

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5513883号
(P5513883)

(45) 発行日 平成26年6月4日(2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年4月4日(2014.4.4)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	1 O 3
A 01 H	5/00	(2006.01)	A 01 H	5/00	A
A 01 H	1/00	(2006.01)	A 01 H	1/00	A
A 01 N	63/02	(2006.01)	A 01 N	63/02	E

請求項の数 23 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-513394 (P2009-513394)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月24日 (2007.5.24)
 (65) 公表番号 特表2009-538153 (P2009-538153A)
 (43) 公表日 平成21年11月5日 (2009.11.5)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/069662
 (87) 國際公開番号 WO2007/140256
 (87) 國際公開日 平成19年12月6日 (2007.12.6)
 審査請求日 平成22年2月10日 (2010.2.10)
 (31) 優先権主張番号 60/808,834
 (32) 優先日 平成18年5月26日 (2006.5.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-7455

(73) 特許権者 501231613
 モンサント テクノロジー エルエルシー
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイ
 ス ノース リンドバーグ ブールバード
 800
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100156122
 弁理士 佐藤 剛
 (72) 発明者 ヘザー・アンダーソン
 アメリカ合衆国 63167ミズーリ州セン
 トルイス、ノース・リンドバーグ・ブル
 バード800番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック事象MON89034に対応するトウモロコシ植物および種子ならびにそれらを検出および使用するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはその相補体、ならびに、Cry1A.105コード配列およびCry2Ab2コード配列を含むDNA分子。

【請求項 2】

配列番号：4に示されるヌクレオチド配列またはその相補体を含む、請求項1のDNA分子。

【請求項 3】

配列番号：1に示されるヌクレオチド配列またはその相補体をさらに含む、請求項1のDNA分子。 10

【請求項 4】

配列番号：3に示されるヌクレオチド配列またはその相補体を含む、請求項3のDNA分子。

【請求項 5】

配列番号：5で示されるヌクレオチド配列またはその相補体を含む、請求項1から4のいずれかに記載のDNA分子。

【請求項 6】

請求項1から5のいずれかに記載のDNA分子を含むトランスジェニックトウモロコシ植物細胞。

【請求項 7】

20

20

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の D N A 分子を含むトランスジェニックトウモロコシ植物またはその一部。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のトランスジェニックトウモロコシ植物の種子であって、当該 D N A 分子を含む種子。

【請求項 9】

トランスジェニックトウモロコシ植物またはその一部であって、前記トウモロコシ植物の種子は、受入番号PTA-7455としてAmerican Type Culture Collectionに寄託されている、トランスジェニックトウモロコシ植物またはその一部。

【請求項 10】

Cry2Abをコードする D N A ならびに配列番号：1 および配列番号：2 のヌクレオチド配列を有する D N A が、前記トウモロコシ植物またはその一部の細胞におけるゲノムの一部を形成している、昆虫抵抗性トウモロコシ植物またはその一部。

【請求項 11】

Cry1A.105をコードする D N A をさらに含む、請求項 10 に記載の昆虫抵抗性トウモロコシ植物またはその一部。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の昆虫抵抗性トウモロコシ植物の種子であって、Cry2Abをコードする D N A ならびに配列番号：1 および配列番号：2 のヌクレオチド配列を有する D N A を含む、種子。

20

【請求項 13】

請求項 7 に記載のトランスジェニックトウモロコシ植物またはその一部に由来する組成物であって、検出可能な量の前記 D N A 分子を含み、コーンミール、コーン油、コーンケーキ、トウモロコシ種子、トウモロコシ胚芽、コーンスターーチ、トウモロコシ粉、トウモロコシ花粉、トウモロコシ花柱、コーン浸出液、コーンモルト、コーンシュガー、コーンシロップ、コーン油から生産されるマーガリン、乾燥蒸留粕 (D D G S) 、化粧品およびバルкиング剤よりなる群から選択される商品生産物である、組成物。

【請求項 14】

昆虫抵抗性トウモロコシ植物を作出する方法であって、

(a) 請求項 7 に記載のトランスジェニックトウモロコシ植物と、異なるトウモロコシ植物とを交配し；

30

(b) 工程 (a) の交配に由来する少なくともひとつの子孫植物を得；ついで、

(c) 配列番号：1 および配列番号：2 に示されるヌクレオチド配列を含む子孫を選択することを含み、ここに、選択される子孫が昆虫抵抗性トウモロコシ植物である、方法。

【請求項 15】

昆虫抵抗性トウモロコシ植物を作出する方法であって、

(a) トウモロコシ植物細胞を請求項 1 から 5 のいずれかに記載の D N A 分子で形質転換し；ついで、

(b) 前記 D N A 分子を含み、かつ、昆虫抵抗性であるトウモロコシ植物を、前記形質転換細胞から再生することを含む方法。

40

【請求項 16】

昆虫の侵入からトウモロコシ植物を保護するための方法であって、鱗翅目害虫の食餌中に、請求項 7 、 9 、 10 および 11 のいずれかに記載のトランスジェニックトウモロコシ植物またはその一部の細胞または組織を殺虫的に有効な量提供することを特徴とする方法。

【請求項 17】

前記鱗翅目害虫が、ヨトウムシ (Spodoptera frugiperda) 、アワノメイガ (Ostrinia nubilalis) 、オオタバコガ (Helicoverpa zea) 、トウモロコシノメイガ (Diatraea grandiosella) およびタマナヤガ (Agrotis ipsilon) よりなる群から選択される請求項 16

50

に記載の方法。

【請求項 18】

生物学的サンプル中の配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択されるDNA分子の存在を検出する方法であって、

(a) 生物学的サンプルを、配列番号：3もしくはその相補体、配列番号：4もしくはその相補体または配列番号：5もしくはその相補体の連続的な少なくとも15ヌクレオチドを含むヌクレオチドであって、トウモロコシ植物MON89034またはその子孫から抽出されたDNAに対する診断であるDNAプライマーまたはプローブとして機能する、DNAプライマー対と接触させ；

(b) 核酸増幅反応条件に供し；

10

(c) 核酸増幅反応を行って、DNAアンプリコン分子を生成し；ついで、

(d) 前記DNAアンプリコン分子を検出することを含み、ここに、配列番号：1、配列番号：2およびそれらの相補体の少なくとも一つを含むアンプリコンの検出が、前記生物学的サンプル中の前記DNA分子の存在を示唆するものである方法。

【請求項 19】

前記生物学的サンプルがトウモロコシ植物から抽出されたDNAサンプルである、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

生物学的サンプルにおける配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択されるDNAの存在を検出するためのキットであって、トウモロコシ事象MON89034および/またはその子孫に対して特異的なDNAプライマーまたはプローブとして機能するヌクレオチドであって、配列番号：3もしくはその相補体、配列番号：4もしくはその相補体または配列番号：5もしくはその相補体の連続的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、少なくともひとつのDNA分子を含む、キット。

20

【請求項 21】

前記少なくともひとつのDNA分子が、配列番号：1、配列番号：2またはその相補体を含む、請求項20に記載のキット。

【請求項 22】

生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034を含むトウモロコシ植物のDNAの接合状態を決定する方法であって、

30

(a) 前記サンプルを、(1)トウモロコシ事象MON89034 DNAを含む核酸増幅反応に用いるとき、トウモロコシ事象MON89034に対する診断である第1のアンプリコンを生成し、(2)トウモロコシ事象MON89034 DNA以外のトウモロコシゲノムDNAを含む核酸増幅反応に用いるとき、トウモロコシ事象MON89034 DNA以外のトウモロコシゲノムDNAに対する診断である第2のアンプリコンを生成する、配列番号：6、配列番号：7および配列番号：10のヌクレオチド配列を有するDNAを含むプライマーセットと接触させ；

(b) 核酸増幅反応を行い；ついで、

(c) そのようにして生成されたアンプリコンを検出することを含み、ここに、両方のアンプリコンの存在の検出は、前記サンプルがトウモロコシ事象MON89034 DNAに対してヘテロ接合性であることを示唆するものであって、第1のアンプリコンのみの検出は、前記サンプルがトウモロコシ事象MON89034 DNAに対してホモ接合性であることを示唆するものである、方法。

40

【請求項 23】

前記プライマーセットが、さらに配列番号：14および配列番号：15のヌクレオチド配列を有するDNAと一緒に使用する、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2006年5月26日に出願された米国仮出願番号60/808,834に対して優先権の利益

50

を主張するものである。

【0002】

発明の分野

本発明は、トランスジェニックトウモロコシ事象 (event) MON89034ならびにその植物体の一部および種子に関する。この事象は、鱗翅 (Lepidoptera) 目の昆虫による昆虫侵入に抵抗性を示す。本発明はまた、このトランスジェニック事象に特有のヌクレオチド配列の存在について探索するときにこのトランスジェニック事象の存在についての診断であるDNAを含む植物および種子を使用するための方法、ならびに、このトランスジェニック事象に特有の特異的なヌクレオチド配列を検出することによって生物学的サンプル中の前記トウモロコシ事象の存在を検出するための方法にも関する。本発明は、この事象に特有のヌクレオチド配列を提供する。10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

本発明は、本明細書中で事象MON89034と呼ばれるトウモロコシ (Zea mays) 植物の鱗翅目 (Lepidopteran) 抵抗性トランスジェニック品種に関し、また、トウモロコシの任意のサンプルまたは品種において検出されるときに、そのサンプルまたは品種中に存在する、トランスジェニックトウモロコシ植物事象MON89034の存在についての診断である特有のDNA配列に関し、そして、トウモロコシMON89034ならびにそれから得られる子孫植物および種子における導入遺伝子 / ゲノム挿入領域の検出にも関する。20

【0004】

トウモロコシ植物事象MON89034は、すべて農学的に重要な害虫であるヨトウムシ (Fall armyworm) (*Spodoptera frugiperda*)、アワノメイガ (European corn borer) (*Ostrinia nubilalis*)、オオタバコガ (corn earworm) (*Helicoverpa zea*)、トウモロコシノメイガ (southwestern corn borer) (*Diatraea grandiosella*) およびタマナヤガ (black cutworm) (*Agrotis ipsilon*) などの鱗翅 (Lepidoptera) 科の昆虫に対して特に抵抗性である。

【0005】

トウモロコシは重要な作物であり、世界の多くの地域の主要な食料源である。この生産物の農学的な特性および品質を向上させる目的で、バイオテクノロジーの手法がトウモロコシに適用されてきた。そのような農学的な特性の 1 つは、害虫抵抗性、例えば、殺虫物質をコードする 1 つ以上の遺伝子を含むように遺伝的に操作されたトウモロコシ植物に現れる、鱗翅目および鞘翅目 (coleopteran) の種に対する遺伝的に操作された抵抗性である（例えば、特許文献 1 および特許文献 2 を参照）。ある交配の 1 つ以上の子孫がトランスジェニック物質を含んでいるか否かを判定するためには、生物学的サンプル中の特定のトランスジェニック事象の存在を検出することが有益である。例えば、サンプル中の事象の検出は、用途をライセンス供与するために、純度の規格を確立して維持するために、規制当局に従うために、食品成分の規格に従うために、トランスジェニック事象に関する任意の特許権者または実施権者からのライセンスなしに 1 つ以上の特定の個人または団体が特定の事象を使用していることを立証する訴訟手続きにおいて使用するために、そして、様々な政府規制および / または法律の順守を保証するために、重要である。3040

【0006】

さらに、特定の植物の検出を可能にする方法は、組換え作物植物から得られる食料の市販前承認および表示が求められる規制に従うときに役立ち得る。サンプル中におけるトランスジェニック事象の存在に反対している個人または団体もまた、彼らが、その生産物中に導入遺伝子が存在しないことを利用するビジネスに投資することができるよう、サンプル中の導入遺伝子の存在を検出するための信頼できる方法を望んでいる。

【0007】

これらの利点にもかかわらず、昆虫は、ただ 1 つの *B. thuringiensis* - エンドトキシンを発現する植物に対する抵抗性を発達させ得る可能性がある。そのような抵抗性は、広50

まり得、单一のBt遺伝子を含む生殖質の商業的価値を明らかに制限し得る。

【0008】

トランスジェニック植物を介してもたらされ、また、標的の害虫を管理するのと同時にそのような殺虫物質に抵抗性である害虫の発生の可能性を低下させる際に関連する、殺虫物質の有効性を増加させる1つの有力な方法は、トランスジェニック作物が高レベルのこれらの殺虫物質（例えば、*Bacillus thuringiensis*デルタ - エンドトキシン）を確実に発現させることである（非特許文献1、非特許文献2）。さらに、害虫の群に対して有効であり、様々な作用様式を介してその効果を発揮する殺虫性の遺伝子を多く有することによって、抵抗性の発生から保護することができる。抵抗性の発生は、同じ昆虫種に対して重複した毒性を示す2つ以上の殺虫性の活性を発現する作物を提供する結果、実質的に遅延し得る。そのような二重の作用様式を達成するための1つの手段は、Btトキシンによって標的化される特定の昆虫種の必須遺伝子を抑制するために標的化する目的で提供されるds RNAとともに、同じ昆虫種に対して毒性であるBt遺伝子を発現する植物をもたらすことあり得、そのdsRNAは、標的害虫が摂取する際にRNAi反応を誘発して、その昆虫が、dsRNAまたはBt遺伝子のいずれかに対する抵抗性を発生させる場合において冗長性の手段をもたらすものである。あるいは、植物における2つ以上の殺虫性トキシン（特に、両方ともが高レベルで発現するとき、その両方ともが同じ昆虫種に対して毒性であるが、各々が発揮する殺傷活性の様式が異なる）の同時発現によって、有効な抵抗性管理のための手段が提供される。そのような併用において有用な殺虫物質の例としては、Btトキシン、*Xenorhabdus* sp.または*Phototrichius* sp.の殺虫性タンパク質、脱アレルゲン化した(deallergenized)および脱グリコシルしたパタチントンパク質ならびに/またはパークテイン(permuttein)、植物レクチンなどが挙げられるがこれらに限定されない。
10

【0009】

植物における外来遺伝子の発現は、おそらく、クロマチン構造（例えば、ヘテロクロマチン）に起因する染色体上の位置または組み込み部位の近接した転写制御エレメント（例えば、エンハンサー）の近接によって影響されることが知られている（非特許文献3）。この理由で、目的の導入遺伝子の最適な発現を特徴づける事象を同定するためには、多数の事象をスクリーニングする必要があることが多い。その場合でさえも、手中の数十または数百もの異なるトランスジェニック事象に関して、少なくとも2つの異なるトキシンまたは殺虫物質の最適なレベルの発現を提供し、そして、植物ゲノムのいくつかの必須領域または部分的に必須の領域への挿入の結果として、または、導入遺伝子の発現のレベルによってもたらされる有毒作用の結果として、任意の望ましくない農学的な欠陥または植物有毒作用を有しない、単一のトランスジェニック事象の同定に成功する確実性はない。例えば、事象間で導入遺伝子の発現のレベルにおいて幅広いバリエーションが存在し得ることは、植物および他の生物において観察されている。発現の空間的または時間的なパターンが異なること、例えば、様々な植物組織において導入遺伝子の相対的な発現が異なること（これは、導入される遺伝子構築物内に存在する転写制御エレメントから予想されるパターンに対応しないかもしれない）もあり得る。この理由で、数百から数千もの異なる事象を作製し、そして商業的な目的のために所望の導入遺伝子の発現レベルおよびパターンを有する単一の事象についてそれらの事象をスクリーニングすることが通常である。所望のレベルまたはパターンの導入遺伝子の発現を有する事象が、従来の育種方法を使用して交配することによって導入遺伝子を他の遺伝的背景に遺伝子移入するのに有用である。そのような交雑種の子孫は、最初の形質転換体の導入遺伝子の発現特性を維持している。この方策は、特定の地域的な生育条件に適切に適応されている多くの品種において、信頼できる遺伝子発現を確実にするために使用される。
30
40

【0010】

任意の周知の核酸検出方法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または核酸プローブを使用するDNAハイブリダイゼーション）によって導入遺伝子の存在を検出することができる。これらの検出方法は、一般に、頻繁に使用される遺伝的エレメント（例えば、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子、または、導入遺伝子から発現される目的

のタンパク質もしくはdsRNAをコードするコード配列など)に焦点を当てている。結果として、そのような方法は、その挿入されたDNAに隣接する染色体DNAの配列(「フランギングDNA」)が既知でない限り、様々な事象、特に、同じDNA構築物を使用して作製されるものを識別するためには、有用でない場合がある。導入遺伝子を植物ゲノムに導入するために使用される方法によっては、植物に導入することを意図されたトランスジェニックDNAに隣接する植物ゲノム配列の同定をしばしば大幅に(severly)複雑にする異常な(abberant)影響または普通でない影響が観察され得る。しばしば、その挿入されたDNAの再編成、隣接ゲノムDNAの再編成または挿入DNAと隣接ゲノムDNAの両方の再編成が、頻繁に生じており、評価される挿入性の事象の解析を複雑にする。ゆえに、サンプルにおける特定のトランスジェニック事象の純度および特徴を選択するための手段、同定し保証するための手段を有することが有益であり、また、これを達成するための唯一の方法は、所望のトランスジェニック事象にのみ関連する1つ以上の特有の配列を同定することであるので、事象がもたらされるようにトランスジェニックDNAが挿入された植物種のDNAを含む生物学的サンプル中のそのような配列の存在は、そのようなサンプル中の事象に対する診断である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

特許文献1：米国特許第6,489,542号明細書

特許文献2：米国特許第6,620,988号明細書

【非特許文献】

【0012】

非特許文献1：McGaughey and Whalon (1992), Science 258 : 1451-55

非特許文献2：Roush (1994) Biocontrol. Sci. Technol.. 4 : 501-516

非特許文献3：Weising et al. (1980) Ann. Rev. Genet 22 : 421-477

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

発明の要旨

本発明は、American Type Culture Collection (ATCC) に受入番号PTA-7455として2006年3月28日に寄託された種子を有する、MON89034と命名されたトランスジェニックトウモロコシ植物およびその(挿入されたトランスジェニックDNAに相当する少なくとも1つの対立遺伝子も含む限り)トウモロコシ事象MON89034と識別不能な子孫に関する。本発明の別の態様は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、子孫植物もしくは種子またはトウモロコシ事象MON89034の植物および種子の再生可能な一部である。本発明はまた、トウモロコシ事象MON89034の植物体の一部分を含み、その植物体の一部分が、上で示したようなポリヌクレオチドを少なくとも含む限り、これらの一部分として、花粉、胚珠、花、苗条、根、柄、花柱、雄穂、穂および葉が挙げられるが、これらに限定されない。MON89034事象に対応するトウモロコシ植物の分野におけるMON89034のゲノム内に含まれる新規遺伝的組成物およびMON89034からの製品(例えば、粗挽き粉、小麦粉、油、パルプおよび残渣バイオマス(biomass left over))は、本発明の一態様である。

【0014】

本発明は、トウモロコシ事象MON89034の生理学的および形態学的な特徴のすべてを有する昆虫抵抗性トウモロコシ植物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の一態様によれば、MON89034と命名された新規トウモロコシ植物由来の導入遺伝子/ゲノム挿入領域の存在を検出するための組成物および方法が提供される。配列番号：1(配列番号：5の2051位～2071位に位置する)および配列番号：2(1129

10

20

30

40

50

5位～11314位に位置する)およびその相補体よりなる群から選択されるMON89034の少なくとも1つの結合配列を含むDNA配列が提供される;ここで、結合配列は、ゲノムに挿入された異種DNAと挿入部位に隣接するトウモロコシ細胞由来のDNAとの間の境界に係り、その結合配列は、その事象についての診断である(図1)。トウモロコシ事象MON89034およびこれらのDNA分子を含む種子は、本発明の一態様である。

【0016】

トウモロコシ事象MON89034由来の新規導入遺伝子／ゲノム挿入領域を含むDNA配列である配列番号：3および配列番号：4(図1)は、本発明の態様である。これらの分子を含むトウモロコシ植物および種子もまた、本発明の態様である。

【0017】

本発明の別の態様によれば、DNA検出法において使用するための2つのDNA分子が提供され、第1のDNA分子は、配列番号：3のDNA分子の導入遺伝子領域の任意の部分の連続した少なくとも11以上のポリヌクレオチドおよび配列番号：3の5'フランкиングトウモロコシゲノムDNA領域の同様の長さの任意の部分のDNA分子を含み、ここで、これらのDNA分子は、共に使用されるとき、アンプリコンを生成するDNA増幅法においてDNAプライマーとして有用である。DNA増幅法においてこれらのDNAプライマーを使用して生成するアンプリコンは、そのアンプリコンが配列番号：1を含むとき、トウモロコシ事象MON89304についての診断である。配列番号：3の任意の部分と相同性であるかまたは相補的なDNAプライマーによって生成される任意のアンプリコンおよび配列番号：1を含む任意のアンプリコンは、本発明の一態様である。

10

【0018】

本発明の別の態様によれば、DNA検出法において使用するための2つのDNA分子が提供され、第1のDNA分子は、配列番号：4のDNA分子の導入遺伝子領域の任意の部分の連続した少なくとも11以上のポリヌクレオチドおよび配列番号：4の3'フランкиングトウモロコシゲノムDNAの同様の長さの任意の部分のDNA分子を含み、ここで、これらのDNA分子は、DNA増幅法においてDNAプライマーとして有用である。DNA増幅法においてこれらのDNAプライマーを使用して生成されるアンプリコンは、そのアンプリコンが配列番号：2を含むとき、トウモロコシ事象MON89304についての診断である。配列番号：4の任意の部分と相同性であるかまたは相補的なDNAプライマーによって生成される任意のアンプリコンおよび配列番号：2を含む任意のアンプリコンは、本発明の一態様である。

20

【0019】

本発明の別の態様によれば、サンプル中のトウモロコシ事象MON89034に対応するDNAの存在を検出する方法が提供される。そのような方法は：(a)トウモロコシ事象MON89034由来のゲノムDNAを用いる核酸増幅反応において使用されるときにトウモロコシ事象MON89034についての診断であるアンプリコンを生成するプライマーセットとDNAを含むサンプルとを接触させる工程；(b)核酸増幅反応を行うことによって、そのアンプリコンを生成する工程；および(c)配列番号：1または配列番号：2を含むアンプリコンを検出する工程を含む。

30

【0020】

トウモロコシ植物もしくは種子またはその植物もしくは種子MON89034から得られる製品であって、そのゲノムDNAは、配列番号：5およびその相補体から本質的になるDNA分子を含む。トウモロコシ植物もしくは種子またはその植物もしくは種子MON89034から得られる製品であって、そのゲノムDNAは、上記トウモロコシ植物もしくは種子または製品から単離されるとき、配列番号：5のヌクレオチド2061～11305およびその相補体を組み込んでいるDNA分子を含む。

40

【0021】

トウモロコシ植物もしくは種子またはその植物もしくは種子MON89034から得られる製品であって、そのゲノムDNAは、上記トウモロコシ植物もしくは種子または製品から単離されるとき、DNA増幅法においてアンプリコンを生成し、ここで、DNAプライマー分子である配列番号：6および配列番号：7が、そのDNA増幅法において使用される。

50

【 0 0 2 2 】

本発明の別の態様によれば、サンプル中のMON89034事象に対応するDNAの存在を検出する方法であって、そのような方法は：(a)ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下においてトウモロコシ事象MON89034由来のゲノムDNAとハイブリダイズし、かつ、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下においてコントロールトウモロコシ植物とハイブリダイズしないプローブと、DNAを含むサンプルとを接触させる工程；(b)そのサンプルおよびプローブをストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；および(c)トウモロコシ事象MON89034 DNAへのそのプローブのハイブリダイゼーションを検出する工程；を含み、ここで、前記プローブは、配列番号：1および配列番号：2を含む。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の別の態様は、トウモロコシ事象MON89034の子孫の接合状態を決定する方法であり、その方法は：(a)SQ2842(配列番号：6)、SQ2843(配列番号：7)、SQ6523(配列番号：10)、SQ6524(配列番号：11)、PB880(配列番号：14)およびPB2931(配列番号：15)を含むプライマーセットに(トウモロコシ事象MON89034由来のゲノムDNAを用いる核酸増幅反応において使用されるときに、トウモロコシ事象MON89034についての診断である第1のアンプリコンを生成する)とトウモロコシDNAを含むサンプルを接触させる工程および(b)核酸増幅反応を行うことによって、第1のアンプリコンを生成する工程；および(c)第1のアンプリコンを検出する工程；および(d)トウモロコシDNAを含むサンプルを前記プライマーセット(トウモロコシ植物由来のゲノムDNAを用いる核酸増幅反応において使用されるときに、トウモロコシ事象MON89034と同定される導入遺伝子挿入物のトウモロコシゲノム領域に対して相同意的な天然のトウモロコシゲノムDNAを含む第2のアンプリコンを生成する)と接触させる工程；および(e)核酸増幅反応を行うことによって、第2のアンプリコンを生成する工程および(f)第2のアンプリコンを検出する工程；および(g)サンプル中の第1のアンプリコンと第2のアンプリコンとを比較する工程を含み、ここで、両方のアンプリコンの存在は、そのサンプルが導入遺伝子挿入物に対してヘテロ接合性であることを示す。

20

【 0 0 2 4 】

本発明の一態様は、殺虫的に有効な量のトウモロコシ事象MON89034を鱗翅目害虫の食餌中に提供している。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の別の態様は、トウモロコシ事象MON89034から得られる商品または食料品の形態で組成物または生物学的サンプルを提供しており、その商品または食料品は、一本のトウモロコシ、脱穀された(shucked)トウモロコシ、トウモロコシ花柱、トウモロコシ花粉、挽き割りトウモロコシ、コーンミール、漬しトウモロコシ、トウモロコシ粉、コーン油、コーンスター、コーン浸出液、コーンモルト、コーンシュガー、コーンシロップ、コーン油から生産されるマーガリン、不飽和コーン油、飽和コーン油、コーンフレーク、ポップコーン、トウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAを含むトウモロコシまたはトウモロコシ製品から生産されるエタノールおよび/またはアルコール飲料、そのようなトウモロコシ事象の発酵から生産される乾燥蒸留粕(DDGS)ならびにそのようなDDGSおよび/またはトウモロコシ(全体か、挽き割りしたものであるかまたは漬したものであるか否かに関係なく)を含む動物飼料、加工食料品、化粧品およびバルкиング剤を含み、それらの中には、生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034の存在についての診断であるポリヌクレオチドの検出可能な量が見出される。食料品としてトウモロコシを提供するための代替の手段は、マイロ(milo)、羊脂(suet)、キビ(millet)、ヒマワリ、エンバク、コムギ、イネ、マメなどとの混合物中のトウモロコシ全体、挽き割りトウモロコシ、漬しトウモロコシおよび前述の様々な形態のもののような様々な形態の飼料用穀物で、トウモロコシを提供することである。そのような商品または食料品中の検出可能な量のヌクレオチド配列(配列番号：1もしくは配列番号：2に示されているような配列またはその相補体)は、サンプル中のDNAが起源であるので、サンプル中

40

50

のそのようなトランスジェニック事象MON89034 DNAの存在についての診断であり、ゆえに、トランスジェニック事象細胞の存在についての診断である。

【0026】

本発明の前述の態様および他の態様は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】ゲノム内に存在するトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034の導入遺伝子挿入物の構成。中央の透けている棒または白棒は、挿入されたDNAを表している。白棒の下は、挿入されたDNA内の様々なエレメントを表している図である。その挿入されたDNAの両端は、任意に5'（この図の左側）および3'（この図の右側）と命名した。右ボーダー配列またはセグメントおよび左ボーダー配列またはセグメントは、挿入されたDNA内の様々なエレメントを図示している図の各端の真下に標した。挿入されたDNA内の発現力セット中の標されたエレメントは、右ボーダーから始まり、連続した順序で：e35Sプロモーター、コムギCAB非翻訳リーダー、イネアクチンイントロン、Cry1A.105に対するコード配列、コムギHSP17 3' 終結配列およびポリアデニル化配列、FMVプロモーター、hsp70イントロン、ルビスコ小サブユニット葉緑体標的ペプチドコード配列、Cry2Abコード配列、nos 3' 終結配列およびポリアデニル化シグナルならびに左ボーダーである。中央の透けている棒または白い棒のいずれかの末端の、垂直に線が引かれた棒は、任意に標した5' および3' トウモロコシゲノムフランкиング配列に相当する。その線が引かれた棒および透けている棒または白棒の上の最も長い黒線は、配列番号：5を表している（この図に示されている完全長配列は、5' フランкиング配列、挿入されたDNA配列および3' フランкиング配列を示している）。配列番号：5と標されたその黒線の上下にある短い黒線は、配列番号：5内のおよその位置を表しており、ここで、特に標された配列の各々（すなわち、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3および配列番号：4）を見ることができる。配列番号：1および配列番号：2ならびに配列番号：1および/または配列番号：2を含むトウモロコシ事象MON89034から得られる任意の配列は、生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAについての診断である。

10

20

【発明を実施するための形態】

【0028】

詳細な説明

30

以下の定義および方法は、本発明をよりよく定義するため、および、本発明を実施する際に当業者を導くために提供される。別段述べられない限り、用語は、関連分野の当業者による慣例的用法に従って理解されるべきである。分子生物学における一般的な用語の定義は、Rieger et al., *Glossary of Genetics : Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag : New York, 1991；およびLewin, *Genes V*, Oxford University Press : New York, 1994内に見られることがある。

【0029】

本明細書中で使用されるとき、用語「トウモロコシ (corn)」は、ジー・メイ (*Zea mays*) またはメイズ (*maize*) を意味し、野生トウモロコシ種をはじめとしたトウモロコシと繁殖することができるすべての植物品種を含む。

40

【0030】

本明細書中で使用されるとき、用語「～を含む」は、「～を含むがそれに限定されない」を意味する。

【0031】

トランスジェニック「事象」は、異種DNA、すなわち、目的の導入遺伝子を含む核酸構築物、を用いて植物細胞を形質転換することによって、その植物のゲノム内に導入遺伝子を挿入することから得られた植物の集団を再分化することによって、そして、特定のゲノム位置への挿入を特徴とする特定の植物を選択することによって、作出される。用語「事象」とは、異種DNAを含む最初の形質転換体およびその形質転換体の子孫のことを指す。

用語「事象」とは、異種DNAを含む形質転換体と別の品種との他家生殖によってもたらさ

50

れる子孫のことも指す。反復親と繰り返し戻し交雑した後でさえも、その挿入されたDNAおよび形質転換された親由来のフランкиングDNAは、その交雫の子孫において同じ染色体位置に存在する。用語「事象」とは、挿入DNAを含む1つの親系統（例えば、最初の形質転換体および自殖によって得られる子孫）と挿入DNAを含まない親系統との交配の結果として、目的の導入遺伝子を含む挿入DNAを受け継ぐ子孫に移入されると予想され得る挿入DNAに直接隣接した隣接ゲノム配列と、その挿入DNAとを含む最初の形質転換体由来のDNAのことも指す。本発明は、事象MON89034 DNA、植物細胞、組織、種子およびMON89034から得られる加工された製品に関する。

【0032】

2つの異なるトランスジェニック植物が、交配されて、独立して分離する2つの付加された外来性遺伝子を含む子孫をもたらし得ることも理解されるべきである。適切な子孫の自殖によって、付加された両方の外来性遺伝子に対してホモ接合性の植物を作出することができる。親植物に対する戻し交雫および非トランスジェニック植物との他家生殖も栄養繁殖と同様に企図される。様々な特性および作物に対して通常使用される他の育種方法の説明は、いくつかの参考文献のうちの1つ、例えば、Fehr, Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987) に見ることができる。

【0033】

「プローブ」は、従来の検出可能な標識またはレポーター分子、例えば、放射性同位体、リガンド、化学発光物質もしくは酵素、と結合した単離された核酸である。そのようなプローブは、本発明の場合において標的核酸の一方の鎖に相補的であり、その事象由来のDNAを含むトウモロコシ植物由来かサンプル由来かに関係なく、トウモロコシ事象MON89034由来のゲノムDNAの一方の鎖に相補的である。本発明のプローブは、標的DNA配列に特異的に結合するデオキシリボ核酸またはリボ核酸だけを含むのではなく、ポリアミドおよび他のプローブ材料も含み、その標的DNA配列の存在を検出するために使用することができる。

【0034】

「プライマー」は、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的な標的DNA鎖とアニールして、そのプライマーと標的DNA鎖との間でハイブリッドを形成し、次いで、ポリメラーゼ、例えば、DNAポリメラーゼによって標的DNA鎖に沿って伸長される、単離された核酸である。本発明のプライマー対とは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または他の従来の核酸增幅方法によって、標的核酸配列の増幅のためにそれらを使用することを指す。

【0035】

プローブおよびプライマーは、通常、11ヌクレオチド長以上、好ましくは18ヌクレオチド以上、より好ましくは24ヌクレオチド以上および最も好ましくは30ヌクレオチド以上である。そのようなプローブおよびプライマーは、高ストリングエンシー・ハイブリダイゼーション条件下において、標的配列に特異的にハイブリダイズする。好ましくは、本発明のプローブおよびプライマーは、標的配列との完全な配列類似性を有するが、標的配列と異なり、かつ、標的配列にハイブリダイズする能力を保持するプローブが従来の方法によって設計され得る。

【0036】

プローブおよびプライマーを調製し、使用するための方法は、例えば、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., vol.1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (本明細書中以後「Sambrook et al., 1989」) ; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (定期的に更新されている) (本明細書中、以後「Ausubel et al., 1992」) ; および Innis et al., PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, Academic Press : San Diego, 1990に記載されている。PCRプライマー対は、例えば、その目的を意図したコンピュータプログラム (例えば、Primer

10

20

30

40

50

(Version 0.5, (著作権) 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)) を使用することによって、既知の配列から得ることができる。

【0037】

本明細書中に開示されるフランкиングDNAおよび挿入配列に基づくプライマーおよびプローブは、従来の方法、例えば、そのような配列の再クローニングおよび配列決定によって、開示される配列を確認するために(および必要であれば訂正するために) 使用することができる。

【0038】

本発明の核酸プローブおよび核酸プライマーは、ストリンジエントな条件下で標的DNA配列にハイブリダイズする。従来の任意の核酸ハイブリダイゼーション方法または増幅方法を使用して、サンプル中のトランスジェニック事象由来のDNAの存在を同定することができる。核酸分子またはそのフラグメントは、ある状況下で他の核酸分子に特異的にハイブリダイズすることができる。本明細書中で使用されるとき、2つの核酸分子は、逆平行の二本鎖核酸構造を形成することができる場合、互いに特異的にハイブリダイズすることができると考えられている。核酸分子が完全な相補性を示す場合、その核酸分子は、別の核酸分子の「相補体」であるといわれる。本明細書中で使用されるとき、一方の分子の又クレオチドのすべてが、他方の又クレオチドに対して相補的であるとき、それらの分子は、「完全な相補性」を示すといわれる。2つの分子が、少なくとも従来の「低ストリンジエンシー」条件下において、互いにアニールしたままでいることが可能な程度に十分に安定して互いにハイブリダイズすることができる場合、「最小限に相補的」であるといわれる。同様に、分子が、従来の「高ストリンジエンシー」条件下において互いにアニールしたままでいることが可能な程度に十分に安定して互いにハイブリダイズすることができる場合、それらの分子は、「相補的」であるといわれる。従来のストリンジエンシー条件は、Sambrook et al., 1989およびHaymes et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC(1985)に記載されている。完全な相補性からの逸脱が、その分子が二本鎖構造を形成する能力を完全に妨げない限り、そのような逸脱は許容される。核酸分子がプライマーまたはプローブとして働くためには、その核酸分子は、使用される特定の溶媒および塩濃度において安定した二本鎖構造を形成することができるように配列において十分に相補的であることだけが必要がある。

【0039】

本明細書中で使用されるとき、実質的に相同性の配列は、高ストリンジエンシー条件下で比較される核酸配列の相補体に特異的にハイブリダイズする核酸配列である。DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件、例えば、約45 における $6.0 \times$ 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 、続いて50 での $2.0 \times$ SSCの洗浄は、当業者に公知であるか、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見ることができる。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50 における約 $2.0 \times$ SSCの低ストリンジエンシーから50 における約 $0.2 \times$ SSCの高ストリンジエンシーより選択され得る。さらに、洗浄工程における温度は、室温、約22 における低ストリンジエンシー条件から約65 における高ストリンジエンシーに、上昇させることができる。温度と塩の両方が変更され得るか、または温度もしくは塩濃度のいずれかが、一定に保たれて、他方が変更され得る。好ましい実施形態において、本発明の核酸は、中程度にストリンジエントな条件、例えば、約 $2.0 \times$ SSCおよび約65 において、配列番号：1 および 2 に示される核酸分子もしくはその相補体またはいずれかのフラグメントの1つ以上に特異的にハイブリダイズする。特に好ましい実施形態において、本発明の核酸は、高ストリンジエンシー条件下において、配列番号：1 および配列番号：2 に示される核酸分子もしくはその相補体またはいずれかのフラグメントの1つ以上に特異的にハイブリダイズする。本発明の一態様において、本発明の好ましいマーカー核酸分子は、配列番号：1 および配列番号：2 に示される核酸配列もしくはその相補体またはいずれかのフラグメントを有する。本発明の別の態様において、本発明の好ましいマーカー核酸分子は、配列番号：1 および配列番号：2 に示される核酸配列もしくはその相補体またはいず

10

20

30

40

50

れかのフラグメントと80%～100%または90%～100%の配列同一性を共有する。本発明のさらなる態様において、本発明の好ましいマーカー核酸分子は、配列番号：1および配列番号：2に示される配列もしくはその相補体またはいずれかのフラグメントと95%～100%の配列同一性を共有する。配列番号：1および配列番号：2は、“DNA markers : Protocols, applications, and overviews : (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY ; (これらのすべてはその全体が本明細書中で参考として援用される)において単純な配列反復DNAマーカー解析について説明されている方法に類似の遺伝的交雑の子孫を同定する植物育種法においてマーカーとして使用され得る。標的DNA分子へのプローブのハイブリダイゼーションは、当業者に公知の多くの方法によって検出することができ、これらとしては、蛍光タグ、放射性タグ、抗体ベースのタグおよび化学発光タグが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0040】

特定の増幅プライマー対を使用する標的核酸配列の増幅（例えば、PCRによる増幅）に関して、「ストリンジエントな条件」は、そのプライマー対が、対応する野生型配列を有するプライマー（またはその相補体）が結合する標的核酸配列にのみハイブリダイズし、そして好ましくは、DNA熱的増幅反応において特有の増幅産物であるアンプリコンを生成することができる条件である。

【0041】

用語「（標的配列）に特異的」とは、プローブまたはプライマーが、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下において、標的配列を含むサンプル中の標的配列にのみハイブリダイズすることを示している。

【0042】

本明細書中で使用されるとき、「増幅されたDNA」または「アンプリコン」とは、核酸鑄型の一部分である標的核酸配列の核酸増幅の産物のことをいう。例えば、交配から得られたトウモロコシ植物が、本発明のトウモロコシ植物由来のトランスジェニック事象ゲノムDNAを含むか否かを判定するために、トウモロコシ植物組織サンプルから抽出されたDNAを、挿入される異種DNAの挿入部位に隣接した植物のゲノム内のフランкиング配列から得られたプライマーおよび挿入される異種DNAから得られる第2プライマーを含むプライマー対を使用する核酸増幅法に供することにより、事象DNAの存在についての診断であるアンプリコンがもたらされ得る。アンプリコンは、ある長さであり、その事象についての診断でもある配列を有する。アンプリコンは、プライマー対+1ヌクレオチド塩基対、好ましくは+約50ヌクレオチド塩基対、より好ましくは+約250ヌクレオチド塩基対およびなおもより好ましくは+約450ヌクレオチド塩基対という、組み合わされた長さの範囲の長さであり得る。あるいは、プライマー対は、挿入ヌクレオチド配列全体を含むアンプリコンを生成するために、その挿入されるDNAの両側におけるフランキング配列から得ることができる。植物ゲノム配列から得られるプライマー対のメンバーは、その挿入されるDNA分子からある距離が置かれ得、この距離は、1ヌクレオチド塩基対から最大約20000ヌクレオチド塩基対の範囲であり得る。用語「アンプリコン」の使用は、DNA熱的増幅反応において形成され得るプライマーニ量体を特に除外する。

【0043】

核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）をはじめとした当該分野で公知の様々な核酸増幅法のいずれかによって達成され得る。種々の増幅法は、当該分野で公知であり、とりわけ、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号ならびにPCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990に記載されている。PCR増幅法は、最大22kbのゲノムDNAおよび最大42kbのバクテリオファージDNAを増幅するように開発されている（Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 5695-5699, 1994）。これらの方法ならびに他の当該分野で公知のDNA増幅方法が、本発明の実施において使用され得る。ATCC番号として寄託されている種子サンプルを含む、異種DNA挿入配列またはトウモロコシ事象MON89034のフランキング配列は、本明細書中に提供される配列から得られるプライマーを使用して、事象からそのような配列を増幅する

10

20

30

40

50

ことによって確認（および必要であれば訂正）した後、PCRアンプリコンまたはクローニングされたDNAの標準的なDNA配列決定を行うことができる。

【0044】

これらの方針によって生成されるアンプリコンは、複数の手法によって検出され得る。そのような方法の1つは、Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994) であり、ここで、隣接するフランкиングゲノムDNA配列と挿入されるDNA配列との両方と重複するDNAオリゴヌクレオチドが設計される。そのオリゴヌクレオチドをマイクロウェルプレートのウェルに固定化する。目的の領域のPCR（挿入される配列中の1つのプライマーおよび隣接するフランкиングゲノム配列中の1つのプライマーを使用して）の後、一本鎖PCR産物は、その固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ得、そして、DNAポリメラーゼおよび予想される次の塩基に特異的な標識ddNTPを使用する単一塩基の伸長反応に対する鑄型として働き得る。読み取りは、蛍光ベースまたはELISAベースであり得る。シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーションおよび単一塩基伸長の成功に起因する挿入配列／フランкиング配列の存在を示唆する。

10

【0045】

別の方針は、Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000) によって記載されているようなピロシーケンス (pyrosequencing) 手法である。この方法では、隣接ゲノムDNAおよび挿入DNA結合と重複するオリゴヌクレオチドを設計する。そのオリゴヌクレオチドを、目的の領域由来の一本鎖PCR産物にハイブリダイズし（挿入配列中の1つのプライマーおよび隣接ゲノム配列中の1つのプライマー）、そしてDNAポリメラーゼ、ATP、スルフリラーゼ (sulfurylase) 、ルシフェラーゼ、アピラーゼ、アデノシン5'ホスホ硫酸およびルシフェリンの存在下においてインキュベートする。dNTPを個々に加え、その取り込みによって、測定される光シグナルが生じる。光シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーションおよび単一の塩基または多数の塩基の伸長の成功に起因する、導入遺伝子挿入物／フランкиング配列の存在を示唆するものである。

20

【0046】

Chen, et al. (Genome Res. 9: 492-498, 1999) によって記載されているような蛍光偏光は、本発明のアンプリコンを検出するために使用され得る方法である。この方法を使用して、隣接ゲノムおよび挿入DNA結合と重複するオリゴヌクレオチドを設計する。そのオリゴヌクレオチドは、目的の領域由来の一本鎖PCR産物にハイブリダイズし（挿入されるDNA中の1つのプライマーおよび隣接ゲノムDNA配列中の1つのプライマー）、DNAポリメラーゼおよび蛍光標識ddNTPの存在下においてインキュベートする。単一塩基伸長によって、ddNTPが取り込まれる。取り込みは、蛍光光度計を使用して偏光の変化として測定され得る。偏光の変化は、増幅、ハイブリダイゼーションおよび単一塩基伸長の成功に起因する導入遺伝子挿入物／フランкиング配列の存在を示唆する。

30

【0047】

Taqman (登録商標) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) は、DNA配列の存在を検出し、定量する方法として説明されており、製造者によって提供される指示書において完全に理解される。簡潔には、隣接ゲノムおよび挿入DNA結合と重複するFRETオリゴヌクレオチドプローブを設計する。そのFRETプローブおよびPCRプライマー（挿入DNA配列中の1つのプライマーおよびフランкиングゲノム配列中の1つのプライマー）を、熱安定性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下で循環される。FRETプローブのハイブリダイゼーションにより、FRETプローブ上のクエンチング部分から蛍光部分の切断および放出がもたらされる。蛍光シグナルは、増幅およびハイブリダイゼーションの成功に起因する、フランкиング／導入遺伝子挿入配列の存在を示唆する。

40

【0048】

Molecular Beaconsは、Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996)において説明されているように、配列検出において使用するためのものであると説明されている。簡潔には、隣接ゲノムおよび挿入DNA結合と重複するFRETオリゴヌクレオチドプローブを設計する。FRETプローブの特有の構造に起因して、そのプローブは、近位に蛍光部分お

50

およびクエンチング部分を保持する二次構造を含むようになる。FRETプローブおよびPCRプライマー（挿入DNA配列中の1つのプライマーおよびフランкиングゲノム配列中の1つのプライマー）を、熱安定性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下で循環される。PCR増幅が成功した後、FRETプローブが標的配列にハイブリダイゼーションすることにより、プローブの二次構造の除去および蛍光部分とクエンチング部分の空間的分離がもたらされ、その分離により、蛍光シグナルが生成される。蛍光シグナルは、増幅およびハイブリダイゼーションの成功に起因するフランкиング／導入遺伝子挿入物配列の存在を示唆する。

【0049】

他の報告されている方法（例えば、マイクロフルイディクス（米国特許公開2006068398、米国特許第6,544,734号））は、DNAサンプルを分離し、そして増幅する方法および装置を提供する。特異的なDNA分子を検出し、定量するために使用される光学色素（WO / 05017181）。ナノチューブ素子（WO / 06024023）は、特異的なDNA分子に結合し、次いで、検出され得るDNA分子またはナノビーズの検出用の電子センサを備える。10

【0050】

本明細書中で開示される組成物を使用するDNA検出キットが提供される。そのキットは、サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの同定に有用であり、少なくとも、適切な事象DNAを含むトウモロコシ植物を育種するための方法に適用され得る。そのキットは、配列番号：1～7に示されるような配列から選択されるセグメントと相同であるかもしくはそれに対して相補的なDNAプライマーおよび／またはプローブ、あるいは、配列表に示されるようなDNAの導入遺伝子の遺伝的エレメント内に含まれたDNAに相同であるかもしくはそれに対して相補的なDNAプライマーまたはプローブを備える。これらのDNA配列は、サンプル中の標的DNAの存在についての診断であるポリヌクレオチドの存在を検出するための、DNA増幅反応において使用され得るか、またはDNAハイブリダイゼーション法においてプローブとして使用され得る。熱的増幅反応における所定のアンプリコンの生成は、サンプル中のPTA-7455ゲノムDNAに対応するDNAの存在についての診断である。ハイブリダイゼーションが選択される場合、生物学的サンプルへのプローブのハイブリダイゼーションの検出は、サンプル中のMON89034トランスジェニック事象DNAの存在についての診断である。典型的には、サンプルは、トウモロコシもしくはトウモロコシ製品またはトウモロコシを使用した副産物である。20

【0051】

本発明は、トウモロコシ事象MON89034と命名されたトランスジェニックトウモロコシ植物、その植物の子孫およびその植物の細胞ならびにその植物から得られる種子を提供する。トランスジェニックトウモロコシ事象を含む前記種子の、植物体に生育させるため、子孫を得るため、細胞を得るため、または作物を得るための代表的な種子は、2006年3月28日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、受入番号PTA-7455を有する。30

【0052】

その植物および細胞ならびにこれらの実施形態などからもたらされる製品は、任意の生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034に由来する任意の細胞から得られるDNAの存在についての診断であるDNAを含む。これは、これらの2つの新規配列が、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034の細胞内に含まれているからである。診断DNAは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。これらの配列の関係は、より詳細には本明細書中および図1を凡例として、そして図1を参照して説明される。40

【0053】

トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAに対してホモ接合性である種子から生長したトウモロコシ植物もまた、本発明の範囲内である。トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAに対してヘテロ接合性である種子から生長したトウモロコシ植物もまた、これらの種子も診断DNA配列を含む限り、本発明の範囲内である。診断DNAを含むそのような植物から得られる細胞、種子およ50

び組織もまた、本発明の範囲内である。

【0054】

トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAを含むトウモロコシ植物およびトウモロコシ植物細胞などは、鱗翅目昆虫の侵入に対する抵抗性を示す。これらの細胞および植物は、殺虫性タンパク質（殺虫物質、有毒物質）Cry2AbをコードするDNAおよびその植物の細胞のゲノムの一部を形成する配列番号：1および配列番号：2のヌクレオチド配列を有するDNAを含む。これらの植物および植物細胞はまた、殺虫性タンパク質（殺虫物質、有毒物質）Cry1A.105をコードするDNAを含む。これらのタンパク質は、それぞれ第1および第2の殺虫性タンパク質と呼ばれ得るか、またはその逆と呼ばれ得る。これらのタンパク質の発現は、これらのトキシンをコードするDNA配列の各々の発現を提供する発現カセット内に含まれる調節成分／遺伝的エレメントによって達成され、また、その発現は、本明細書および図1を凡例として、また、図1および配列番号：5に示されるような配列を参照して、十分に説明される。これらの配列を含むトウモロコシ植物およびトウモロコシ植物細胞は、その対立遺伝子に対してヘテロ接合性またはホモ接合性であるかに關係なく、鱗翅目害虫の侵入からの、これらのコード配列が存在する植物の保護に有効である。
10

【0055】

本発明はまた、本明細書中に記載される配列から生成され得るアンプリコンを提供する。該アンプリコンはトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034のDNA由来のDNAの生物学的サンプル中の存在についての診断である。生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断であるアンプリコンは、配列番号：1または配列番号：2に示されるようなヌクレオチド配列からなる少なくとも1つのポリヌクレオチドセグメントを含む。これらのアンプリコンは、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034由来の少なくとも約0.5フェムトモルまたは約0.5ピコグラムのDNAを含む任意の生物学的サンプルから、本明細書中下記に示されるようなプライマー配列を使用して生成され得る。トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034に対応するDNAのそのような生物学的サンプルの起源は、そのトランスジェニック事象由来の、コーンミール、コーン油、コーンケーキ、トウモロコシ種子、トウモロコシ胚芽、コーンスターーチおよびトウモロコシ粉などであり得る。
20

【0056】

本発明はまた、配列番号：5に示される配列などの連續的なヌクレオチド配列を示す単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。これらの連續的なヌクレオチド配列は：(1)約11～約12000ヌクレオチドおよびその間の任意の長さを含み、そして配列番号：1におけるヌクレオチド1～11位または9～20位に示されるような連續的なヌクレオチドおよび配列番号：2に示されるような1～11または9～20位連續的なヌクレオチドをさらに含み；(2)約11～約2000ヌクレオチドおよびその間の任意の長さの配列番号：3に示されるような任意の連續的なヌクレオチド配列を含み、そして、配列番号：1に示されるようなヌクレオチド1～11位および9～20位に示されるような連續的なヌクレオチド；約11～約914ヌクレオチドおよびその間の長さの配列番号：4に示されるような任意の連續的なヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号：2に示されるようなヌクレオチド1～11位および9～20位に示されるような連續的なヌクレオチドをさらに含む。これらの単離されたポリヌクレオチド分子は、トウモロコシDNAを含む生物学的サンプルから1つ以上のアンプリコンを生成するDNA増幅法において有用である。そのようなアンプリコンの検出は、サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断である。単離されたポリヌクレオチド分子はまた、生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034由来のDNAの存在を検出するための様々なヌクレオチド検出法において有用である。特に、配列番号：1または配列番号：2に示されるような連續的な少なくとも約11ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブは、サンプル中のトランスジェニック事象MON89034 DNAを検出するためのそのような方法においてプローブとして有用である。これらの単離されたポリヌクレオチド
30
40
50

分子の相補的な配列はまた、同じ検出法および／または増幅法において有用である。

【0057】

生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034由来のDNAの存在の検出に使用するためのキットもまた、本発明によって提供される。キットは、プローブポリヌクレオチド分子を使用し、配列番号：5に示されるような配列を含むヌクレオチドセグメントに対して実質的な相同性を示すかまたは実質的な相補性を示す連続的な少なくとも約11～約12000ヌクレオチドを含むプローブ分子は、サンプル中のMON89034 DNAの存在を検出するために有用であり得る。そのプローブ分子は、配列番号：1および配列番号：2に示されるような配列の少なくとも1つを含むべきである。配列番号：1および配列番号：2に示される配列もまた、結合配列、すなわち、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034をもたらす、トウモロコシ植物に挿入されたトランスジェニックDNAいずれかの末端の配列と呼ばれる。これらの配列（それぞれ任意に5'および3'末端と呼ばれる）は、挿入DNA配列の一部および隣接トウモロコシゲノム配列の一部を含む。例えば、配列番号：1は、その5'半分において、挿入DNAの5'末端に隣接するトウモロコシゲノム配列の3'末端を表し、その挿入DNAの5'末端は、配列番号：1に示されるような配列の3'末端半分によって表される。配列番号：2は、その5'半分において、挿入DNAの3'末端を表し、そして、その3'末端半分において、挿入DNAの3'末端に隣接するトウモロコシゲノム配列の5'末端を表している。配列番号：5に示される挿入配列の位置における天然に存在するトウモロコシゲノムにおいて、挿入DNAの5'末端のフランкиング配列および挿入DNAの3'末端のフランкиング配列を連結し、そして、配列番号：3に示される配列（配列番号：3の3'末端の21ヌクレオチド以外）に対して相補的な配列にハイブリダイズする第1のプライマー分子および配列番号：4に示されるような配列（配列番号：4の5'末端の20ヌクレオチド以外）にハイブリダイズする第2プライマー分子が、MON89034において挿入されたDNAが存在しないことについての診断であるMON89034 DNA以外のDNAである鑄型を用いる熱的増幅反応においてアンプリコンを生成し、そして、その同じプライマーは、鑄型としてMON89034 DNAを使用するとき、（配列番号：3および配列番号：4に示されるフランкиング配列におけるプライマーの位置に応じて）12000ヌクレオチドよりわずかに大きいアンプリコンを生成する。他の実施形態もまた提供される。

【0058】

生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034の結合配列である配列番号：1または配列番号：2を検出するためのキットが提供される。そのキットは、配列番号：1もしくは配列番号：2またはその相補体よりなる群から選択される配列であるか、またはそれらに対して完全に相補的であるポリヌクレオチドプローブを備え、また、核酸増幅反応において使用するためのプライマー対を備える。そのプライマー対は、配列番号：3のトウモロコシゲノム部分由来の連続的な少なくとも約15～約50ヌクレオチドからなる第1プライマーおよび配列番号：5の異種挿入DNA部分に対して相補的な連続的な少なくとも約15～約50ヌクレオチドからなる第2プライマーと呼ばれる。ポリヌクレオチドプライマー対の第1のプライマーは、配列番号：3のヌクレオチド約1位から約2050位に示される配列に対応する逆相補配列に特異的にハイブリダイズし、そして、前記ポリヌクレオチドプライマー対の第2のプライマーは、配列番号：5のヌクレオチド約2060位からヌクレオチド約12,208位に示されるような配列に特異的にハイブリダイズし、そして、それらは、互いに向かって伸長して、配列番号：1を含むアンプリコンを形成し、前記アンプリコンは、サンプル中のMON89034事象DNAの存在についての診断である。プライマーの異なる対は、配列番号：4のトウモロコシゲノム部分に対して相補的な連続的な少なくとも約15～約50ヌクレオチドからなる第1プライマーおよび配列番号：5の異種挿入DNA部分の連続的な少なくとも約15～約50ヌクレオチドからなる第2プライマーと呼ばれる。ポリヌクレオチドプライマー対の第1のプライマーは、配列番号：4のヌクレオチド約21位からヌクレオチド約914位に示されるような配列に特異的にハイブリダイズし、そして、ポリヌクレオチドプライマー対の第2のプライマーは、配列番号：5のヌクレオチド約1位から約11,

10

20

30

40

50

305位に示される配列に対応する逆相補配列に特異的にハイブリダイズし、それらは、互いに向かって伸長して、配列番号：2を含むアンプリコンを形成し、前記アンプリコンは、前記サンプル中のMON89034事象DNAの存在についての診断である。

【0059】

これらのプライマー対は、配列番号：1または配列番号：2のいずれかを含むアンプリコンをもたらす際に有用であり、ゆえに、場合によっては、生物学的サンプル中のMON89034 DNAの存在についての診断である。これらのアンプリコンによって、生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034を診断する結合配列の存在の検出が可能になる。

【0060】

トウモロコシDNAを含む生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034 DNAについての診断であるアンプリコンを生成し、検出する方法もまた、提供される。その方法は、核酸増幅反応においてその生物学的サンプルを2つ以上のプライマーとともに接触させる工程、核酸増幅反応を行う工程、次いで、アンプリコンを検出する工程を含む。アンプリコンの存在は、そのアンプリコンが、配列番号：1および配列番号：2に示されるような連続したヌクレオチド約1～11位もしくは9～20位の配列またはこれらの位置に対応する相補的な配列の少なくとも1つを含む限り、サンプル中の前記事象DNAについての診断である。

10

【0061】

生物学的サンプル中のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034の存在についての診断であるヌクレオチド配列もまた、他の方法を使用して検出され得る。例えば、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下において配列番号：1または配列番号：2に示されるようなヌクレオチド配列の1つ以上とハイブリダイズするプローブと、MON89034 DNAを含むと疑われる生物学的サンプルとを接触させる工程、そのサンプルおよびプローブをストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；およびそのヌクレオチド配列へのプローブのハイブリダイゼーションを検出する工程。ハイブリダイゼーションの検出は、サンプル中のMON89034 DNAの存在についての診断である。

20

【0062】

生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断であるアンプリコンを熱的増幅反応において生成する際に使用するためのプライマーポリヌクレオチドもまた、本発明によって提供される。典型的には、そのプライマーは対で提供され、そのプライマー対のメンバーは、便宜上、第1プライマーおよび第2プライマーと呼ばれる。第1プライマーは、配列番号：3に示されるようなトウモロコシゲノム部分由来の連続的な少なくとも約15ヌクレオチドからなり得、そして、第2プライマーは、配列番号：5に示されるような異種挿入DNA部分に対して相補的な連続的な少なくとも約15ヌクレオチドからなり得る。これらの2つのプライマーは、配列番号：1に示されるようなポリヌクレオチド配列を含むトウモロコシ事象MON89034 DNAから得られる鑄型DNAを用いる熱的増幅反応においてアンプリコンを生成し得る。あるいは、第1プライマーは、配列番号：4のトウモロコシゲノム部分由来の連続的な少なくとも約15ヌクレオチドからなり得、そして、第2プライマーは、配列番号：5の異種挿入DNA部分に対して相補的な連続的な少なくとも約15ヌクレオチドからなり得る。これらの2つのプライマーは、配列番号：2に示されるようなポリヌクレオチド配列を含むトウモロコシ事象MON89034 DNAから得られる鑄型DNAを用いる熱的増幅反応においてアンプリコンを生成し得る。

30

【0063】

トウモロコシDNA（例えば、配列番号：1または配列番号：2）を含む生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034の結合配列を検出するための代替方法は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下において結合配列の1つとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブとサンプルとを接触させる工程、そのサンプルおよびプローブをストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；およびその結合配列へのプローブのハイブリダイゼーションを検出する工程からなる。結合配列へのプローブの結合／ハイブリダイゼーションの検出は、生物学的サンプル中のMON89034 DNAの存在を示唆す

40

50

るものである。安定に形質転換されたトウモロコシ植物（そのDNAは、本明細書中に示される方法に供されるとき、配列番号：1または配列番号：2を含むDNAアンプリコンを生成する）は、本発明の範囲内である。例示的なプライマー配列、特に、プライマー配列の対は、本明細書中の実施例において、ならびに配列番号：6および配列番号：7に示されている。

【0064】

生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在を検出する代替方法は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下においてMON89034 DNAとハイブリダイズし、かつ、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下においてMON89034 DNAではないトウモロコシ植物ゲノムDNAとハイブリダイズしないプローブとサンプルとを接触させる工程、そのサンプルおよびプローブをストリンジエントなハイブリダイゼーション条件に供する工程、およびMON89034 DNAへのプローブのハイブリダイゼーションを検出する工程からなり得る。この実施形態と一致するプローブは、配列番号：1および配列番号：2よりなる群から選択される配列であるか、またはその配列に対して相補的である。そのサンプルへのプローブのハイブリダイゼーションの検出は、サンプル中のトウモロコシ事象MON89034ポリヌクレオチドの存在についての診断である。生物学的サンプルは、MON89034 DNAを含む任意のサンプルであり得、それらとしては、トウモロコシ油、コーンミール、コーンフラワー、トウモロコシグルテン、コーンケーキ、コーンスター・チ、コーン浸出液、トウモロコシ組織、トウモロコシ細胞、トウモロコシ穎果、トウモロコシ花粉、トウモロコシ根組織、DDGSが挙げられるがこれらに限定されず、また、そのサンプルがサンプル中のMON89034事象の存在についての診断である少なくとも検出可能な量のポリヌクレオチドを含む限り、そのようなトランスジェニックトウモロコシの発酵の副産物として生成されるエタノールでさえもが挙げられる。ポリヌクレオチドプローブは、デオキシリボ核酸、リボ核酸およびヌクレオチド類似体よりなる群から選択される任意のヌクレオチドであり得、少なくとも1つのフルオロフォア、放射線放出同位体を含む分子または抗体もしくは他の結合型反応によって特異的に検出され得るハプテン型分子で標識され得る。10

【0065】

MON89034トランスジェニック事象DNAの存在についての診断であるDNAを含む種々のトウモロコシは、事象MON89034以外のトウモロコシ植物とともにトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034 DNAを含むトウモロコシ植物を栽培することによって得ることができ、それによって、前記事象についての診断であるDNAを含むハイブリッドトウモロコシ植物が作出される。トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAを含むそのようなハイブリッドトウモロコシ植物は、本発明の範囲内であり、そのハイブリッドから得られる種子（トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAを含む限り）およびハイブリッドトウモロコシ植物MON89034の花粉、胚珠、種子、根または葉もまた、これらが診断DNA配列を含む限り本発明の範囲内であり、そしてそのような実施形態からもたらされる子孫も、本発明の範囲内である。30

【0066】

本発明は、鱗翅目昆虫の侵入からトウモロコシ植物を保護するための方法を提供し、その方法は、標的鱗翅目害虫の食餌中に1つ以上のトランスジェニックトウモロコシ植物細胞を提供する工程を含み、各トウモロコシ植物細胞は、配列番号：1と配列番号：2の両方に示されるような配列および配列番号：1と配列番号：2との間の配列番号：5に示されるような連続的なヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチドをそのゲノム内に含む。そのようなトランスジェニックトウモロコシ植物細胞を常食とする標的鱗翅目昆虫は、トウモロコシ植物細胞から得られるトウモロコシ植物をさらに常食とすることによって阻害される。40

【0067】

トウモロコシ植物の標的鱗翅目害虫に対して毒性である組成物もまた本発明によって提供される。標的鱗翅目害虫の食餌中に提供されるトランスジェニック植物細胞の組成物（ここで、各トランスジェニックトウモロコシ植物細胞は、そのゲノム内に、配列番号：1

50

20

30

40

50

と配列番号：2の両方に示されるような配列に対応するポリヌクレオチドを、配列番号：1と配列番号：2との間に配列番号：5に示されるような連続的なヌクレオチド配列とともに含む)は、トウモロコシ植物または細胞が連続的なヌクレオチド配列内に含まれる発見カセットからCry1A.105および/またはCry2Ab2を発現している限り、トウモロコシ植物またはトウモロコシ植物細胞に対する鱗翅目昆虫の侵入から保護するために有効である。トランスジェニックトウモロコシ種子の形態でのそのような組成物は、受入番号PTA-7455としてAmerican Type Culture Collectionに寄託されている。そのような昆虫抵抗性トウモロコシ植物またはその一部は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を有するDNAをそのような植物の細胞のゲノム内に含む。本明細書中で参照される診断配列を有する昆虫抵抗性トウモロコシ植物の子孫および種子もまた、本発明の範囲内に含まれる。そのような昆虫抵抗性トウモロコシ植物は、トランスジェニックトウモロコシ植物事象MON89034と、異なるトウモロコシ植物とを交配し、そして、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5よりなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を解析することによって昆虫抵抗性子孫を選択する工程を含む方法において作出され得る。

【0068】

昆虫抵抗性トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034は、トウモロコシの他のトランスジェニック品種(例えば、PS149B1および改変Cry3Bbなどのタンパク質をコードする配列の挿入の結果としての、除草剤(例えば、グリホサート、グルホシネットおよびジアカンバ(diacamba)など)に対して抵抗性のトウモロコシまたは根喰い(root devouring)昆虫に対して抵抗性のトウモロコシ)またはVIP3A、Cry1AbおよびCry1Faなどの他のトキシンタンパク質をコードする配列の挿入の結果としての鱗翅目昆虫の侵入に対して抵抗性のトランスジェニックトウモロコシの他の品種と組み合わせられ得る。これらの異なるトランスジェニック事象のすべての様々な組み合わせが、本発明のトウモロコシ植物、すなわち、MON89034事象とともに栽培されることにより、鞘翅目および鱗翅目の侵入に対して抵抗性であり、かつ、選択的な除草剤に対して抵抗性であるハイブリッドトランスジェニックトウモロコシの改良品種が提供される。そのような品種は、非トランスジェニック品種および個別の特徴的なトランスジェニック品種と比べて、収量および乾燥耐性特性の改善を示す。

【0069】

昆虫侵入に対して抵抗性であるトウモロコシ植物を作出する方法が提供され、ここで、そのトウモロコシ植物は、配列番号：5に示されるような殺虫的に有効な量のトキシンコード配列を含む。その方法は、トキシンコード配列をトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034から抽出する工程およびこれらのコード配列を単独でまたは一緒に、1つ以上のトウモロコシ細胞に導入することにより、これらの1つ以上のトキシンコード配列を含むトランスジェニックトウモロコシ細胞を作製する工程を含む。次いで、そのトランスジェニックトウモロコシ細胞を、1つ以上のコード配列を含むトランスジェニックトウモロコシ植物に生長(再生)させ、次いで、そのトランスジェニック植物は、昆虫侵入に対して抵抗性を示す。

【0070】

生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断であるDNAに関して、そのようなMON89034 DNAを含むトランスジェニックトウモロコシ植物のDNAの接合状態を判定するための方法が、本発明によって提供される。その方法は、第1の工程として、配列番号：6、配列番号：7および配列番号：10を含む3つの異なるプライマーをサンプルと接触させる工程からなる。該工程では、トウモロコシ事象MON89034 DNAを含む核酸增幅反応中に共に使用されるとき、トウモロコシ事象MON89034についての診断である第1のアンプリコンを生成し、MON89034 DNA以外のトウモロコシゲノムDNAを含む核酸增幅反応において使用されるとき、MON89034 DNA以外のトウモロコシゲノムDNAについての診断である第2のアンプリコンを生成する。その後の工程は、核酸增幅反応を行う工

10

20

30

40

50

程および熱的増幅反応中に生成されるアンプリコンを比較する工程からなる。両方のアンプリコンの存在を検出する工程は、サンプルの接合状態の診断である。第1のアンプリコンのみの検出は、そのサンプルがMON89034 DNAのみを含んでいること、すなわち、ホモ接合性サンプルであることを示唆するものである。第2のアンプリコンのみの検出は、そのサンプルがMON89034 DNAを含んでいないことを示唆するものである。サンプル中の第1と第2の両方のアンプリコンを共に検出することは、(1)サンプルが、ヘテロ接合性出発物質のみを含む純粋なサンプルに関してヘテロ接合性DNAを含むこと、または(2)サンプルがホモ接合性とヘテロ接合性の両方の出発サンプルDNAを含むこと、または(3)サンプルが、ホモ接合性、ヘテロ接合性および/またはMON89034 DNA以外のサンプルのいくつかの組み合わせを含むこと、を示唆するものである。

10

【0071】

本発明はまた、トウモロコシ植物の細胞のゲノムに挿入されたトランスジェニックDNAセグメントについての診断であるDNAを含む生長トウモロコシ植物を提供する。そのトウモロコシ細胞のゲノム中のDNAは：

- (a) 配列番号：5に示されるようなヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号：1および配列番号：2に示されるようなヌクレオチド配列の両方；
- (c) 配列番号：3に示されるようなヌクレオチド配列；および
- (d) 配列番号：4に示されるようなヌクレオチド配列

よりなる群から選択される配列のうちのいずれか1つまたはすべてを含む。

【0072】

20

以下の実施例は、本発明のある特定の好ましい実施形態の例を実証するために含められる。以下の実施例において開示される手法は、本発明者らが本発明の実施において十分に機能すると見出しているアプローチを代表するものであり、ゆえに、その実施にとって好ましい様式の例を構成すると考えられ得ることを、当業者は認識するべきである。しかしながら、当業者は、本開示に鑑みて、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の実施形態において多くの変更がなされ得、そして、なおも同様のまたは類似の結果を得ることができることを認識するべきである。

【実施例】

【0073】

30

【実施例1】

この実施例では、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034の構築および分子の特徴づけを説明する。

【0074】

40

プラスミド構築物pMON38850（その発現力セットを図1に示す）を用いた近交系トウモロコシ系統のAgrobacterium媒介性形質転換プロセスによって、トウモロコシ植物MON89034を作製した。使用される形質転換方法は、米国特許第6,603,061号に記載されている方法と同様のものである。プラスミド構築物pMON38850は、トウモロコシ植物細胞におけるCry1A.105殺虫性タンパク質の発現に必要な調節遺伝的エレメントと連結された植物発現力セットを含む。トウモロコシ細胞は、少なくとも約23,000個の異なるトランスジェニック事象からなる無傷のトウモロコシ植物に再生した。個別のトランスジェニック事象（植物）を、植物発現力セットの完全性およびLepidopteran昆虫幼虫食害に対する抵抗性を示した事象の集団から選択した。そのゲノム内に、pMON38850の連結した植物発現力セットを含むトウモロコシ植物は、本発明の一態様である。これらのトランスジェニック事象の実質的な解析の後、その分子の特徴付けおよび任意の望ましくない表現型の効果または農学的な欠陥の効果が存在しないことに基づいて、MON89034トランスジェニック事象を選択した。

【0075】

図1に図示されるようなMON89034トウモロコシゲノム内に含まれる導入遺伝子の遺伝的エレメントの配列は、各々が互いに作動可能に連結された以下のエレメントからなる。まず、その配列の任意に定義された5'末端（すなわち、図1に示される中央のセグメントの

50

左の部分付近)に、*Agrobacterium tumefaciens*由来の右ボーター領域(RB)の一部を標識する。これの後に、以下の順序で、増強されたCaMV35Sプロモーターエレメント(本明細書中でP-CaMV35Senと呼ばれ、配列番号:5における2350位~2651位に位置する);コムギクロロフィルA/B結合タンパク質非翻訳リーダー配列(本明細書中でL-Ta.lhcb1と呼ばれ、配列番号:5における2678~2738位に位置する);イネアクチンイントロン配列(本明細書中でI-Os.Act1と呼ばれ、配列番号:5における2755~3234位に位置する);キメラ遺伝子Cry1A.105をコードする天然に存在しない配列(配列番号:5における3244~6777位に位置する);およびコムギ由来の3'終結領域(本明細書中でT-Ta.Hsp17-1:1:1と呼ばれ、配列番号:5における6809~7018位に位置する)からなる発現力セットが続く。ボーダー配列以外の上で言及したエレメントの組み合わせは、トウモロコシ植物において一緒に機能することにより、Cry1A.105殺虫性タンパク質の発現をもたらす。次いで、これらのエレメントは、以下の順序で、以下のエレメント:ゴマノハグサ(Figwort)モザイクプロモーター(配列番号:5における7086~7649位に位置する)、Zea mays Hsp70リーダー(本明細書中でHSP70またはI-Hsp70と呼ばれ、配列番号:5における7672~8475位に位置する)およびZea mays葉緑体移行ペプチドコード配列(本明細書中でCTP2またはTS-SSU-CTPと呼ばれ、配列番号:5における8492~8892位に位置する)からなる別の発現力セットと連結される。次いで、これらの作動可能に連結されたセグメントを、殺虫性のタンパク質Cry2Abをコードするヌクレオチド配列(配列番号:5における8893~10800位に位置する)に連結し、その配列は、その3'末端において、*Agrobacterium tumefaciens*のノパリンシンターゼ遺伝子の3'非翻訳領域(本明細書中でT-AGRtu.nos-1:1:13と呼ばれ、配列番号:5における10827~11377位に位置する)に連結されている。Cry2Abコード配列に隣接しているこれらのエレメントは、トウモロコシ植物に存在するとき、一緒に機能することによってCry2Abの発現をもたらす。次いで、Cry2Ab発現力セットの後に、*Agrobacterium tumefaciens*由来の左ボーダー(LB)領域の十分な部分からなるヌクレオチド配列が続く。

【0076】

DNA增幅法におけるプライマーとして有用なDNA分子を、MON89034事象内に含まれる導入遺伝子挿入物の遺伝的エレメントの配列から得ることができる。これらのプライマー分子は、導入遺伝子挿入物に隣接する事象のゲノムから得られるDNAプライマー分子も含むプライマーセットの一部として使用され得る。

【0077】

左および右ボーターセグメントならびにボーターセグメント間ににおいて2つの連結された植物発現力セット(第1の発現力セットはCry1A.105をコードし、第2の発現力セットはCry2Abをコードし、ここで、各力セットは、第1または第2のカセットと命名されるかに関係なく、交換可能であり得る)からなるトランスジェニックトウモロコシ植物事象MON89034を生じる、トウモロコシゲノムに挿入されるpMON38850プラスミドDNAの一部を、詳細な分子解析によって特徴付けた。これらの解析を行うことにより、上記ボーターおよびそのボーター間における所望の2つの発現力セットからなる1つだけの、かつ、無傷の挿入セグメントを含む事象(トウモロコシゲノム内の組み込み部位の数)、コピー数(1遺伝子座内の形質転換DNA(T-DNA)のコピー数)および挿入遺伝子カセットの完全性(すなわち、プラスミドpMON38850中に存在すると知られている配列からの任意の再編成または配列バリエーションが存在しないこと)が同定された。無傷のCry1A.105コード領域ならびに植物発現力セットの各々の調節エレメント、プロモーター、イントロンおよびポリアデニル化配列ならびにプラスミドpMON38850骨格DNA領域を含むDNA分子プローブを使用した。すべての事象の解析から得られたデータから、MON89034が、1コピーのCry1A.105発現力セットとともに、単一のT-DNA挿入を含むことが証明された。無傷の遺伝子カセットに連結されているか、または連結されていない、形質転換ベクターpMON38850由来のさらなるエレメントは、MON89034ゲノムにおいて検出されなかった。最後に、PCRおよびDNA配列解析を行うことによって、5'および3'挿入部と植物ゲノムとの結合を決定し、その挿入物内のエレメントの組成を確認し(例えば、図1を参照のこと)、そして、トランスジ

エニックトウモロコシ事象MON89034をもたらす、トウモロコシ植物ゲノムに挿入されたDNAの完全な配列を決定した。その完全な挿入配列は、挿入されたDNAのいずれかの末端におけるトウモロコシゲノムフランкиング配列の一部とともに、配列番号：5に示されるような配列に示されている。

【0078】

最初に、Harbil 5G-HDペイントシェーカ (Habil Inc, Cincinnati, Ohio)において種子（最大200個の種子）を微粉に処理することによって、MON89034由来のゲノムDNAおよびMON89034以外のトウモロコシ由来の非トランスジェニックDNA（コントロールDNA）をトウモロコシ種子から抽出した。簡潔には、その粉末になった種子を抽出緩衝液 (EM Science Cat. No.3700, EM Science, Gibbstown, New Jersey, USA) 中で抽出し、そしてDNAを、イソプロパノール (Sigma Cat. No.I-0398, Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて溶液から沈殿させた。70パーセントエタノールが入っている微量遠心管内に、沈殿したDNAを巻き取って入れた。そのDNAを微量遠心機において最大速度（約14,000rpm）で約5分間沈殿させ、真空乾燥させ、そして再度TE緩衝液 (pH8.0) 中に溶解させた。次いで、そのDNAを4℃冷蔵庫内で保存した。この方法は、単一のトウモロコシ種子からDNAを抽出するため当業者によって改変され得る。

【0079】

サンプル中の事象MON89034を同定するために使用される例示的な方法は、事象特異的エンドポイントTAQMAN（登録商標）PCRにおいて説明され、このPCRについての条件の例は、表1および表2に記載される。このアッセイにおいて使用されるDNAプライマーは、プライマーSQ2842（配列番号：6）、SQ2843（配列番号：7）、6FAM（商標）標識プライマーPB880（配列番号：14）およびVIC（商標）標識プライマーPB2931（配列番号：15）であり、6FAMおよびVICは、DNAプライマーに結合したApplied Biosystems (Foster City, CA) 製の蛍光 (fluorescent) 色素製品である。TAQMAN（登録商標）MGBプローブについては、TaqDNAポリメラーゼの5' - エキソヌクレアーゼ活性により、そのプローブがフルオロフォアとクエンチャーとの間ににおいて5'末端から切断される。クエンチャーおよびフルオロフォアが、標的DNA鎖にハイブリダイズするとき、それらは、3次元空間において十分に離れ、それにより、蛍光（フルオロフォア励起波長）シグナルがもたらされる。

【0080】

SQ2842（配列番号：6）およびSQ2843（配列番号：7）は、PB880（配列番号：14）を用いるこれらの反応方法において使用されるとき、事象MON89034 DNAについての診断であるDNAアンプリコンを生成する。この解析に対するコントロールは、事象MON89034 DNAを含むトウモロコシ由来のポジティブコントロール、非トランスジェニックトウモロコシまたは事象MON89034以外のトランスジェニックトウモロコシ由来のネガティブコントロールおよび鑄型DNAを含まないネガティブコントロールを含むべきである。

【0081】

SQ1564（配列番号：17）およびSQ1565（配列番号：18）は、PB351（配列番号：21）を用いるこれらの反応方法において使用されるとき、MON89034中のCry1A.105の診断であるアンプリコンを生成する。

【0082】

これらのアッセイは、Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700またはStratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700またはEppendorf Mastercycler Gradient サーモサイクラを用いて使用するため最適化される。事象MON89034 DNAを同定するアンプリコンを生成する当業者に公知の他の方法および装置は、当該分野の技術範囲内である。

【0083】

生物学的サンプル中で配列番号：1またはその完全に相補的な配列と特異的に結合し、そして、配列番号：1に示されるような連続的な少なくとも11ヌクレオチドを含む任意のプローブ、または、その結合が検出され得る限り、場合によっては配列番号：1における配列の逆相補を含む任意のプローブは、そのサンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNA

10

20

30

40

50

の存在についての診断である。生物学的サンプル中の配列番号：2またはその完全な相補的な配列と特異的に結合し、そして、配列番号：2に示されるような連続的な少なくとも11ヌクレオチドを含む任意のプローブ、または、その結合が検出され得る限り、場合によつては配列番号：2における配列の逆相補を含む任意のプローブは、そのサンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断である。

【0084】

トウモロコシDNAを含む生物学的サンプルからアンプリコンを生成する際に、使用されるか、または使用するために設計されるプライマーのいずれかの対（そのアンプリコンは、配列番号：1もしくは配列番号：2を含むか、または場合によつては、両方の配列を含む）は、本発明の範囲内であると考えられる。配列番号：1もしくは配列番号：2またはその両方を含むそのような任意のアンプリコンは、本明細書中で開示される本発明の目的で、そのような生物学的サンプル中のトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断であると考えられる。以下の実施例は、当業者に対する参考として提供される。10

【0085】

【表1】

表1. トウモロコシMON89034事象特異的エンドポイントTAQMAN (登録商標) PC R

工程	試薬	量	コメント
1	無ヌクレアーゼ水	最終容積が10 μ l となるように加える	-
2	2×ユニバーサルマスターMix (Applied Biosystems cat. #4304437)	5 μ l	1×最終濃度
3	プライマーSQ2842 (配列番号 : 6) およびSQ2843 (配列番号 : 7) を無ヌクレアーゼ水に、各々20 μ M濃度に再懸濁)	0.5 μ l	1.0 μ M最終濃度
4	PB880配列番号 : 1_4プライマー-6FAM (商標) (10 μ M濃度に無ヌクレアーゼ水に再懸濁)	0.2 μ l	0.2 μ M最終濃度
5	内部コントロールプライマー-SQ2842および内部コントロールプライマー-SQ2843	0.2 μ l	0.2 μ M最終濃度
6	抽出DNA (鑄型) : <ul style="list-style-type: none"> ・解析サンプル (個別の葉) ・ネガティブコントロール ・ネガティブコントロール ・ポジティブコントロール ・ポジティブコントロール 	3.0 μ l <ul style="list-style-type: none"> ・4~80 ngのゲノムDNA ・4ngの非トランスジェニックトウモロコシゲノムDNA ・DNA鑄型なし (DNAを再懸濁した溶液) ・既知の事象MON89034ヘテロ接合性トウモロコシ由来の4 ngのゲノムDNA ・既知の事象MON89034ホモ接合性トウモロコシ由来の4 ngのゲノムDNA 	水に希釈
7	ゆっくり混合し、各反応物の上に1~2滴の鉛油を加える		

【0086】

DNA增幅は、温度工程およびサイクルの手動操作または電子制御式操作をはじめとしたサーモサイクリングについての任意の手段を使用して設定および実施され得る。Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700またはEppendorf Mastercycler Gradient

サーモサイクラまたはApplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700またはMJ Research DNA Engine PTC-225サーマルサイクラを使用することにより、以下のサイクリングパラメータを首尾よく実施した。Eppendorf Mastercycler GradientまたはMJ EngineにおいてPCRを行うとき、サーモサイクラは、計算モード(calculated mode)において実施した。Perkin-Elmer 9700を使用するとき、サイクル条件は、最大のランプ速度設定(ramp speed set)で実施した。

【0087】

【表2】

表2. 接合状態アッセイのサーモサイクラ条件

サイクル数	設定: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
1	50°C 2分
1	95°C 10分
10	95°C 15秒 64°C 1分 (-1°C/サイクル)
30	95°C 15秒 54°C 1分
1	10°C 浸漬

10

【0088】

【実施例2】

この実施例では、ゲノム内のトランスジェニックトウモロコシ事象MON89034についての診断であるDNAを含むトウモロコシ植物の同定およびそのようなトウモロコシ植物の接合状態の判定を説明する。

【0089】

ゲノム内に事象MON89034 DNAを含むホモ接合性子孫からヘテロ接合性子孫を同定するために使用される方法を、接合状態アッセイにおいて説明し、そのアッセイについての条件は、表3および表4に例示される。接合状態アッセイに使用される例示的なDNAプライマーは、プライマーSQ2842(配列番号: 6)、SQ2843(配列番号: 7)、SQ6523(配列番号: 10)、SQ6524(配列番号: 11)、6FAM(商標)標識プライマーPB880(配列番号: 14)およびVIC(商標)標識プライマーPB2931(配列番号: 15)である。上に示したように、6FAMおよびVICは、DNAプライマーに結合したApplied Biosystems(Foster City, CA)製の蛍光色素製品である。

20

【0090】

SQ2842(配列番号: 6)、SQ2843(配列番号: 7)、SQ6523(配列番号: 10)、SQ6524(配列番号: 11)は、熱的增幅反応(鑄型DNAを含む生物学的サンプルがサンプル中のトウモロコシ事象MON89034の存在についての診断であるDNAを含む)において一緒に使用されるとき、トウモロコシ事象MON89034 DNA以外のトウモロコシDNAについての診断であるDNAアンプリコンを生成する(そのトウモロコシDNAが、非トランスジェニック由来であるか、または他の何らかのトランスジェニックサンプル由来であるかとは無関係である)。あるいは、その反応によって、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034内に存在する挿入されたDNAに対応する対立遺伝子に対してヘテロ接合性であるトウモロコシゲノム由来のDNAを含む生物学的サンプルから2つの異なるDNAアンプリコンが生成される。これらの2つの異なるアンプリコンは、野生型トウモロコシゲノム遺伝子座に由来する第1のアンプリコンおよびトウモロコシ事象MON89034 DNAの存在についての診断である第2のアンプリコンに相当する。ヘテロ接合性ゲノムについて記載した第2のアンプリコンに相当する単一のアンプリコンのみを生じるトウモロコシDNAのサンプルは、サンプル中のトウモロコシ事象MON89034の存在についての診断であり、かつ、鑄型として使用されたトウモロコシDNAが、トランスジェニックトウモロコシ事象MON89034挿入DNAに相当する対立

30

40

50

遺伝子に対してホモ接合性であるトウモロコシ種子に起因することを判定するための診断である。この解析についてのコントロールは、事象MON89034 DNAを含むホモ接合性およびヘテロ接合性のトウモロコシからのポジティブコントロール、非トランスジェニックトウモロコシまたは他の任意のトウモロコシのトランスジェニック品種からのネガティブコントロールならびに鑄型DNAを含まないネガティブコントロールを含むべきである。このアッセイは、Stratagene Robocycler、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700またはEppendorf Mastercycler Gradientサーモサイクラを用いて使用するために最適化される。MON89034植物を用いて作製された雑種の子孫の接合状態を同定するアンプリコンを生成する当業者に公知の他の方法および装置は、当該分野の技術範囲内である。

【 0 0 9 1 】

10

【表3】

表3. 接合状態アッセイ反応溶液

工程	試薬	量	コメント
1	無ヌクレアーゼ水	最終容積が5 μlとなるように加える	-
2	2×ユニバーサルマスター ミックス (Applied Biosystems cat.# 4304437)	2.5 μl	1×最終濃度
3	プライマー配列番号：6 および 配列番号：7 (20 μM濃度に無ヌクレアーゼ水に再懸濁)	0.05 μl	0.25 μM最終濃度
4	PB880配列番号：1 4プライマー-6FAM (商標) (10 μM濃度に無ヌクレアーゼ水に再懸濁)	0.01 μl	0.4 μM最終濃度
5	PB2931配列番号：1 5プライマー-VIC (商標) (10 μM濃度に無ヌクレアーゼ水に再懸濁)	0.01 μl	0.15 μM最終濃度
6	REDTaqDNAポリメラーゼ (1単位/μl)	1.0 μl (次の工程の前にピベットの取り替えが推奨)	1単位/反応
7	抽出DNA (鋳型)： ・解析サンプル (個別の葉) ・ネガティブコントロール ・ネガティブコントロール ・ポジティブコントロール ・ポジティブコントロール	2.0 μl ・4~80 ngのゲノムDNA ・4 ngの非トランスジェニックトウモロコシゲノムDNA ・DNA鋳型なし (DNAを再懸濁した溶液) ・既知の事象MON89034ヘテロ接合性トウモロコシ由来の4 ngのゲノムDNA ・既知の事象MON89034ホモ接合性トウモロコシ由来の4ngのゲノムDNA	水に希釈
8	ゆっくり混合し、各反応物の上に1~2滴の鉛油を加える		

【0092】

Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700またはEppendorf Mastercycler Gradient サーモサイクラまたはApplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700またはMJ Research DNA Engine PTC-225サーマルサイクラにおけるDNA增幅 (amplification) を使用することにより、以下のサイクルパラメータを首尾よく実施した。Eppendorf Master

cycler GradientまたはMJ Engineを使用するとき、サイクルは、計算モードにおいて実施した。Perkin-Elmer 9700を使用するとき、サイクルは、最大のランプ速度設定で実施した。

【0093】

【表4】

表4. 接合状態アッセイのサーモサイクラ条件^a

連続した順序におけるサイクル数	温度および持続時間	
1	50°C 2分	10
1	95°C 10分	
10	95°C 15秒 64°C 1分 (-1°C/サイクル)	
30	95°C 15秒 54°C 1分	
1	10°C浸漬	

^aApplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700を使用

【0094】

20

トランスジェニック事象MON89034に対応する種子は、2006年3月28日にブダペスト条約の下で、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110に寄託された。ATCC受入番号または特許寄託名称 (patent deposit designation) は、PTA-7455である。この寄託は、30年間もしくは最後の請求の後5年間または特許の有効期間のいずれかの長い方の期間にわたって維持され、その期間中、必要に応じて交換される。

【0095】

本発明の本質を例示し、説明してきたが、そのような本質から逸脱することなく、本発明の組み合わせ方および詳細が変更され得ることが当業者には明らかであるはずである。本発明者らは、添付の特許請求の範囲の精神および範囲内であるすべての改変を特許請求する。

30

【0096】

本明細書中で引用したすべての刊行物および公開された特許文献は、各々の刊行物または特許出願が、明示的かつ個別に参考として援用されると示されているかのように同程度に本明細書中で参考として援用される。

【図1】

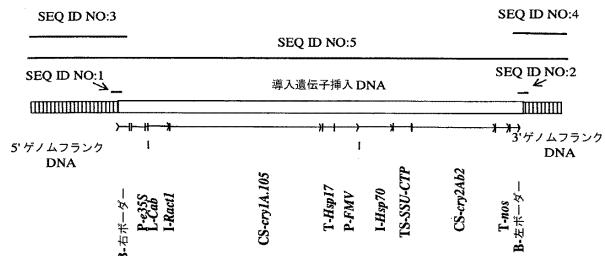


Figure 1

【配列表】

0005513883000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 Q 1/68 (2006.01) C 12 Q 1/68 A

- (72)発明者 ジェニファー・ダグラス
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番
- (72)発明者 ジーナ・グロート
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番
- (72)発明者 スコット・ジョンソン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番
- (72)発明者 レベッカ・ケリー
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番
- (72)発明者 ジョン・コーテ
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番
- (72)発明者 ジェイムズ・ライス
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 國際公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 6 3 6 (WO , A 1)
米国特許第 0 6 4 8 9 5 4 2 (U S , B 1)
特表 2 0 0 9 - 5 0 5 6 7 9 (J P , A)
Entomol. Experiment. Appl. , 2 0 0 5 年 , Vol.116 , p.31-41
Appl. Environ. Microbiol. , 1 9 9 7 年 , Vol.63 , No.12 , p.4883-4890
DEFINITION *Arabidopsis thaliana* T-DNA flanking sequence GK-434F06-018189, genomic survey sequence. , [online] , 2 0 0 4 年 , ACCESSION BX290235 , Retrieved on 2012.04.11, Retrieved from the Internet , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/28889231?report=genbank>
DEFINITION *Arabidopsis thaliana* T-DNA flanking sequence GK-669B10-022987, genomic survey sequence. , [online] , 2 0 0 4 年 , ACCESSION BX660949 , Retrieved on 2012.04.11, Retrieved from the Internet , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/37617337?report=genbank>
DEFINITION *Arabidopsis thaliana* T-DNA flanking sequence GK-669B10-023058, genomic survey sequence. , [online] , 2 0 0 4 年 , ACCESSION BX660950 , Retrieved on 2012.04.11, Retrieved from the Internet , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/37617338?report=genbank>
DEFINITION *Arabidopsis thaliana* T-DNA flanking sequence GK-663D09-023926, genomic survey sequence. , [online] , 2 0 0 4 年 , ACCESSION BX894239 , Retrieved on 2012.04.11, Retrieved from the Internet , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/39926734?report=genbank>
DEFINITION *Arabidopsis thaliana* T-DNA flanking sequence GK-196A02-014717, genomic survey sequence. , [online] , 2 0 0 4 年 , ACCESSION AL760295 , Retrieved on 2012.04.11, Retrieved from the Internet , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/21498643?report=genbank>

genbank

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12N 15/00 - 15/90
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
JSTPplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
PubMed
Science Direct