ataataaata tttatacata taataagtag aagtagaaga caattagaga aaacttagaa 1020
 agtcatatta tatacatttt tataatattt tcttagaac acattcttat tcttatggt 1080
 aaaagaaact aatcatatta tatccttacc agcaggagaa gtcaattcaa atttaacaaa 1140

 aggatgaata tttataaaat aataatfff tttgacataa tttataacaa aaaataatff 1200
 tttttttgt aactagaggt ttctatccta attttttatt ctctgaccag tcagcatcat 1260
 cacaccaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaaag ctcgcaattg aggtctacag 1320
 gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctaccggat cctaaccggt gtgatcatgg 1380
 gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag tttggtattg agtaaaacaa 1440
 attcgaacca aaccaaata taaatatafa gtttttatat atatgccttt aagactfff 1500
 atagaatfff ctttaaaaaa tatctagaaa tatttgcgac tcttctggca 1550

<210> 20

<211> 680

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 3' border and T-strand insert

<220><221> T-strand insert

<222> (1)..(176)

<400> 20

gcacatagac acacacatca tctcattgat gcttggtaat aattgtcatt agattgtfff 60
 tatgcataga tgcactcgaa atcagccaat tttagacaag tatcaaaccg atgtgacttc 120
 agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgatttaca 180
 catgtatgac cctttgatff attaatffta aaaaatgtgc atgccaatta ccaacaatac 240
 caataggatc ccaattaaac cgatagagaa agcagggtaa tcatacacc gttttcggt 300

acatgggggt ggtgaggcga tgctattctc acatgccatt ttcgttccta ctacgaccgc 360
 tccaaccatc atctcgaatt ccattgtcgg tggagaaacc caaggcccgc attggacagt 420
 gacgacagtg agggtaacgc tatcagaatg cgtgcgcatac aagcagccaa aacgacggcg 480
 ttggcattta cgaagtggcg ttttggttgt atccgaagcg gcagaggggc gtttaggtaa 540
 attcgggaag cgaaaagcaa tgagaaatag cgaaacgctt cgtatctctt cactactact 600
 actactacta cacttggttt ctggtagtag tgtttttgt tacgcacaca ccaaaacggc 660
 tctctcgcag ccaaaaagct 680

<210> 21

<211> 10256

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> plasmid pDAB8264

<400> 21

agtcagcatc atcacaccaa aagttaggcc cgaatagttt gaaattagaa agctcgaat 60
 tgaggcttac aggccaaatt cgctcttagc cgtacaatat tactcaccgg atcctaaccg 120
 gigtgatcat gggccgcgat taaaaatctc aattatattt ggtctaattt agtttggat 180
 tgagtaaac aaatcgaac caaaccaaaa tataaatata tagttttat atatatgctt 240
 ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg 300
 catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgc ccatTTTTat taactttaaa taattggttg 360

tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttggt ttccatatt 420
 catatgtcaa aacctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaatttcg 480
 ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt ttataactta 540
 attactaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa 600
 aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca 660
 tatgtttgta aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac 720
 aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc 780

ggcaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg 840
 aaccaactcg gtccatttgc acccetaatc ataatagctt taatatttca agatattatt 900
 aagttaacgt tgtcaatc ctggaattt tgcaaatga atcaagccta tatggctgta 960
 atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa 1020
 atatccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc 1080
 cagaatacaa tgaaccataa agtgattgaa gctcgaata tacgaaggaa caaatatttt 1140

taaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt tcttaacaa 1200

 gcacccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta 1260
 caaaaatfff ggactactat tgggaacttc tctgaaaat agtggccacc gettaattaa 1320
 ggcgcgccga cgaatgtccc cgatcaaatc tgagggacgt taaagcgatg ataaattgga 1380
 accagaatat agaatctttg ttctgctcta gcttttcttc tgtacatfff ttacattag 1440
 actatgattt teattcaata accaaaattc tgaagtttgt catcaagttg ctcaatcaaa 1500
 cttgtaccgg ttigtctcgg ttttatatca gctcactgtt acactttaac caaaatcgg 1560
 ttatgtctta ataaaggaat tgagtcgggt taactcatat ccgtaccaat gcgacgtcgt 1620

 gtcccgcttt cagtagcttt gctcattgic ttctacggga actttcccgg acataggaac 1680
 cgccctttcg ttatcctcat ccatcgtgaa atcaggaat aaatgttcga agatttgagg 1740
 tcaaaagtcg aatttcattg tgtctcttct atttagatac aaaatgaaag caatfffac 1800
 caatffaag ccaaaatffa aaacaacgct gataaagtga aacttgattc gatttatatt 1860
 tcaaccgaaa ctgctgaagc aagaagaaaa agcgttaata cacataacaa gaacgctacc 1920
 gcaaactact aaacgcaaaa cccaatacaa aagtaaaacg cagacgctta agtgagaaac 1980
 ccagaaaaca caaacgcgga tcgggggatc cactagtctc agagcttaat tcttgacgaa 2040

 agtgctcagc acatcgaagt agtcggggaa ggtcttcagg gtgcaccag ggtcccggat 2100
 ggtgacgggg acctcggcac aggcggcaag ggagaaagcc atcgccatcc tgtggtcgtc 2160
 gtacgtgctc atcgccgtca cgttcagctt ctccggcggc gtgatgatgc agtagtccgg 2220
 cccttcctca acagatgctc ccagcttggg tagctcggc cggatcgcaa ccatcctctc 2280
 ggtctccttt actctccagg aagccacgic tctgatggct gtcgggcat cggcaaagag 2340
 ggcaaccaca gcaagagtca tggcgacatc aggcactctg ttcattgga catcaatcgc 2400
 cttaggtgt ttctcctcaa atggtcccgc cgggggcca gtaacagtta cgctagtctc 2460

 ggtccatgta accttcgctc ccatcatctc cagtacctca gcaaacttca catcacctg 2520
 caaaactggtg gtgccacaac ctccacagt cacagtcctt ccagtaattg cagcaccagc 2580
 caagaaatag ctfgcgttg aggcatacacc ttcaacatag gcatttttag gggacttgta 2640
 tttttgacct cccttaafgt agaactctgc ccagctatca gaatgctctg ctttcacacc 2700
 aaaacgctcc atcaatctca atgtcatttc gacgtacgga atggagatta atttatcaat 2760
 gatttcaatc tccacatccc caagagccaa aggagcagcc atcagcaagg cactcaagta 2820
 ctgactgctg atggagccag acagcttgac ctfgccacca ggtagccctc cgattccatt 2880

gacacgaaca ggtgggcagt cagtgccaaag gaaacaatca acatctgcac caagctgctt 2940
caatccgaca accaagtgc caatgggtct ctcctcatt cttggtactc catcaagcac 3000
gtaagttgca tttccaccag cagcagtaac agctgctgtc aaggaccgca ttgcgattcc 3060
agcattcccc aagaagagct gcacttcctc tttagcatcc tcaactggga actttccacc 3120
acagccaaca actacagctc ttttggcagc tttgtccgct tcgacagaga gaccaagagt 3180
cctcaaggcc ccgagcatgt agtggacatc ctcaactgttc agcaggttat caaccactgt 3240
tgtccctcgc gacagggcgg cgagtaggag gatccggttg gaaagcgact tggaccccgg 3300

cagcttgacg gtgccggaga tctccttgat gggctgcagc acgatctcct cggcgccggc 3360
catgcaccgg atccttcgc cgttgctgac gttgccgagg cttctggagg agcggcgggc 3420
gacggggagg ctggcgttgg acttgagccc ctggaacgga gcgacggcgg tggccgacga 3480
ggccatcacc acggtgggag ccatagacag cggcggcagg tacgacagcg tctcgaactt 3540
cttgttgccg taggccggcc acacctgcat acattgaact cttccaccgt tgctgggaag 3600
ggtggagaag tcgttagcct tcttgggtgt ggggaaggcg gcgttgact taaggccggt 3660
gaacggagcc accatgttgg cctgagcagg ggcggtccgg ctaacggtcg cgactgagga 3720

ggagatcgaa gccatgggga tctgcgcatt taacaagaaa ttgaacagtc aattggggat 3780
tttcattatc cataactaaa ttttgaagaa attggaatac taaacgtcac cacttaaac 3840
cctaaccag atgaatcgtt atcgaaccag atataacca aaggggcaaa attgactcga 3900
aaacctagt tctcgatata cggctaggta atgacaatcg cacacagaca aatctggtta 3960
tacagaactt cgaagcaaga aaaaaacgat gaagaatgga tcatccaata aatcgactag 4020
actcaatctt cacaggttta tcgatccagc aaacttaaaa gacggacctt tattttcaaa 4080
ctggaatggg acaaaaccgg aaactctatt gtcgtaaaat cagatcgagg agacagtaac 4140

agaaaaaaca ttaaaaagta atggaagac ctaaaccct gatctaatta caaacaatc 4200
atacctgttc ttcgcctgag gggttcgaaa tcgataagct tggatcctct agagtcgaga 4260
gaaattgatg tctgtagaag aagaagaacg gttaagagta gatttgggtg agaaagatgt 4320
gaaattgttt ttataggcaa agacggagag tctatTTTTT gagcaatcag atcgcatatt 4380
aaatctaacg gctgagatat cgatccgtgt gtacaataaa atgatgtata aaccgtcgat 4440
ctgttttaat cgacggttca tattagtgat ccgctgatg gcagtgatag ccaactaagaa 4500
tcgtcttttg ttttacctgt ggcgccacaa attagggtaa tgaagcggca atattttgga 4560

actcgaaaa taaaattgag ccatcacatt atttgaaaat tttcacatgc ttttatttta 4620
aaaaccacg aattacaagt tacaaccgaa aaagatttat aatatagtga tttatactaa 4680
ttttgtagta gcttaatgta tattgatact ggaaaaacaa tgacaatcat atgttagtat 4740

tatcaagtta tcgtattgat attgatattg gaacatacaa tgggtattgc cttctttcga 4800
 ccataaataat caccaaattt acaaagtttg tgtataccaa gttatcaatt gtaaatggga 4860
 tgtcaacatt ttaatttccc tttgagaaac tatagaccac aagaacacac ttcaatagat 4920
 aaagtaacta ttiacataag aggtttttaa atcacattaa caaaaataat taccaaccgg 4980

cactcacaaa tacaacaga gcacacgaca tgtcaaagcc acaagtaaat tcgttgagtg 5040
 gtggtttcat tacaatttg tcaactgcag cacaaactat cttgctctgg gaatcatctc 5100
 agcatcaaag atcatgctca cttcagggga acttagtgta tccatgcctc gactcatatt 5160
 tctcctgcac atgcatcctg caggggcgcg ccatgcccg gcaagcggcc gcacaagttt 5220
 gtacaaaaaa gcaggctccg cgggtgactga ctgaaaagct tgtcgacctg caggtaacg 5280
 gatcaggata ttcttgitta agatgttgaa ctctatggag gtttgtatga actgatgatc 5340
 taggaccgga taagtccct tcttcatagc gaacttattc aaagaatgtt ttgtgtatca 5400

ttcttgttac attgttatta atgaaaaat attattggtc attggactga acacgagtgt 5460
 taaatatgga ccaggcccca aataagatcc attgatatat gaattaaata acaagaataa 5520
 atcgagtcaac caaaccactt gcctttttta acgagacttg ttcaccaact tgatacaaaa 5580
 gtcattatcc taigcaaac aataatcata caaaaatc caataacact aaaaaattaa 5640
 aagaaatgga taatttcaca atatgttata cgataaagaa gttacttttc caagaaattc 5700
 actgatttta taagccact tgcattagat aaatggcaaa aaaaaacaaa aaggaaaaga 5760
 aataaagcac gaagaattct agaaaatac aaatacgtt caatgcagtg ggaccacgg 5820

ttcaattatt gccaattttc agctccaccg tatatttaa aaataaaacg ataatgctaa 5880
 aaaaataaa atcgtaacga tcgttfaatc tcaacggctg gatcttatga cgaccgttag 5940
 aaattgtggt tgtcgacgag tcagtaataa acggcgtcaa agtggttgca gccggcacac 6000
 acgagtcgtg tttatcaact caaagcacia aacttttcc tcaacctaaa aataaggcaa 6060
 ttagcaaaa acaactttgc gtgtaacaa cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag 6120
 ctattgcttc accgcttag ctttctctg acctagctgt cctctcttt tcttctctt 6180
 ctctataaa acaataccca aagcttcttc ttcacaattc agatttcaat tctcaaaaat 6240

cttaaaaact ttctctcaat tctctctacc gtgatcaagg taaatttctg tgttccttat 6300
 tctctcaaaa tcttcgattt tgttttcgtt cgatcccaat ttcgtatag ttctttggtt 6360
 tagattctgt taactttaga tcgaagacga ttttctgggt ttgatcgta gatatcatct 6420
 taattctcga ttagggtttc ataaatatca tccgatttgt tcaaataatt tgagttttgt 6480
 cgaataatta ctcttcgatt tgtgatctct atctagatct ggtgttagtt tctagtttgt 6540
 gcgatcgaat ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagagatctc catggctcag 6600

accactctcc aaatcacacc cactgggtgcc accttgggtg ccacagtcac tgggtgtcac 6660

cttgccacac ttgacgatgc tggtttcgct gccctccatg cagcctggct tcaacatgca 6720

ctcttgatct tccttgggca acacctcagc aatgaccaac agattacctt tgctaaacgc 6780

tttggagcaa ttgagaggat tggcggaggf gacattgttg ccatatccaa tgtcaaggca 6840

gatggcacag tgcgccagca ctctctgct gagtgggatg acatgatgaa ggtcattgtg 6900

ggcaacatgg cctggcacgc cgactcaacc tacatgccag tcatggctca aggagctgtg 6960

ttcagcgcag aagtgtccc agcagttggg ggcagaacct gctttgctga catgagggca 7020

gcctacgatg cccttgatga ggcaaccctg gctcttgctt accaaaggtc tgctcgtcac 7080

tccttgtgt attctcagag caagtggga catgtccaac aggccgggtc agcctacata 7140

ggttatggca tggacaccac tgcaactcct ctgagaccat tggtaaggt gcacctgag 7200

actggaagge ccagcctctt gatcggcgcg catgccatg ccatccctgg catggatgca 7260

gctgaatcag agcgcttctt tgaaggactt gttgactggg cctgccaggc tcccagatc 7320

catgctcacc aatgggctgc tggagatgtg gttgtgtggg acaaccgctg tttgctccac 7380

cgtgctgagc cctgggattt caagtggca cgtgtgatgt ggcaactccag actcgtgga 7440

cgcccagaaa ctgagggtgc tgccttgggt tgagtagtta gcttaatcac ctgagctcg 7500

gtcaccagca taatttttat taatgtacta aattactgtt ttgttaaatg caattttgct 7560

ttctcgggat ttaaatatca aaatctattt agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg 7620

ctggagaate gatctgctat cataaaaatt acaaaaaaat tttatttggc tcaattattt 7680

taggatgtgt attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac c attgtgattg 7740

agaagatcag cgatacgaat tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa 7800

gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaaaag acagataaaag ccacgcacat 7860

ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc 7920

atgtcttcaa ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc 7980

ggatcattca ttgtttgttt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg ttgcggccgc 8040

gcgccgacce agctttcttg taaaaagtgg ttgccccgcg ttaattaaat ttaaatgccc 8100

ggcgctttaa acgccccgcg ttaattaagg ccggcctgca gcaaaccag aaggtaatta 8160

tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa 8220

gctcagcaag aagcagatca atatcgcgca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa 8280

tgtacagata caagatccta tactgccaga atacgaagaa gaatcgtag aaattgaaaa 8340

agaagaacca ggcgaagaaa agaacttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa 8400
 gaagaagata aggtcgggta ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat 8460
 gtaagggcgg aaagtaacct tatcaciaag gaatcttate cccactact tatectttta 8520
 tatttttccg tgcattttt gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt 8580
 tgtgaaaaca agaaaaaatt tgggtgaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact 8640
 tcagagaaat ttgtaagttt gtagatctcc atgtctccgg agaggagacc agttgagatt 8700
 aggccagcta cagcagctga tatggccgcg gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag 8760

 acgtctacag tgaactttag gacagagcca caaacaccac aagagtggat tgatgatcta 8820
 gagaggttgc aagatagata cccttgggtg gttgctgagg ttgaggggtg tttggctggt 8880
 attgcttacg ctgggccctg gaaggctagg aacgcttacg attggacagt tgagagtact 8940
 gtttacgtgt cacatagcca tcaaaggttg ggcctaggat ccacattgta cacacatttg 9000
 cttaatgcta tggaggcgcg aggttttaag tctgtggttg ctgttatagg ctttccaaac 9060
 gatccatctg ttaggttgcg tgaggctttg ggatacacag cccggggtac attgcgcgca 9120
 gctggataca agcatgggtg atggcatgat gttgggtttt ggcaaaggga ttttgagttg 9180

 ccagctctc caaggccagt taggccagt acccagatct gaggtaccct gagcttgagc 9240
 ttatgagctt atgagcttag agctcggatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat 9300
 tcgcccttga ctatagtag gccccagatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg 9360
 ttgatcctat ctgtgttga atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacagcc 9420
 ggccaaagga acccaaggtg aggtgggcta tggctctcag ttccttgtgg aagcgtttg 9480
 tctaaggtgc agaggtgta gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatattg 9540
 tgatcctacg taaggatatt aaagtatgta ttcactacta atataatcag tttattccaa 9600

 tatgtactac gatttccaat gtctttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa 9660
 tccccgtgta ctttctttta atccaggatg aaataatag ttattataat ttttgcgatt 9720
 tggctcgta taggaattga agtgtgcttg cggtcgccac cactccatt tcataatttt 9780
 acatgtattt gaaaaataa aatttatggt attcaattta aacacgtata cttgtaaaga 9840
 atgatattt gaaagaaata tagtttaaat atttattgat aaaataaca gtcaggtatt 9900
 atagtccaag caaaacata aatttattga tgcaagtta aattcagaaa tatttcaata 9960
 actgattata tcagctggta cattgccgta gatgaaagac tgagtgcgat attatggtgt 10020

 aatacatage ggccgggttt ctagtcaccg gttaggatcc gtttaactc gaggctagcg 10080
 catgcacata gacacacaca tcatectatt gatgcttggg aataattgtc attagattgt 10140
 ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aattttagac aagtatcaa cggatgtgac 10200

ttcagtacat taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttg

10256