

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成22年5月6日(2010.5.6)

【公表番号】特表2006-525028(P2006-525028A)
 【公表日】平成18年11月9日(2006.11.9)
 【年通号数】公開・登録公報2006-044
 【出願番号】特願2006-514201(P2006-514201)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

A 0 1 H 5/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年2月8日(2010.2.8)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離DNA分子であって、配列番号21として同定されたヌクレオチド配列を含む、単離DNA分子。

【請求項2】

単離DNA分子であって、配列番号22として同定されたヌクレオチド配列を含む、単離DNA分子。

【請求項3】

単離DNA分子であって、配列番号24として同定されたヌクレオチド配列を含む、単離DNA分子。

【請求項4】

単離DNA分子であって、配列番号26として同定されたヌクレオチド配列を含む、単離DNA分子。

【請求項5】

単離DNA分子であって、配列番号27として同定されたヌクレオチド配列を含む、単離DNA分子。

【請求項6】

TC1507特異的領域を検出する生物学的サンプル内のイベントTC1507を同定するためのキットであって、該キットは、少なくとも第1のプライマーを備え、該第1のプライマーが配列番号21内の配列または配列番号22内の配列を認識する、キット。

【請求項7】

配列番号25内の配列を認識する少なくとも第2のプライマーを、さらに備える、請求項6に記載のキット。

【請求項8】

配列番号22内の配列を認識する少なくとも第2のプライマーを、さらに含む、請求項6に記載のキット。

【請求項 9】

前記第 1 のプライマーが配列番号 2 1 内の配列を認識する、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 10】

前記第 1 のプライマーが配列番号 2 2 内の配列を認識する、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 11】

前記少なくとも第 1 および第 2 のプライマーがそれぞれ配列番号 1 の配列および配列番号 2 の配列を含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 12】

前記少なくとも第 1 および第 2 のプライマーがそれぞれ配列番号 2 の配列および配列番号 2 3 の配列を含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 13】

前記少なくとも第 1 および第 2 のプライマーがそれぞれ配列番号 3 の配列および配列番号 5 の配列を含む、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 14】

前記少なくとも第 1 および第 2 のプライマーがそれぞれ配列番号 4 の配列および配列番号 5 の配列を含む、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 15】

トウモロコシのイベント T C 1 5 0 7 およびその子孫のジャンクション D N A に対して特異的な D N A 検出キットであって、配列番号 2 6 に対して相同的または相補的である D N A 検出法で機能するのに十分な長さの隣接 D N A ポリヌクレオチドの少なくとも 1 つの D N A 分子を備える、D N A 検出キット。

【請求項 16】

トウモロコシのイベント T C 1 5 0 7 およびその子孫のジャンクション D N A に対して特異的な D N A 検出キットであって、配列番号 2 7 に対して相同的または相補的である D N A 検出法で機能するのに十分な長さの隣接 D N A ポリヌクレオチドの少なくとも 1 つの D N A 分子を備える、D N A 検出キット。

【請求項 17】

生物学的サンプル内のイベント T C 1 5 0 7 を同定するためのキットであって、それと隣接する配列番号 2 1 および配列 2 5 とハイブリダイズする配列を含む特異的プローブを備える、キット。

【請求項 18】

生物学的サンプル内のイベント T C 1 5 0 7 を同定するためのキットであって、それと隣接する配列番号 2 2 および配列 2 5 とハイブリダイズする配列を含む特異的プローブを備える、キット。

【請求項 19】

D N A 検出キットであって、該キットは、以下：トウモロコシのイベント T C 1 5 0 7 およびその子孫に対して特異的な D N A プライマーまたはプローブとして機能する配列番号 2 6 または配列番号 2 7 に対して相同または相補的な十分な長さの隣接ヌクレオチドの少なくとも 1 つの D N A 分子を備える、D N A 検出キット。

【請求項 20】

D N A 構築物であって、該 D N A 構築物は、以下：第 1 の発現カセットおよび第 2 の発現カセットを含み、作用可能な連結で該第 1 の発現カセットが、

- (a) トウモロコシユビキチンプロモーター；
- (b) トウモロコシユビキチン遺伝子の 5 ' 非翻訳エキソンと；
- (c) トウモロコシユビキチンイントロン；
- (d) C r y 1 F コード D N A 分子；および
- (e) 3 ' O R F 2 5 転写終結因子を含み、作用可能な連結で該第 2 の発現カセットが

- (i) C a M V 3 5 S プロモーター；
- (i i) p a t コード D N A 分子；および

(i i i) (C a M V) 3 5 S 由来の 3 ' 転写終結因子を含む、D N A 構築物。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の D N A 構築物を含む、植物。

【請求項 2 2】

前記植物がトウモロコシ植物である、請求項 2 1 の植物。

【請求項 2 3】

生物学的サンプル中のイベント T C 1 5 0 7 を同定するための方法であって、該方法は、配列番号 2 1 および配列番号 2 2 内の配列を特異的に認識するプローブまたは第 1 のプライマーを用いて T C 1 5 0 7 特異的領域を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 2 4】

少なくとも 2 種類のプライマーを用いたポリメラーゼ鎖反応を使用して前記生物学的サンプル中に存在する核酸から D N A フラグメントを増幅する工程をさらに包含し、前記第 1 のプライマーが配列番号 2 1 または配列番号 2 2 内の配列を認識し、そして第 2 のプライマーが配列番号 2 2 または配列番号 2 5 内の配列を認識する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 1 のプライマーが配列番号 2 1 内の配列を認識し、前記第 2 のプライマーが配列番号 2 5 内の配列を認識する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記第 1 のプライマーが配列番号 2 2 内の配列を認識し、前記第 2 のプライマーが配列番号 2 2 内の配列を認識する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 のプライマーおよび前記第 2 のプライマーがそれぞれ、配列番号 2 の配列および配列番号 1 の配列を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第 1 のプライマーおよび前記第 2 のプライマーがそれぞれ、配列番号 2 の配列および配列番号 2 3 の配列を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第 1 のプライマーおよび前記第 2 のプライマーがそれぞれ、配列番号 3 の配列および配列番号 5 の配列を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記第 1 のプライマーおよび前記第 2 のプライマーがそれぞれ、配列番号 4 の配列および配列番号 5 の配列を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】

T C 1 5 0 7 P C R 同定プロトコルを用いて、約 9 1 2 b p のフラグメントを増幅する工程を包含する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

T C 1 5 0 7 P C R 同定プロトコルを用いて、約 8 4 4 b p のフラグメントを増幅する工程を包含する、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

T C 1 5 0 7 P C R 同定プロトコルを用いて、約 3 4 2 b p のフラグメントを増幅する工程を包含する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

T C 1 5 0 7 P C R 同定プロトコルを用いて、約 2 5 2 b p のフラグメントを増幅する工程を包含する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

生物学的サンプル中のトウモロコシのイベント T C 1 5 0 7 またはその子孫の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 該生物学的サンプルから D N A サンプルを抽出する工程；
- (b) D N A プライマー分子である配列番号 1 および配列番号 2 を提供する工程；
- (c) D N A 増幅反応条件を提供する工程；

(d) 該DNA増幅反応を実行して、それによってDNA単位複製配列分子を生成する工程；および

(e) 該DNA単位複製配列分子を検出する工程であって、ここで、該DNA増幅反応での該DNA単位複製配列分子の検出がトウモロコシのイベントTC1507の存在を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項36】

生物学的サンプル中のトウモロコシのイベントTC1507またはその子孫の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該生物学的サンプルからDNAサンプルを抽出する工程；

(b) DNAプライマー分子である配列番号2および配列番号23を提供する工程；

(c) DNA増幅反応条件を提供する工程；

(d) 該DNA増幅反応を実行して、それによってDNA単位複製配列分子を生成する工程；および

(e) 該DNA単位複製配列分子を検出する工程であって、ここで、該DNA増幅反応での該DNA単位複製配列分子の検出がトウモロコシのイベントTC1507の存在を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項37】

生物学的サンプル中のトウモロコシのイベントTC1507またはその子孫の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該生物学的サンプルからDNAサンプルを抽出する工程；

(b) DNAプライマー分子である配列番号3および配列番号5を提供する工程；

(c) DNA増幅反応条件を提供する工程；

(d) 該DNA増幅反応を実行して、それによってDNA単位複製配列分子を生成する工程；および

(e) 該DNA単位複製配列分子を検出する工程であって、ここで、該DNA増幅反応での該DNA単位複製配列分子の検出がトウモロコシのイベントTC1507の存在を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項38】

生物学的サンプル中のトウモロコシのイベントTC1507またはその子孫の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該生物学的サンプルからDNAサンプルを抽出する工程；

(b) DNAプライマー分子である配列番号4および配列番号5を提供する工程；

(c) DNA増幅反応条件を提供する工程；

(d) 該DNA増幅反応を実行して、それによってDNA単位複製配列分子を生成する工程；および

(e) 該DNA単位複製配列分子を検出する工程であって、ここで、該DNA増幅反応での該DNA単位複製配列分子の検出がトウモロコシのイベントTC1507の存在を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項39】

請求項35に記載の方法によって生産された単位複製配列を含む、単離DNA。

【請求項40】

請求項36に記載の方法によって生産された単位複製配列を含む、単離DNA分子。

【請求項41】

請求項37に記載の方法によって生産された単位複製配列を含む、単離DNA分子。

【請求項42】

請求項38に記載の方法によって生産された単位複製配列を含む、単離DNA分子。

【請求項 43】

サンプル中のTC1507イベントに対応するDNAの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

a. トウモロコシDNAを含むサンプルと、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でトウモロコシのイベントTC1507に由来するDNAとハイブリダイズし、該ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でTC1507でないトウモロコシ植物DNAとハイブリダイズしないポリヌクレオチドプローブとを接触させる工程；

b. 該サンプルおよびプローブをストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；ならびに

c. 該DNAに対する該プローブのハイブリダイゼーションを検出する工程であって、ここで、ハイブリダイゼーションの検出が該TC1507イベントの存在を示す、工程、を包含する、方法。

【請求項 44】

配列番号1、2、3、4、5、23、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56および57からなる群よりなる群より選択される配列またはその相補体を含む、単離DNAヌクレオチドプライマー配列。

【請求項 45】

配列番号1、2、3、4、5、および23からなる群より選択される配列またはその相補体を含む、請求項44に記載の単離DNAヌクレオチドプライマー。

【請求項 46】

一对のDNA分子であって、該一对のDNA分子は、以下：第1のDNA分子と第2のDNA分子とを含み、ここで、該DNA分子が、TC1507トウモロコシ植物またはその子孫から抽出されたDNAにとって特徴的であるDNAプライマーまたはプローブとして機能するために十分な長さの、配列番号26の隣接ヌクレオチドまたはその相補体である、一对のDNA分子。

【請求項 47】

一对のDNA分子であって、該一对のDNA分子は、以下：第1のDNA分子と第2のDNA分子とを含み、ここで、該DNA分子が、TC1507トウモロコシ植物またはその子孫から抽出されたDNAにとって特徴的であるDNAプライマーまたはプローブとして機能するために十分な長さの、配列番号27の隣接ヌクレオチドまたはその相補体である、一对のDNA分子。

【請求項 48】

配列番号45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56および57からなる群より選択される配列またはその相補体を含むジャンクション配列を含む、単離DNA分子。

【請求項 49】

種子サンプル中で、配列番号21または配列番号22内の配列を特異的に認識する特異的プライマーまたはプローブを用いて、TC1507特異的領域を検出する工程を包含する、種子純度を確認するための方法。

【請求項 50】

イベントTC1507の存在について種子をスクリーニングする方法であって、1つの種子ロットのサンプル中で、配列番号21または配列番号22内の配列を特異的に認識する特異的プライマーまたはプローブを用いて、TC1507特異的領域を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 51】

昆虫抵抗性トウモロコシ植物、またはその一部分であって、ここで、配列番号45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56および57ならびにそのそれらの相補体からなる群より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が、該植物のゲノムの一部分を形成する、昆虫抵抗性トウモロコシ植物、またはその一部分。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の昆虫抵抗性トウモロコシ植物の後代植物であって、ここで、配列番号 4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6 および 5 7 ならびにそれらの相補体からなる群より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 が、該植物のゲノムの一部分を形成する、後代植物。

【請求項 5 3】

請求項 5 1 または 5 2 に記載の植物の種子。

【請求項 5 4】

昆虫抵抗性トウモロコシ植物を生産するための方法であって、該方法は、請求項 5 1 または 5 2 に記載の植物を用いて育種する工程、ならびに配列番号 4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6 および 5 7 ならびにそれらの相補体からなる群より選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列について分析することによって子孫を選択する工程、を包含する方法。

【請求項 5 5】

配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、23、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56 および 57 からなる群より選択される少なくとも 1 つの DNA ならびにそれらの相補体からなる群より選択される配列を含む、単離 DNA 配列。

【請求項 5 6】

一对の単離 DNA 配列であって、その各々が、少なくとも 10 個のヌクレオチドを含み、かつ DNA 増幅手順と一緒に使用される場合、イベント TC 1507 にとって特徴的な単位複製配列を生産する、一对の単離 DNA 配列。

【請求項 5 7】

各々が配列番号 26 から選択される、請求項 5 6 に記載の一对の単離 DNA 配列。

【請求項 5 8】

各々が配列番号 27 から選択される、請求項 5 6 に記載の一对の単離 DNA 配列。

【請求項 5 9】

トウモロコシ組織への TC 1507 イベント挿入の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) プライマー対の各メンバーが、該 TC 1507 イベント挿入にとって特徴的な配列の反対側にある、配列番号 26 または配列番号 27 由来の少なくとも 10 個のヌクレオチドを、各々、含むプライマー対を選択する工程；

(b) 該トウモロコシ組織のサンプルと該プライマー対とを接触させる工程；および

(c) DNA 増幅を実行し、そして単位複製配列について分析する工程、を包含する、方法。

【請求項 6 0】

前記プライマー対が、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、23、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56 および 57 およびそれらの相補体からなる群より選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

トウモロコシ組織へのイベント TC 1507 挿入の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件で該トウモロコシ組織のサンプルと、配列番号 45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56 および 57 ならびにそれらの相補体からなる群より選択される 1 つ以上の DNA 配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブとを接触させる工程；

(b) 該サンプルおよびプローブを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に供する工程；ならびに

(c) 該プローブのハイブリダイゼーションについて分析する工程、

包含する、方法。

【請求項 6 2】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6 および 5 7 ならびにそれらの相補体からなる群より選択される 1 つ以上の DNA 配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを備える、DNA 検出キット。

【請求項 6 3】

DNA 検出キットであって、該 DNA 検出キットは、プライマー対を備え、該プライマーは、配列番号 2 6 および配列番号 2 7 由来の少なくとも 1 0 個のヌクレオチドを各々含み、ここで、各々が、TC 1 5 0 7 イベント挿入にとって特徴的な配列の反対側にある、DNA 検出キット。

【請求項 6 4】

前記プライマー対が、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 3、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6 および 5 7 ならびにそれらの相補体からなる群より選択される、請求項 6 1 に記載の DNA 検出キット。

【請求項 6 5】

生物学的サンプル中のイベント TC 1 5 0 7 を同定するためのキットであって、配列番号 2 4 内の TC 1 5 0 7 特異的領域を検出する、キット。

【請求項 6 6】

生物学的サンプル中の TC 1 5 0 7 を同定するための方法であって、配列番号 2 4 内の TC 1 5 0 7 特異的領域を検出する、方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】トウモロコシイベント TC 1 5 0 7 およびそれを検出するための方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、植物分子生物学の分野に関し、詳しくは、本発明は植物に対して昆虫抵抗性を与えるための DNA 構築物に関する。さらに詳しくは、本発明は昆虫抵抗性トウモロコシ植物 TC 1 5 0 7 と、サンプル中のトウモロコシ植物 TC 1 5 0 7 DNA およびその組成物の存在を検出するためのアッセイとに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

本発明は、昆虫抵抗性トウモロコシ (Zea mays) 植物 TC 1 5 0 7 (トウモロコシ TC 1 5 0 7 系統もしくはトウモロコシのイベント TC 1 5 0 7 と呼ばれる) と、トウモロコシ植物 TC 1 5 0 7 の DNA 植物発現構築物ならびにトウモロコシ植物 TC 1 5 0 7 およびその子孫にある導入遺伝子 / 隣接挿入領域の検出とに関する。

【0 0 0 3】

トウモロコシは重要な作物であり、世界中の多くの地域で主要な食糧源となっている。昆虫に起因する損害は、化学的殺虫剤等の防御手段の使用にもかかわらず、世界中のトウモロコシ作物損失の主要要因である。この観点から考えると、虫害を制御するために、また従来の化学的殺虫剤の必要性を少なくするために、虫抵抗性がトウモロコシ等の作物に遺伝子組換えによって取り込まれてきた。トランスジェニック昆虫抵抗性作物を生産する

ために利用されてきた一群の遺伝子は、バチルスチューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) (B.t.) のデルタエンドトキシンである。デルタエンドトキシンは、トウモロコシと同様に、綿、ジャガイモ、米、ひまわり等の作物で成功裏に発現されており、害虫に対して優れた防御をもたらすことが証明されている (Perlak, F. J.ら (1990) *Bio/Technology* 8、939-943; Perlak, F. J.ら (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:313-321; Fujimoto H.ら (1993) *Bio/Technology* 11:1151-1155; Tuら (2000) *Nature Biotechnology* 18:1101-1104; PCT公開番号WO 01/13731; および Bing JWら (2000) *Efficacy of Cry1F Transgenic Maize*, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, CO)。

【0004】

植物での外来遺伝子の発現は、その植物のゲノム内での外来遺伝子の位置によって影響されることが知られており、このような影響は、おそらくクロマチン構造 (例えば、ヘテロクロマチン) もしくは組込部位近傍の転写制御因子 (例えば、エンハンサー) の近接性によると考えられる (Weisingら, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988)。同時に、ゲノム内の異なる位置にある導入遺伝子の存在は、異なる方法での植物の全体的な表現系に影響する。このことから、目的とする導入遺伝子の最適な発現によって特徴づけられるイベントを同定するために数多くのイベントをスクリーニングする必要がたびたび生ずる。例えば、導入遺伝子の発現レベルがイベント間で多種多様となり得ることが、植物および他の生物で観察されている。また、空間的または一時的発現パターンの違い (例えば、導入遺伝子構築物に存在する転写制御因子から予想されるパターンとは一致しないと思われる種々の植物組織での導入遺伝子の相対的発現の違い) もあると考えられる。この理由から、何百、何千もの異なるイベントを作り出し、これらのイベントを、商業目的のために所望の導入遺伝子発現レベルおよびパターンを有する単一のイベントについてスクリーニングすることが、一般的である。所望のレベルまたはパターンの導入遺伝子を持つイベントは、従来の育種法を用いた異系交配による他の遺伝的バックグラウンドへの導入遺伝子の遺伝子移入にとって、有用である。そのような交配の子孫は、元の形質転換体の特徴である導入遺伝子発現を維持する。この戦略は、局所的な成長条件に十分適応されるいくつかの種での信頼できる遺伝子発現を確かなものにするために用いられる。

【0005】

交配による子孫が目的の導入遺伝子を含むかどうかを判断するために、特定のイベントの存在を検出することが可能であることが、有利であると思われる。また、特定のイベントを検出することは、市販前の承認に必要な規則および遺伝子組換え作物由来食品の表示付けに必要な規則に従う上で、野外での作物の形質モニタリングや環境モニタリングで使用する上で、あるいは収穫された作物に由来する製品のモニタリングをおこなう上で、さらにまた規定もしくは契約条件に制約された当事者のコンプライアンスを確実にする上で、有用である。

【0006】

限定されるものではないが、核酸プローブを用いたDNAハイブリダイゼーションまたはポリマーゼ鎖反応 (PCR) 等の任意の公知核酸検出方法によって、導入遺伝子の存在を検出することが可能である。これらの検出方法は、一般に、頻繁に使用される遺伝的因子 (例えば、プロモーター、ターミネーター、およびマーカー遺伝子) に焦点を当てている。なぜなら、多くのDNA構築物では、コード領域が互いに置換可能であるからである。その結果、それらの方法は、挿入された非相同DNAに隣接した隣接DNAのDNA配列が知られていない限り、異なるイベント間、特に同一DNA構築物またはかなり類似した構築物を用いて作られるイベント間の違いを識別する上で有用ではないと思われる。

例えば、イベント特異的PCRアッセイが、優良GAT-ZM1の検出に関する米国特許第6,395,485号に開示されている。したがって、イベントTC1507の同定のための単純かつ判別可能な方法を有することが求められる。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、好ましくは、昆虫抵抗性単子葉植物作物の生産および選択のための方法に関する。より詳しくは、植物細胞および植物で発現された場合に昆虫に対する耐性を与えるDNA構築物が提供される。したがって、本発明の第1の局面によれば、植物細胞および植物で発現された場合に植物細胞および植物に対して昆虫抵抗性を与える宿主細胞への導入および該宿主細胞内での複製が可能なDNA構築物が提供される。DNA構築物は、PHI8999Aと命名されたDNA分子から構成され、2つの導入遺伝子発現カセットを含む。第1の発現カセットは、プロモーター、5'非翻訳エキソン、およびアグロバクテリウムツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)から単離された3'ORF25転写終結因子を含むDNA分子(Barkerら(1983)Plant Mol. Biol. 2:335-350)に作用自在に結合したCRy1Fとして同定されるB.t. ___-エンドトキシンをコードするDNA分子(米国特許第5,188,960号および第6,218,188号)に作用自在に結合したトウモロコシユビキチン(Ubni-1)遺伝子(Christensenら(1992)Plant Mol. Biol. 18:675-689およびChristensen and Quail(1996)Transgenic Res. 5:213-218)の第1のイントロンを含むDNA分子を有する。上記DNA構築物の第2の導入遺伝子発現カセットは、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター由来の3'転写終結因子を含むDNA分子(Mitsuharaら(1996)Plant Cell Physiol. 37:49-59を参照せよ)に作用自在に結合したホスフィノスリンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)遺伝子をコードするDNA分子(Wohlleben W.ら(1988)Gene 70:25-37)に作用自在に結合したCaMV35SプロモーターのDNA分子(Odell J.T.ら(1985)Nature 313:810-812;Mitsuharaら(1996)Plant Cell Physiol. 37:49-59)を有する。上記DNA構築物を含む植物も提供される。

【0008】

本発明の別の局面によれば、TC1507と表された新規のトウモロコシ植物を同定するために組成物および方法が提供され、該方法はTC1507の5'および/または3'隣接配列を特異的に認識するプライマーまたはプローブに基づく。PCR反応で利用された場合、遺伝子組換えイベントTC1507に特有の単位複製配列を生ずるプライマー配列を含むDNA分子が提供される。これらの分子を、

5'-GTAGTACTATAGATTATATTATTCGTAGAG-3'(配列番号1);

5'-GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCCGGAG-3'(配列番号2);

5'-CTTCAAACAAGTGTTGACAAA-3'(配列番号23);

5'-TGTGGTGTGTTTGTGGCTCTGTCCTAA-3'(配列番号3);

5'-AGCACCTTTTTCATTCTTTTCATATAC-3'(配列番号4);

5'-GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC-3';(配列番号5)

からなる群ならびにそれらの相補体からなる群より選択することが可能である。これらの分子を含むトウモロコシ植物および種子は、本発明の一面である。さらに、上記イベントTC1507の同定のためのそれらのプライマー配列を利用するキットが提供される。

【0009】

本発明の別の局面は、本明細書に記載したTC1507の特異的隣接配列に関し、該配列は生物学的サンプルのTC1507に対する特異的な同定方法を開発するのに用いられ得る。より詳しくは、本発明は配列番号21、配列番号22、およびTC1507の5' /または3'隣接領域に関し、これらは特異的なプライマーおよびプローブの開発に使用し得る。本発明はさらに、そのような特異的プライマーまたはプローブの使用に基づいて生物学的サンプル中のTC1507の存在を同定する方法に関する。

【0010】

本発明の別の局面によれば、サンプル中のトウモロコシのイベントTC1507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)DNAを含むサンプルを、トウモロコシのイベントTC1507から抽出したゲノムDNAによる核酸増幅反応で使った場合に、トウモロコシのイベントTC1507にとって特徴的な単位複製配列を作るDNAプライマーセットと接触させること、(b)核酸増幅反応を実施することで、単位複製配列を生成すること、ならびに(c)この単位複製配列を検出することを含む。

【0011】

新規導入遺伝子/隣接挿入領域、配列番号26、および配列番号27を含み、また配列番号26および配列番号27に対して相同または相補的であるDNA分子が、本発明の一局面である。

【0012】

新規導入遺伝子/隣接挿入領域、配列番号26を含むDNA配列が本発明の一局面である。トウモロコシ植物TC1507にとって特徴的な単位複製配列産物の生産のためのプライマー配列として有用である、導入遺伝子挿入配列の十分な長さのポリヌクレオチドと配列番号26のトウモロコシ植物TC1507由来のトウモロコシゲノムおよび/または隣接配列の十分な長さのポリヌクレオチドとが含まれるDNA配列が挙げられる。

【0013】

また、新規導入遺伝子/隣接挿入領域、配列番号27を含むDNA配列が本発明の一局面である。トウモロコシ植物TC1507にとって特徴的な単位複製配列産物の生産のためのプライマー配列として有用である、導入遺伝子挿入配列の十分な長さのポリヌクレオチドと配列番号27のトウモロコシ植物TC1507由来のトウモロコシゲノムおよび/または隣接配列の十分な長さのポリヌクレオチドとが含まれるDNA配列が挙げられる。

【0014】

本発明の別の局面によれば、配列番号26のDNA配列の導入遺伝子部分の少なくとも11以上のヌクレオチドまたはそれらの相補体と、配列番号26の同様の長さのトウモロコシの5'隣接DNA配列またはそれらの相補体とを含むDNA配列が、DNA増幅方法でDNAプライマーとして有用である。これらのプライマーを用いて生産された単位複製配列は、トウモロコシのイベントTC1507にとって特徴的である。したがって、本発明はまた、配列番号26に相同または相補的なDNAプライマーによって生産される単位複製配列を包含する。

【0015】

本発明の別の局面によれば、配列番号27のDNA配列の導入遺伝子部分の少なくとも11以上のヌクレオチドまたはそれらの相補体と、配列番号27の同様の長さのトウモロコシの3'隣接DNA配列またはそれらの相補体とを含むDNA配列が、DNA増幅方法でDNAプライマーとして有用である。これらのプライマーを用いて生産された単位複製配列は、トウモロコシのイベントTC1507にとって特徴的である。したがって、本発明はまた、配列番号27に相同または相補的なDNAプライマーによって生産される単位複製配列を包含する。

【0016】

より詳しくは、DNA分子が配列番号1もしくはその相補体および配列番号2もしくはその相補体；配列番号2もしくはその相補体および配列番号23もしくはその相補体；配列番号3もしくはその相補体および配列番号5もしくはその相補体；配列番号4もしくは

その相補体および配列番号 5 もしくはその相補体として同定される DNA プライマーセットを含む一对の DNA 分子が、本発明の局面である。

【0017】

本発明のさらなる局面は、配列番号 1 および配列番号 2 の DNA 分子を含む単位複製配列；配列番号 2 および配列番号 23 の DNA 分子を含む単位複製配列；配列番号 3 および配列番号 5 の DNA 分子を含む単位複製配列；ならびに配列番号 4 および配列番号 5 の DNA 分子を含む単位複製配列を包含する。

【0018】

本発明の別の局面によれば、サンプル中のイベント TC 1507 に対応する DNA 分子の存在を検出する方法であって、該方法は、(a) トウモロコシ植物から抽出した DNA を含むサンプルを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件でトウモロコシのイベント TC 1507 から抽出した DNA とハイブリダイズする一方でストリンジェントなハイブリダイゼーション条件でコントロールトウモロコシ植物 DNA とハイブリダイズしない分子である DNA プローブと接触させること、(b) 上記サンプルおよびプローブをストリンジェントなハイブリダイゼーション条件にさらすこと、ならびに(c) DNA に対するプローブのハイブリダイゼーションを検出することを含む。より詳しくは、サンプル中のイベント TC 1507 に対応する DNA 分子の存在を検出する方法は、(a) トウモロコシ植物から抽出された DNA を含むサンプルを、そのイベントに特有な配列（例えば連結配列）からなる DNA プローブ分子であって、トウモロコシのイベント TC 1507 から抽出される DNA とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件でハイブリダイズし、かつそのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でコントロールトウモロコシ植物 DNA とはハイブリダイズしない DNA プローブ分子とハイブリダイズさせること、(b) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件にサンプルおよびプローブをさらすこと、ならびに(c) DNA に対するプローブのハイブリダイゼーションを検出すること、からなる。

【0019】

さらに、配列番号 24 内の TC 1507 特異的領域を検出する生物学的サンプル内のイベント TC 1507 を同定するためのキットおよび方法が提供される。

【0020】

配列番号 45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、および 57 からなる群より選択される配列または該配列の相補体からなる群より選択される TC 1507 の少なくとも 1 つの結合配列を含む DNA 分子が提供され、結合配列は、ゲノムに挿入された非相同 DNA と挿入部位に隣接するトウモロコシ細胞由来の DNA（すなわち、隣接 DNA）とのあいだの結合を補い、イベント TC 1507 にとって特徴的である。

【0021】

本発明の別の局面によれば、昆虫抵抗性トウモロコシ植物を生産する方法は、(a) 昆虫抵抗性を与える本発明の発現カセットを含む第 1 のトウモロコシ親系統と昆虫抵抗性が欠如した第 2 のトウモロコシ親系統とを交配させることで、複数の後代植物を生産すること、ならびに(b) 昆虫抵抗性である後代植物を選択すること、を含む。そのような方法は、第 2 のトウモロコシ親系統に対して後代植物を戻し交配することで、昆虫抵抗性であるトウモロコシ植物の純粋種トウモロコシ植物を生産するさらなるステップを、任意に含むものであってもよい。

【0022】

本発明は、昆虫抵抗性であるトウモロコシ植物を生産する方法であって、DNA 構築物 PHI 8999A（配列番号 25）によってトウモロコシ植物細胞を形質転換すること、形質転換されたトウモロコシ細胞をトウモロコシ植物に成長させること、昆虫抵抗性を示すトウモロコシ植物を選択すること、ならびにトウモロコシ植物を稔性トウモロコシ植物に成長させること、を含む方法を提供する。上記稔性トウモロコシ植物を、自家受粉または適合性のあるトウモロコシ種と交配して、昆虫抵抗性の子孫を得ることができる。

【0023】

本発明はさらに、生物学的サンプル中のトウモロコシのイベントTC1507を同定するためのDNA検出キットに関する。好ましくは、本発明のキットは、PCR同定プロトコルで使用するために、TC1507の5'もしくは3'隣接領域を特異的に認識する第1のプライマーと、TC1507の外来DNA内または隣接DNA内の配列を特異的に認識する第2のプライマーとを含む。本発明もまた、イベントTC1507の特異的領域と80%ないし100%の配列同一性を持つ配列に一致または該配列に相補的である配列を有する特異的プローブを含む、生物学的サンプル中のイベントTC1507を同定するためのキットを提供する。好ましくは、プローブの配列は、イベントTC1507の5'または3'隣接領域の一部を含む特異的領域に対応する。

【0024】

本発明によって包含される方法およびキットを、以下に限定されるものではないが、植物、植物材料、あるいは限定されるものでないが、植物材料を含む、もしくは該植物材料から作られた食物もしくは飼料製品（生または加工済み）等の製品に含まれるイベントTC1507を同定すること等の異なる目的のために、用いることができる。さらに、あるいはそれに代わって、本発明の方法およびキットを、遺伝子組換え材料と非遺伝子組換え材料とのあいだの分離を目的として遺伝子組換え植物材料の同定に用いることができる。さらに、あるいはその代わりに、本発明の方法およびキットを、トウモロコシのTC150イベントを含む植物材料の品質を決定するのに用いることができる。キットは、上記検出方法を実行するために必要な試薬および材料を含むものであってもよい。

【0025】

本発明はさらに、TC1507トウモロコシ植物またはその一部に関するもので、該一部として、限定されるものではないが、トウモロコシ植物TC1507およびそれに由来する子孫の花粉、胚珠、栄養細胞、花粉細胞の核、および卵細胞の核が挙げられる。本発明のDNAプライマー分子が特異的単位複製配列産物を与えるトウモロコシ植物および種子TC1507は、本発明の一局面である。

【0026】

本発明の上記局面および他の局面は、以下の詳細な説明および添付した図面から、よりいっそう明らかになる。

【0027】

（詳細な説明）

以下の定義および方法は、本発明をより良く定義するために、また本発明の実施に際して当業者を導くために、提供される。特に示さない限り、用語は関連技術分野における当業者の慣例的用法にしたがって理解される。また、分子生物学での共通する用語の定義も、Riegerら、Glossary of Genetics: Classical and Molecular、第5版、Springer-Verlag; New York, 1991; およびLewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994に見いだされよう。37CFR1.822に記載のDNA塩基についての命名法が用いられる。

【0028】

本明細書中で使用される場合、「含む (comprising)」という表現は「限定されるものではないが含まれる (including but not limited to)」ことを意味する。

【0029】

本明細書中で使用される場合、「トウモロコシ (corn)」という用語は、ズィーメイス (Zea mays) またはトウモロコシ (maize) を意味するもので、トウモロコシの野生種を含むトウモロコシと交配し得るすべての植物種を包含する。

【0030】

本明細書中で使用される場合、「TC1507特異的」という用語は、植物、植物材料、あるいは限定されるものでないが、植物材料を含む、もしくは該植物材料から作られた

食物もしくは飼料製品（生または加工済み）等の製品に含まれるイベントTC1507を識別可能に同定することに適したヌクレオチド配列のことをいう。

【0031】

本明細書中で使用される場合、「昆虫抵抗性（insect resistant）」および「害虫に影響を及ぼす（impacting insect pests）」という表現は、昆虫の任意の発育段階での摂食、増殖、および/または行動に変化をもたらすことをいい、昆虫を殺すこと、成長を遅らせること、生殖能を抑制すること等が挙げられるが、それらに限定されない。

【0032】

本明細書中で使用される場合、「殺虫活性（pesticidal activity）」および「殺虫力（insecticidal activity）」という表現は、数多くのパラメーターによって測定し得る生物または物質（例えば、タンパク質）の活性に言及するために同義的に使われる。上記パラメーターとして、限定されるものではないが、適当な時間にわたって生物または物質に対して給餌および/または暴露した後の害虫致死率、害虫体重減少、害虫誘引、害虫忌避性、ならびに害虫の他の行動的および生理的变化が挙げられる。例えば、「殺虫性タンパク質（pesticidal proteins）」は、単独で、あるいは他のタンパク質と組み合わせさせて、殺虫活性を示すタンパク質である。

【0033】

「コード配列（coding sequence）」とは、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列のことをいう。本明細書中で使用される場合、特定の核酸に関する文脈のなかで用いられる場合、「コードしている（encoding）」または「コードされている（encoded）」という表現は、特定のタンパク質にヌクレオチド配列が翻訳されるのを導くために必須の情報を上記核酸が含むことを意味する。タンパク質がコードされている核酸は、核酸の翻訳領域内に非翻訳配列（例えば、イントロン）を含むものであってもよく、あるいはそのような介在非翻訳配列が欠けたもの（例えば、cDNAにあるようなもの）であってもよい。

【0034】

遺伝子（gene）は、特定のタンパク質を発現する核酸フラグメントのことをいい、コード配列の上流にある制御配列（5'非コード配列）および該コード領域の下流にある制御配列（3'非コード配列）が挙げられる。「天然遺伝子（native gene）」は、自然界で見いだされるような遺伝子のことをいい、それ自身の制御配列を有する。「キメラ遺伝子（chimeric gene）は、天然遺伝子ではない任意の遺伝子をいい、自然界では一緒には見いだされない調節配列とコード配列とを含む。したがって、キメラ遺伝子は異なる源に由来する調節配列およびコード配列を含むものであってもよいし、あるいは同一の源に由来する調節配列およびコード配列を含むものであってもよいけれども、自然界で見いだされるものとは異なる様式で配置されている。「内因性遺伝子（endogenous gene）」は、生物のゲノム中の本来の位置にある天然遺伝子のことをいう。「外来（foreign）」とは目的とする位置に通常見いだされていない物質をいう。したがって、「外来DNA（foreign DNA）」は、新たに導入された植物の再配列DNAと組換えDNAとを含むものであってもよい。「外来」遺伝子は、宿主生物で通常見いだされない遺伝子のことをいうが、遺伝子導入によって宿主生物に導入される。外来遺伝子は、非天然生物に導入された天然遺伝子、あるいはキメラ遺伝子を含むことができる。「導入遺伝子（transgene）」は、形質転換という手段によってゲノムに導入された遺伝子である。組換えDNAが挿入されている植物ゲノム内の部位を、「挿入部位（insertion site）」または「標的部位（target site）」ということもある。

【0035】

本明細書中で使用される場合、「挿入DNA（insert DNA）」は植物材料を形質転換させるために用いられる発現カセット内の異質DNAのことをいい、一方「隣接

DNA (flanking DNA)」は植物等の生物に天然に存在するゲノムDNAあるいは形質転換イベントに関連したフラグメント等の本来の挿入DNA分子にとって異物である形質転換プロセスを介して導入された外来(異質)DNAのいずれかの存在であり得る。本明細書で用いられる「隣接領域(flanking region)」または「隣接配列(flanking sequence)」とは、少なくとも20塩基対、好ましくは少なくとも50塩基対、さらに最大で5,000塩基対の配列であり、元の外来挿入DNA分子の直上流かつ隣接して、あるいは直下流かつ隣接して位置している。外来DNAの無秩序な組込みをもたらす形質転換の手順は、各々の形質転換体にとって特徴的かつ固有の異なる隣接領域を含む形質転換体を生ずる。組換えDNAが従来通りの交配を介して植物に導入される場合、その隣接領域は一般に変化しない。形質転換体は、異質挿入DNAの一断片とゲノムDNAとの間、ゲノムDNAの2断片間、あるいは異質DNAの2断片間の固有な連結も含む。「連結(junction)」は、2つの特定のDNA断片が結合する1つの点である。例えば、挿入DNAが隣接DNAと結合するところに連結が存在する。連結点もまた、天然の生物に見いだされるものから改変されるかたちで2つのDNA断片が互いに結合している形質転換生物に存在する。「連結DNA(junction DNA)」とは、連結点を含むDNAのことをいう。

【0036】

本明細書中で使用される場合、「非相同(heterologous)」とは外来種に由来する核酸である核酸のことをいい、あるいは同一種に由来するものであれば、意図的になされるヒトの干渉によって、組成および/またはゲノム遺伝子座が天然の形態から実質的に改変されている核酸のことをいう。例えば、非相同ヌクレオチド配列に作用自在に結合したプロモーターを、ヌクレオチド配列が由来する種とは異なる種から由来するものとすることができ、あるいは同一種に由来するものであるならば、ヌクレオチド配列に作用自在に結合することが自然には見いだされないプロモーターである。非相同タンパク質は、外来種に由来するものであってもよく、あるいはもし同一種に由来するものであるならば、意図的にされるヒトの干渉によって元の形態から実質的に改変される。

【0037】

「制御配列(regulatory sequence)」とは、コード配列の上流に位置したヌクレオチド配列(5'非コード配列)、該コード配列のヌクレオチド配列、あるいは該コード配列内の下流に位置したヌクレオチド配列(3'非コード配列)のことをいい、転写、RNAプロセッシングもしくは安定性、あるいは関連コード配列の翻訳に影響を及ぼす。制御配列として、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、およびポリアダニル化認識配列を挙げることができる。

【0038】

「プロモーター(promoter)」とは、コード配列または機能性RNAの発現を制御することが可能なヌクレオチド配列のことをいう。一般に、コード配列は、プロモーター配列に対して3'側に位置している。このプロモーター配列は、近位の上流因子とより遠位の上流因子とからなり、後者の因子はしばしばエンハンサーといわれる。したがって、「エンハンサー(enhancer)」は、プロモーター活性を刺激することができるヌクレオチド配列であって、またプロモーターの不活性因子であってもよく、あるいはプロモーターのレベルもしくは組織特異性を高めるために挿入された非相同因子であってもよい。プロモーターは、天然遺伝子から該プロモーターの全体が由来するものであってもよく、あるいは自然界で見いだされる異なるプロモーターに由来する異なる因子から構成されるプロモーターであってもよく、あるいは合成ヌクレオチド部分から構成されるものであってもよい。異なるプロモーターが異なる組織または細胞種で、あるいは成長の異なる段階で、もしくは異なる環境条件に対する応答のなかで、遺伝子発現を指示することが可能であることが、当業者によって理解される。ほとんどの時間でほとんどの細胞で発現される核酸断片を生ずるプロモーターは、一般に「構成プロモーター(constitutive promoter)」と呼ばれる。植物細胞で有用な種々のタイプの新規プロモーターは、常に発見されており、数多くの例がOkamura and Goldbe

rg (1989) Biochemistry of Plants 15:1-82
によるコンパイルで見つかる可能性がある。多くの場合、制御配列の正確な境界は完全には規定されていないことから、異なる長さの核酸フラグメントが同一のプロモーター活性を持つ可能性がある、さらに認められている。

【0039】

「翻訳リーダー配列 (translation leader sequence)」とは、遺伝子のプロモーター配列とコード配列とのあいだに位置したヌクレオチド配列のことをいう。翻訳リーダー配列は、翻訳開始配列の完全に処理された mRNA 上流に存在する。翻訳リーダー配列は、数多くのパラメーターに作用を及ぼす可能性があり、該パラメーターとして、mRNA に対する一次転写産物のプロセッシング、mRNA 安定性、および/または翻訳効率が挙げられる。翻訳リーダー配列の例が記載されている (Turner and Foster (1995) Mol. Biotechnol. 3: 225-236)。

【0040】

「3'非コード配列 (3' non-coding region)」とは、コード配列の下流に位置したヌクレオチド配列のことをいい、ポリアデニル化認識配列と mRNA プロセッシングもしくは遺伝子発現に影響を及ぼし得る制御シグナルをコードする他の配列とが挙げられる。ポリアデニル化シグナルは、一般に mRNA 前駆体の 3' 末端にポリアデニル酸トラクトの付加に作用することによって特徴づけられる。異なる 3' 非コード配列の使用は、Ingelbrechtら (1989) Plant Cell 1: 671-680 によって例示される。

【0041】

「タンパク質」または「ポリペプチド」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド内のコード配列によって定まる特定の順番で配置された複数のアミノ酸からなる鎖である。

【0042】

DNA 構築物は、互いに結合した DNA 分子の集合体であり、1つ以上の発現カセットを提供する。DNA 構築物は、細菌細胞での自己複製が可能となったプラスミドであってもよく、機能性遺伝因子 (すなわち、特に、プロモーター、イントロン、リーダー、コード配列、および 3' 末端領域) を提供する DNA 分子の導入に有用である種々のエンドヌクレアーゼ酵素制限部位を含む。あるいは、DNA 構築物は、DNA 分子の直鎖状集合体、例えば1つの発現カセットであってもよい。DNA 構築物に含まれる発現カセットは、伝令 RNA の転写を生ずるために必須の遺伝因子を含む。発現カセットを、原核細胞もしくは真核細胞で発現するように設計することができる。本発明の発現カセットは、植物細胞で最も好ましく発現するように設計される。

【0043】

本発明の DNA 分子は、目的とする生物での発現のための発現カセットに提供される。このカセットは、本発明のコード配列に作用自在に結合した 5' および 3' 調節配列を含む。「作用自在に結合 (operably linked)」とは、結合している核酸配列が隣接し合っており、2つのタンパク質コード領域が連結する必要がある場合、隣接し、かつ同一リーディングフレームにあることを意味する。作用自在に結合することが意図することは、プロモーターと第2の配列とのあいだの機能的結合を示すことであり、その第2の配列に対応した DNA 配列の転写の開始および実行にプロモーター配列が関与する。上記カセットに、生物に同時形質転換される少なくとも1つの遺伝子を新たに加えることも可能である。あるいは、追加の遺伝子を多重発現カセットまたは多重 DNA 構築物に設けることができる。

【0044】

発現カセットは、転写の 5' から 3' 方向に、宿主として働く生物で機能的な転写および翻訳開始領域、コード領域、および転写および翻訳終止領域を含む。転写開始領域 (すなわち、プロモーター) は、宿主生物に対して天然もしくは類似、あるいは外来もしくは

異質であってもよい。さらに、プロモーターは天然の配列もしくはそれにとって代わるものとして合成配列であってもよい。発現カセットは、発現カセット構築物内に5'リーダー配列をさらに含んでもよい。そのようなリーダー配列は翻訳を高めるように作用することができる。

【0045】

本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック」という用語は、非相同核酸の存在によって遺伝子型が変えられた任意の細胞、細胞系統、カルス、組織、植物の一部分、または植物を包含し、そのように改変されたトランスジェニックに加えて、最初のトランスジェニックから交配または無性生殖によって作られたトランスジェニックも含まれる。本明細書で使用される「トランスジェニック」という用語は、従来の植物育種法または自然発生的なイベント（例えば、無作為他家受精、非組換え型ウイルス感染、非組換え型細菌形質転換、非組換え型転位、もしくは偶発突然変異）によって、ゲノム（染色体または染色体外）の変化を含まない。

【0046】

トランスジェニック「イベント(event)」は、異質DNA構築物による植物細胞の形質転換によって生じるもので、目的とする導入遺伝子を含む核酸発現カセット、植物ゲノムへの導入遺伝子の挿入によって生ずる植物集団の再生、および特定のゲノム位置への挿入によって特徴づけられる特定の植物の選択が挙げられる。イベントは、表現型の上では、導入遺伝子の発現によって特徴づけられる。遺伝子レベルでは、イベントは、植物の遺伝学的構成の一部である。「イベント」という用語は、形質転換体と異質DNAを含む他の種とのあいだの外部交配によって生ずる子孫のこともいう。反復親に対する反復戻し交配後でさえ、形質転換された親由来の挿入DNAおよび隣接DNAが同一染色体上の位置に、上記交配の後代に存在する。「イベント」という用語は、挿入DNA（例えば、自家受粉によって生じた子孫および元の形質転換体）を含む親系統と挿入DNAを含まない親系統との交配の結果として、目的とする導入遺伝子を含む挿入DNAを受け取る子孫への転移が期待される挿入DNAに直に隣接した挿入DNAおよび隣接配列を含む形質転換体に由来するDNAのこともいう。

【0047】

昆虫抵抗性TC1507トウモロコシ植物は、遺伝子組換えTC1507トウモロコシ植物から生長したトウモロコシ植物と昆虫抵抗性を与える本発明の発現カセットによる形質転換に由来したその後代とからなる第1の親トウモロコシ植物と、昆虫抵抗性を持たない第2の親トウモロコシ植物とを一代交配させて複数の第一後代植物を作り、次に、昆虫抵抗性の第一後代植物を選択し、この第一後代植物を自家受粉させることで、複数の第2の後代植物を作り、次に第2の後代植物から昆虫抵抗性植物を選択することによって、育種することができる。これらのステップは、さらに、昆虫抵抗性第一後代植物または昆虫抵抗性第二後代植物を第2の親トウモロコシ植物または第3の親トウモロコシ植物と戻し交配することで、昆虫耐性であるトウモロコシ植物が得られる。

【0048】

本明細書中で使用される場合、「植物(plant)」という用語は、全ての植物、植物器官（例えば、葉、茎、および根）、種子、植物細胞、およびその子孫について言及するものである。本発明の範囲内であると理解されるトランスジェニック植物の部分は、例えば、本発明のDNA分子によって事前に形質転換されたトランスジェニック植物またはその子孫に由来する植物細胞、プロトプラスト、組織、カルス、胚、同様に花、茎、果実、葉、および根を含むことから、少なくとも部分的にはトランスジェニック細胞からなるものも本発明の一局面である。

【0049】

本明細書中で使用される場合、「植物細胞(plant cell)」という用語は、限定されることなく、種子、懸濁培養物、胚、分裂組織細胞領域、カルス組織、葉、根、芽、配偶体、造胞体、花粉、および花粒粉を包含する。本発明の方法で使用し得る植物の網は、通常、形質転換技術に受け入れられる高等植物の種類と同程度に広く、単子葉植物およ

び双子葉植物の両方が挙げられる。

【0050】

「形質転換 (transformation)」とは、核酸断片を宿主生物のゲノムに移して、遺伝的に安定な遺伝的形質を得ることをいう。形質転換核酸断片を含む宿主生物を「トランスジェニック」生物という。植物形質転換法の例として、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換 (De Blaereら (1987) Meth. Enzymol. 143: 277) および粒子加速もしくは「遺伝子銃 (gene gun)」形質転換技術 (Kleinら (1987) Nature (London) 327: 70-73; 米国特許第 4,945,050 号、本明細書で援用) が挙げられる。別の形質転換方法を以下に開示する。

【0051】

したがって、本発明の単離ポリヌクレオチドを組換え体構築物、概してDNA構築物に取り込むことができ、該構築物は宿主細胞への導入および該宿主細胞での複製をおこなうことが可能である。そのような構築物をベクターとすることができ、ベクターは所定の宿主細胞でポリペプチドコード配列の転写および翻訳をおこなうことができる。植物細胞の安定的トランスフェクションまたはトランスジェニック植物の確立に適した多くのベクターが、例えば、Pouwelsら、(1985; 上掲1987) Cloning Vectors: A Laboratory Manual、Weissbach and

Weissbach (1989) Methods for Plant Molecular Biology, (Academic Press, New York) ; およびFlevinら、(1990) Plant Molecular Biology Manual, (Kluwer Academic Publishers) に記載されている。一般に、植物発現ベクターとして、例えば、5' および3' 制御配列および優性選択可能なマーカーの転写制御下にある1種類以上のクローン化植物遺伝子が挙げられる。そのような植物発現ベクターは、プロモーター制御領域 (例えば、誘導もしくは構成的、環境もしくは発生的に制御された、または細胞もしくは組織特異的である発現を調節する制御領域)、転写開始の開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終結部位、および/あるいはポリアデニル化シグナルを含むこともできる。

【0052】

2つの異なるトランスジェニック植物を交配させて2つの独立して分離する追加された外来遺伝子を含む子孫を生ずることも可能であることも理解される。適当な子孫の自家受粉によって、両方の追加された外来遺伝子に関してホモ接合性である植物を生産することができる。親植物に対する戻し交配と非遺伝子組換え植物との外部交配もまた、栄養生殖のように、考えられる。他の育種法の説明は、異なる形質および作物に関して一般的に用いられており、いくつかの参考文献の1つ、例えばFehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987) に見いだすことができる。

【0053】

「プローブ (probe)」は、従来を検出可能な標識またはレポーター分子、例えば放射性同位元素、リガンド、化学発光剤、もしくは酵素が取り付けられる単離された核酸である。そのようなプローブは、標的核酸の一本の鎖に対して相補的であり、本発明の場合、トウモロコシのイベントTC1507からの単離DNAの鎖に、トウモロコシ植物に由来もしくは該イベント由来のDNAを含むサンプルに由来するにせよ、相補的である。本発明にもとづくプローブとして、デオキシリボ核酸もしくはリボ核酸のみならず、標的DNA配列に特異的に結合し、標的DNA配列の存在を検出するために使用し得るポリアミド類および他のプローブ材料が挙げられる。

【0054】

「プライマー (primer)」は、プライマーと標的 DNA 鎖との間でハイブリッドを形成するために核酸ハイブリダイゼーションによって相補的標的 DNA 鎖にアニールされ、次にポリメラーゼ (例えば DNA ポリメラーゼ) によって標的 DNA 鎖に沿って延伸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鎖反応 (PCR) または他の従来核酸増幅法によって、標的核酸配列を増幅させる用途のことをいう。「 PCR 」または「ポリメラーゼ鎖反応 (polymerase chain reaction)」は、特異的 DNA セグメントを増幅させるために用いられる技術である (米国特許第 4, 683, 195 号および第 4, 800, 159 号 (本明細書で援用) を見よ)。

【 0055 】

プローブおよびプライマーは、操作者が定めたハイブリダイゼーション条件または反応条件で特異的に標的 DNA 配列に結合する十分なヌクレオチド長である。この長さは、選ばれる検出方法で有用である十分な長さである任意の長さであってもよい。一般に、長さが 11 ヌクレオチド以上、好ましくは 18 ヌクレオチド以上、より好ましくは 22 ヌクレオチド以上が用いられる。そのようなプローブおよびプライマーは、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件で標的配列と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、標的配列と隣接ヌクレオチドの DNA 配列類似性が完全であり、プローブが標的 DNA 配列とは異なっても、標的 DNA 配列 に対するハイブリダイゼーション能力を 保持する プローブを従来方法によって設計することができる。プローブはプライマーとして使用することもできるが、一般に標的 DNA または RNA と結合するように設計されており、増幅プロセスでは使用されない。

【 0056 】

特異的プライマーを用いて組込み断片を増幅し、生物学的サンプルでのイベント TC 1507 を同定するための「特異的プローブ」として使用し得る単位複製配列を作ることができる。プローブが、該プローブと生物学的サンプルとの結合を可能にする条件下で、その生物学的サンプルの核酸とハイブリダイズする場合、この結合を検出することができるので、生物学的サンプル中のイベント TC 1507 の存在を示すことが可能である。そのような結合プローブの同定は、当技術分野で記載されている。特異的プローブは、望ましくは、最適化された条件下で、特異的に、上記イベントの 5' または 3' 隣接領域内の領域にハイブリダイズし、好ましくはそれに隣接した外来 DNA の一部を含む。好ましくは、特異的プローブは、上記イベントの特定の領域と、少なくとも 80%、より好ましくは 80% ないし 85%、より好ましくは 85% ないし 90%、特に好ましくは 90% ないし 95%、さらに最も好ましくは 95% ないし 100% 同一 (または相補的) である。

【 0057 】

プローブおよびプライマーを調製および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ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (以下、「Sambrookら, 1989」とする); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubelら, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (定期的更新を含む) (以下、「Ausubelら, 1992」とする); および Innisら, 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、例えばそのような目的を意図したコンピュータプログラムを用いることによって、既知の配列から得ることができ、該プログラムの例として、PCR プライマー分析ツールを含む Vector NTI version 6 (Informax Inc., Bethesda Md.); Primer Select (DNASTAR Inc., Madison, Wis.); お

よび Primer (Version 0.5, (c)1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.) が挙げられる。さらに、当業者に既知のガイドラインを用いて、配列を視覚的に走査してプライマーを手動で同定することができる。

【0058】

本明細書で用いられる「キット (kit)」とは、本発明の目的、より詳しくは生物学的サンプル中のイベント TC1507 の同定を実施することを目的とした複数の試薬からなるセットのことをいう。品質管理 (例えば、種子ロットの純度)、植物材料の TC V 1507 イベントの検出、あるいは植物材料を含む材料もしくは該植物材料に由来する材料、例えば限定されるものではないが食品または飼料のために、本発明のキットを用いることができ、またその成分を明確に調節することができる。本明細書で用いられるように「植物材料 (plant material)」とは、植物から得られる材料または植物に由来する材料のことをいう。

【0059】

本明細書に開示された隣接 DNA および挿入配列に基づいたプライマーおよびプローブを、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シーケンシング) によって、開示された配列を確認するために (および、もし必要ならば、訂正するために) 用いることができる。本発明の核酸プローブおよびプライマーは、ストリンジェントな条件下で標的 DNA 配列とハイブリダイズする。任意の従来核酸ハイブリダイゼーションまたは増幅方法を用いて、サンプル中での トランスジェニックイベント由来 DNA の存在を同定することができる。核酸分子またはその断片は、一定の環境で他の核酸分子と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場合、2つの核酸分子は、2つの核酸分子が逆平行性の二重鎖核酸構造を形成することが可能であるならば、互いに特異的にハイブリダイズすることが可能であると考えられる。

【0060】

核酸分子は、完全な相補性を示すならば、この他の核酸分子の「相補体 (complement)」であると考えられる。本明細書中で使用される場合、一方の分子の各々のヌクレオチドが他方の分子のヌクレオチドに対して相補的である場合、これらの分子は「完全な相補性 (complete complementarity)」を示すと考えられる。2つの分子は、少なくとも従来「ストリンジェンシーが低い (low-stringency)」条件下で互いにアニールしたままであることを許すのに十分な安定性をもっ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 (minimally complementary)」と考えられる。同様に、上記分子は、少なくとも従来「ストリンジェンシーが高い (high-stringency)」条件下で互いにアニールしたままであることを許すのに十分な安定性をもって互いにハイブリダイズすることができる場合、「相補的 (complementary)」と考えられる。従来ストリンジェントな条件は、Sambrookら、1989、および Haymesら、In: Nucleic Acid hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985) に記載されており、したがって完全な相補性からの逸脱は、該逸脱が二重鎖構造を形成する分子の能力を完全に排除しない限り、許される。プライマーまたはプローブとして役に立つ核酸分子となるように、用いられた特定の溶媒および塩濃度のもとで、安定な二重鎖構造を形成することが可能であるように、配列が十分に相補的であることのみが求められる。

【0061】

ハイブリダイゼーション反応では、特異性は一般にハイブリダイゼーション後の洗淨の関数であり、最終洗淨溶液の温度およびイオン強度が重要な要素である。熱融解点 (T_m) は、相補的標的配列の 50% が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度 (所定のイオン強度および pH 下) である。DNA-DNA ハイブリッドについては、Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 13

8 : 2 6 7 - 2 8 4 の等式、すなわち $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{形態}) - 500 / L$ から T_m を近似させることができ、式中、 M は一価カチオンのモル濃度、 $\%GC$ は DNA 中のグアノシンおよびシトシンヌクレオチドの割合、 $\% \text{形態}$ はハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの割合、さらに L は塩基対内のハイブリッドの長さである。各々 1% のミスマッチで約 1、 T_m が減少する。したがって、 T_m 、ハイブリダイゼーション、および / または洗浄条件を、所望の同一性の配列に対してハイブリダイズするように調節することができる。例えば、> 90% 同一性を持つ配列が求められた場合、 T_m を 10 下げることができる。一般に、ストリンジেন্টな条件は、所定のイオン強度および pH で特異的配列およびその相補体の T_m よりも約 5 低く選択される。しかし、厳しいストリンジেন্টな条件は、 T_m よりも 1、2、3、または 4 より低い温度でのハイブリダイゼーションおよび / または洗浄を利用することができる、また中程度のストリンジেন্টな条件では、 T_m よりも 6、7、8、9、または 10 より低い温度でのハイブリダイゼーションおよび / または洗浄を利用することができる、低ストリンジেন্টな条件では、 T_m よりも 11、12、13、14、15、または 20 より低い温度でのハイブリダイゼーションおよび / または洗浄を利用することができる。

【0062】

上記等式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、ならびに所望の T_m を用いることで、当業者は、ハイブリダイゼーションおよび / または洗浄溶液のストリンジエンシーの変化が本質的に記載されていることを理解する。もし所望の度合いのミスマッチによって T_m が 45 (水溶液) または 32 (ホルムアミド溶液) よりも低くなるならば、より高い温度が使用できるように SSC 濃度を高めることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションについての詳しい指針は、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with nucleic acid Probe, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York); and Ausubel^ら, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) に見いだされる。Sambrook^ら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.) を見よ。

【0063】

本明細書中で使用される場合、実質的に相同な配列は、ストリンジエンシーが高い条件下で比較されている核酸分子の相補体に特異的にハイブリダイズする核酸分子である。DNA ハイブリダイゼーションを促進する適当なストリンジেন্টな条件は、例えば、約 45 の 6x 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC)、続いて 50 で 2x SSC による洗浄が当業者に知られており、あるいは *Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6* に見いだすことができる。一般に、ストリンジেন্টな条件は、塩濃度が、pH 7.0 ないし 8.3 で、約 1.5 M Na イオン未満、通常、約 0.01 ないし 1.0 M Na イオン濃度 (あるいは他の塩類) であり、温度は短いプローブ (例えば、10 ないし 50 ヌクレオチド) に対して少なくとも約 30 で、長いプローブ (例えば、50 ヌクレオチドを上回る) に対して少なくとも約 60 である。ストリンジেন্টな条件はまた、ホルムアミド等の不安定化剤の添加によって達成することが可能である。典型的な低ストリンジেন্টな条件として、37 で、30 ないし 35% ホルムアミド、1 M NaCl、1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) の緩衝液でハイブリダイゼーションをおこない、50 ないし 55 で 1X ないし 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl / 0.3 M クエン酸三ナトリウム) で洗浄することが挙げら

れる。典型的な中ストリンジェントな条件として、37 で、40ないし45%ホルムアルデヒド、1M NaCl、1% SDSでのハイブリダイゼーション、および55ないし60 で、0.5ないし1xSSCでの洗浄が挙げられる。典型的な高ストリンジェントな条件として、37 で、50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDSの緩衝液、でハイブリダイゼーションをおこない、60ないし65 で0.1xSSCで洗浄することが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の核酸を、イベントTC1507またはその相補体あるいはいずれかの断片に特有の1つ以上の核酸分子に対して、中程度にストリンジェントな条件で、特異的にハイブリダイズさせる。

【0064】

比較のために配列を位置合わせする方法が当技術分野で周知である。したがって、任意の2つの配列間でのパーセント同一性を決定することは、数学的なアルゴリズムを用いることで達成することができる。そのような数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17のアルゴリズム、Smithら(1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453の相同位置合わせアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448の類似性検索方法(search-for-similarity-method)、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877によって改変されたKarlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズムである。

【0065】

これらの数学的アルゴリズムのコンピュータインプリメンテーションを配列同一性の決定のための配列比較に利用することができる。そのようなインプリメンテーションとして、限定されるものではないが、PC/GeneプログラムのCLUSTAL (Intel ligenetics、Mountain View、Calif.より入手可能)、ALIGNプログラム (Version 2.0)、ALIGN PLUSプログラム (version 3.0、著作権1997)、およびGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTAを含むWisconsin Genetics Software Package、Version 10 (Accelrys、9685 Scranton Road、San Diego、Calif. 92121、USAより入手可能)が挙げられる。これらのプログラムを用いた位置合わせを、デフォルトパラメータを用いて実行することができる。

【0066】

CLUSTALプログラムは、Higgins and Sharp, Gene 73: 237-244 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet,ら, Nucleic Acid Research 16: 10881-90 (1988); Huang,ら, Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992)、およびPearson,ら, Methods in Molecular Biology 24: 307-331 (1994)によって詳しく記載されている。ALIGNおよびALIGN PLUSプログラムは、Myers and Miller (1988)上掲のアルゴリズムにもとづいている。Altschulら(1990) J. Mol. Biol. 215: 403のBLASTプログラムは、Karlin and Altschul (1990)上掲のアルゴリズムにもとづいている。データベース類似性検索に使えるプログラムのBLASTファミリーとして、ヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリー配列のBLASTN、タンパク質データベース配列に対するヌクレオチドクエリ

ー配列のBLASTX、タンパク質データベース配列に対するタンパク質クエリー配列のBLASTP、ヌクレオチドデータベース配列に対するタンパク質クエリー配列のTBLASTN、ならびにヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリー配列のTBLASTXが挙げられる。Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel,ら, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)を見よ。位置合わせまた、検査によって手動で実行することが可能である。

【0067】

比較を目的としてギャップ位置合わせ(gapped alignment)を得るために、Gapped BLAST(BLAST 2.0内)を、Altschul et al., (1997) Nucleic Acid Res. 25: 3389に記載したように利用することができる。あるいは、PSI-BLAST(BLAST 2.0内)を用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実行することができる。Altschulら(1997)上掲を見よ。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLASTを利用する場合、各々のプログラム(例えば、ヌクレオチド配列のBLASTN、タンパク質のBLASTX)のデフォルトパラメーターを用いることができる。例えば、www.ncbi.nlm.nih.govを見よ。

【0068】

本明細書中で使用される場合、2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈にある「配列同一性(sequence identity)」または「同一性(identity)」は、特定の比較窓全体にわたる最大一致に対して位置合わせした場合に、同一である2つの配列の残基に言及する。配列同一性の割合をタンパク質に関して用いる場合、同一ではない残基位置が保守的アミノ酸置換によってしばしば異なることが認められ、アミノ酸残基は、類似の化学的特性(例えば、電荷または疎水性)を持つ他のアミノ酸残基に対して置換されるので、分子の機能的特性を変化させない。配列が保存的置換において異なる場合、パーセント配列同一性は置換の保守的な性質を修正するために上方を調整される可能性がある。配列が保守的置換で異なる場合、配列同一性率を上方調整して置換の保守的な性質について修正をおこなってもよい。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性(sequence similarity)」または「類似性(similarity)」があると言われている。この調整をするための手段は、当業者に周知である。概して、このことは、完全なミスマッチよりはむしろ部分的なものとして保守的置換を採点することを伴い、それによって配列同一性率が増加する。このように、例えば、同一アミノ酸に得点1が与えられ、非保守的置換の得点はゼロであり、保守的置換にゼロないし1の得点があたえられる。保守的置換の採点は、例えばプログラムPC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, California)にインプリメントされるようにして、計算される。

【0069】

本明細書中で使用される場合、「配列同一性の割合(percentage of sequence identity)」は、比較窓上に最適に位置合わせされた2つの配列を比較することによって決定された値を意味し、2つの配列の最適位置合わせに対して参照配列(付加または欠失を含まない)と比べて、比較窓内のポリヌクレオチド配列の一部が付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含むものであってもよい。上記割合は、一致した位置の数を求めるために、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列で生ずる位置の数を測定し、比較窓内の位置の全数で一致した位置の数を割り、結果に対して100を掛けることで配列同一性の割合を求めることによって、計算される。

【0070】

特定の増幅プライマー対を用いた標的核酸配列の増幅(例えば、PCRによる)に関して、「ストリンジентな条件(stringent conditions)」は、プライマー対が標的核酸配列のみにハイブリダイズすることを可能とする条件であり、その

標的核酸配列に、対応の野生型配列（またはその相補体）を持つプライマーが結合し、好ましくは固有の増幅産物である単位複製配列をDNA熱増幅反応で生ずる。

【0071】

「（標的配列に対して）特異的な（specific for a target sequence）」という表現は、プローブまたはプライマーがストリンジентなハイブリダイゼーション条件で、標的配列を含むサンプル中でその標的配列のみとハイブリダイズすることを示す。

【0072】

本明細書中で使用される場合、「増幅DNA（amplified DNA）または「単位複製配列（amplicon）」とは、核酸テンプレートの一部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、交配の結果生ずる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イベントゲノムDNAを含むかどうかを決定するために、トウモロコシ植物組織サンプルから抽出したDNAを、DNAプライマー対を用いた核酸増幅法にさらしてもよく、該DNAプライマー対は、異質挿入DNAの挿入部位に隣接した隣接配列に由来する第1のプライマーと、DNAイベントの存在によって特徴的な単位複製配列を生成するための異質挿入DNAに由来する第2のプライマーとを含む。あるいは、第2のプライマーが隣接配列に由来するものであってもよい。単位複製配列は一定の長さで、上記イベントに特徴的でもある配列を有する。単位複製配列の長さは、プライマー対とヌクレオチド塩基対とを組み合わせた長さから、DNA増幅プロトコルによって生産可能な任意の長さの単位複製配列に至るまでの範囲であってもよい。あるいは、プライマー対は、図1に示すように、約6.2 kbの大きさであるPHI8999A発現構築物の挿入ヌクレオチド配列全体を含む単位複製配列を生成するようにして、挿入DNAの両側で、隣接配列に由来することができる。隣接配列に由来するプライマー対の一つの構成要素を、挿入DNA配列から離間して配置してもよく、この離間距離は1塩基対から増幅反応の限界までの範囲、あるいは約20,000塩基対とすることができる。「単位複製配列」という用語の使用は、DNA熱増幅反応で形成され得るプライマー二量体を特異的に排除する。

【0073】

核酸増幅は、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を含む当技術分野で公知の種々の核酸増幅法のいずれかによって達成し得る。種々の増幅法が当技術分野で公知であり、また記載されており、とりわけ米国特許第4,683,195号および第4,683,202号に記載され、またPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innisら, Academic press, San Diego, 1990に記載されている。PCR増幅方法は、最大で22 kbのゲノムDNAならびに最大で42 kbのバクテリオファージDNAを増幅するために、開発された（Chengら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994）。DNA増幅の技術分野で知られている他の方法と同様に、それらの方法を本発明が実施される際に用いることが可能である。特定のPCRプロトコルのいくつかのパラメーターを特定の実験室条件に調整することが必要であり、またわずかに修飾することも可能であり、さらに同様の結果を収集することが可能である。これらの調整は、当業者にとって明らかである。

【0074】

これらの方法によって生産される単位複製配列は、複数の技術によって検出することが可能であり、該技術として、限定されるものではないが、隣接する隣接DNA配列および挿入DNA配列の両方とオーバーラップするようにDNAオリゴヌクレオチドが設計されるGenetic Bit Analysis（Nikforovら, Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994）が挙げられる。オリゴヌクレオチドは、マイクロウエルプレートのウエル内に固定される。目的とする領域のPCR（挿入配列に1つのプライマーを用い、隣接する隣接領域にも1つ用いる）をおこなった後、単鎖PCR産物を固定化オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズする

ことができ、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を用いる単一塩基伸長反応のテンプレートとしての役割を果たす。読み出しは、蛍光またはELISAをベースとすることが可能である。シグナルは、成功裏になされる増幅、ハイブリダイゼーション、および単一塩基伸長による挿入/隣接配列の存在を示す。

【0075】

別の検出方法は、Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000) に記載されているピロ塩基決定法である。この方法では、隣接DNAおよび挿入DNA連結にかさなるオリゴヌクレオチドが設計されている。オリゴヌクレオチドは、目的とする領域に由来する単鎖PCR産物(挿入配列にプライマーが一つあり、隣接配列にプライマーが1つある)にハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼ、ATP、スルフリラーゼ、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で、インキュベートされる。ddNTPは個々に添加され、その取り込みは、測定される光シグナルを生ずる。光シグナルは、成功裏になされる増幅、ハイブリダイゼーション、および単一または多重塩基伸長による導入遺伝子挿入/隣接配列の存在を示す。

【0076】

Chenら (Genome Res. 9: 492-498, 1999) に記載されたような蛍光偏光は、本発明の単位複製配列を検出するために用い得る方法である。この方法を用いることで、隣接および挿入DNA連結に重なるオリゴヌクレオチドが設計される。オリゴヌクレオチドは、目的とする領域に由来する単鎖PCR産物(挿入DNA配列にプライマーが一つあり、隣接DNA配列にプライマーが1つある)にハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼおよび蛍光標識 ddNTPの存在下でインキュベートされる。単一塩基伸長は、ddNTPの取り込みをもたらす。取り込みは、蛍光光度計を用いた偏光の変化として測定することができる。偏光の変化は、成功裏になされる増幅、ハイブリダイゼーション、および単一塩基伸長による導入遺伝子挿入/隣接配列の存在を示す。

【0077】

Taqman (登録商標) (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) は、DNA配列の存在を検出および定量するための方法として記載されており、製造元によって提供される指示書で完全に理解される。手短に言うと、隣接および挿入DNA連結に重なるFRETオリゴヌクレオチドプローブが設計される。FRETプローブおよびPCRプライマー(挿入DNA配列にプライマーが一つあり、隣接ゲノム配列にプライマーが1つある)が耐熱性ポリメラーゼおよびddNTP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は、FRETプローブ上で消光部分から離れて、切断と蛍光部分の放出とに帰着する。蛍光シグナルは、成功裏になされる増幅とハイブリダイゼーションとによる隣接/導入遺伝子挿入配列の存在を示す。

【0078】

分子指標は、Tyangira (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996) に記載されたように、配列検出で使用するために記載されている。手短に言うと、隣接および挿入DNA連結に重なるFRETオリゴヌクレオチドプローブが設計される。FRETプローブの固有の構造により、接近状態でも蛍光および消光部分の2次構造を保持する。FRETプローブおよびPCRプライマー(挿入DNA配列にプライマーが一つあり、隣接配列にプライマーが1つある)が耐熱性ポリメラーゼおよびddNTPの存在下で、循環される。成功裏になされるPCR増幅の後、FRETプローブと標的配列とのハイブリダイゼーションは、プローブの2次構造の除去をもたらす。蛍光および消光部分の空間的分離をもたらす。蛍光シグナルが生ずる。蛍光シグナルは、成功裏になされる増幅およびハイブリダイゼーションによる隣接/導入遺伝子挿入配列の存在を示す。

【0079】

アンプリコン内で見いだされる配列に対して特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーション反応は、単位複製配列がPCR反応によって生ずることを検出するために用いられるさらに別の方法である。

【0080】

本発明は、以下の実施例によってさらに定義される。発明の好ましい実施形態を示す一方で、これらの実施例が説明することのみを目的として与えられることが理解されなければならない。上記の考察とこれらの例から、当業者は、本発明の必須特性を確認することができ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、それをさまざまな用途および状況に適應させるために、発明の種々の変更および修飾をおこなうことができる。このように、発明の種々の変形は、本明細書に例示および記載したものに加えて、前述の説明から当業者にとって明らかである。そのような変形は、添付の請求の範囲の範囲内にあることも意図している。

【0081】

本明細書中に述べられた前述の参照の各々の開示は、全体として本明細書に援用される。

【実施例】

【0082】

(実施例1. 粒子衝突によるトウモロコシの形質転換とCry1F遺伝子含有トランスジェニック植物の再生)

PHI8999Aと表された6.2kbのDNA分子(図1参照、配列番号25)は、アグロバクテリウムチュメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)から単離した3'ORF25転写終結因子(Barkerら(1983) *Plant Mol. Biol.* 2:335-350)を含むDNA分子に作用自在に結合したCry1Fと同定されたバチルスチューリングシス(*Bacillus thuringiensis*)の__-エンドトキシンをコードするDNA分子(米国特許第5,188,960号および6,218,188号)に作用自在に結合したトウモロコシウビキチン(Ubni-1)遺伝子(Christensenら(1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689およびChristensen and Quail(1996) *Transgenic Res.* 5:213-218)のプロモーター、5'非翻訳エクソン、および第1のイントロンを含む第1の導入遺伝子発現カセットと、(CaMV)35S由来の3'転写終結因子(Mitsuharaら(1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59)を含むDNA分子に作用自在に結合した選択可能なマーカーであるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)遺伝子(Wohlleben W.ら(1988) *Gene* 70:25-37)をコードするDNA分子に作用自在に結合したカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35プロモーター(Odell J. T.ら(1985) *Nature* 313:810-812; Mitsuharaら(1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59)のDNA分子を含む第2の導入遺伝子発現カセットとを有し、トウモロコシ胚組織を形質転換するために用いられた。

【0083】

B.t Cry1Fトウモロコシ植物は、基本的にKleinら(1987) *Nature*, UK 327(6117):70-73に記載されているように、Bio-Rad、Hercules、CAが製造したBiolistics(登録商標)PDS-100He粒子ガンを用いた微小発射体ボンバードメントを用いて得た。受粉直後に収穫したトウモロコシ穂から単離した未成熟胚を数日間にわたってカルス誘導培地で培養した。形質転換の日に、タングステン微粒子を精製PHI8999DNA(配列番号25)で被覆して培養胚へ加速させ、挿入DNAが細胞染色体へ取り込まれた。挿入PHI8999Aのみが形質転換の過程で使用され、形質転換体へのさらなるプラスミドDNAの取り込みは起こらなかった。ボンバードメント後、選択剤としてグルフォシネートを含むカルス誘導培地に胚を移した。培養中、個々の胚を物理的に分けておいたところ、外植体の大部分がその選択培地上で死滅した。

【0084】

生き残って正常なグルフォシネート耐性カルス組織を生産する胚に対して、推定上の形

質転換イベントを表す固有の識別コードを割り当て、新鮮な選択培地に連続して移した。各々の固有のイベントに由来する組織から植物を再生させ、該植物を温室に移した。分子学的分析をおこなうために葉サンプルを採取し、PCRによる導入遺伝子の有無の確認およびELISAによるCry1Fタンパク質の発現について確認をおこなった。次に、植物を、アワノメイガ昆虫を用いた全植物バイオアッセイに供した。陽性の植物を近交系とかけ合わせて、最初の形質転換植物から種子を得た。この分野で多数の系統を評価した。イベントTC1507を、昆虫抵抗性および農学的特性等の優れた特徴の組み合わせに基づいた、独立した遺伝子組み換えイベントの母集団から選択した(Bing J Wら(2000) Efficacy of Cry1F Transgenic Maize、14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop、fort Collins、Co.を見よ。なお、この文献を本明細書で援用する)。

【0085】

(実施例2. パチルスチューリングシス(Bacillus thuringiensis) Cry1F トウモロコシTC1507系統の遺伝子組換え挿入DNAに対して5'側の隣接配列を含むヌクレオチドの同定)

イベントTC1507内のPHI899A挿入に対して5'側の配列を含んだDNA断片を同定するために、イベントTC1507ゲノムDNA由来のSpeI制限酵素断片をアガロースゲル上でサイズ選択、精製、およびサザン分析によるスクリーニングをおこなうことで、Cry1Fプローブに対するハイブリダイゼーションを確認した。エンリッチされたサイズ選択プラスミド系ゲノムDNAライブラリーを調製するために、ハイブリダイゼーションおよび断片サイズの確認後、目的とする断片をpBluescript IISK(+)(商標)クローニングベクターにクローニングした。Cry1F遺伝子の一部に相同なプローブを用いて、陽性クローンに対するプラスミドライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンを同定し、新たなスクリーニングによって精製し、さらにCry1Fプローブにハイブリダイズした場合に陽性シグナルをもたらすかを確認した。単離された陽性クローンに含まれるSpeI断片のおよそ3kbを、プライマーウオーキングアプローチを用いて、シーケンシングをおこなった。第1のシーケンシングを開始させるために、クローニングベクターDNA内の既知の配列に結合するプライマーを設計して目的とするDNAの一部をシーケンシングした。逆方向に配向した別のプライマーを用いた同一領域にわたる第2のシーケンシングの実行は、第2の鎖の範囲(カバリッジ)を与えた。プライマーウオーキングは、先行する実行から得た配列データを繰り返し用いて、新規のプライマー(このプライマーは、次に、トウモロコシのイベントTC1507の挿入遺伝子組換えDNAに対して5'側の隣接領域が得られるまで、目的とするDNAまでさらにシーケンシングの次のラウンドを伸ばすために用いられる)を設計することによって達成された。具体的な配列情報を実施例4に示す。

【0086】

(実施例3. B.t. Cry1FトウモロコシTC1507系統挿入に対して5'側の隣接配列の確認)

B.t. Cry1FトウモロコシTC1507系統挿入の5'隣接配列を確認するために、PCRプライマー対を設計して5'隣接領域から完全長PHI8999A遺伝子組換え挿入に延びる重複PCR産物を得た。PCR産物を成功裏にB.t. Cry1FトウモロコシTC1507系統ゲノムDNAから増幅し、単離し、表1に示すように領域1から領域6までのシーケンシングをおこない、実施例2に記載したSpeI断片由来の既に決定された配列と一致するか確認した。しかし、完全長挿入の開始に対して直に隣接し、かつ5'側である2358bpから2829bpまでの領域は、PCR増幅にとっては扱いにくく、上記したSpeIクローンから得た配列よりも大きいことがわかった。この領域に隣接するプライマー対とAdvantage(登録商標)-GC2 Polymerase Mix (BD Biosciences Clontech、Palo Alto、Calif.)の使用は、シーケンシングのためのB.t. Cry1Fトウモロ

コシTC1507系統ゲノムDNA由来のPCR産物の増幅では成功裏になされた。Advantage (登録商標) - GC2システムによる単位複製配列の生産に用いられる増幅条件を表10に示す。2358bpないし2829bpの領域にある配列を確認するために用いられるDNAプライマー対は、配列番号1および配列番号2ならびに配列番号2および配列番号23に挙げられたものである。この領域の配列を表1に記載する(領域7a、7b、および8)。

【0087】

(実施例4. イベントTC1507の5'隣接配列。各々の領域を表1に記述する)
(領域1(配列番号28) トウモロコシゲノム(有意な相同性なし))

【数1】

```

1  ACTAGTTTCC TAGCCCGCGT CGTGCCCCTA CCCACCGAC
   GTTTATGGAA
51  GGTGCCATTC CACGGTCTT CGTGGCCGCC CCTAAGGATG
   TAAATGGTCG
101 GTAAAATCCG GTAAATTTCC GGTACCGTTT ACCAGATTTT
   TCCAGCCGTT
151 TTCGGATTTA TCGGGATATA CAGAAAACGA GACGGAAACG
   GAATAGGTTT
201 TTTTTCGAAA ACGGTACGGT AAACGGTGAG ACAAACTTAC
   CGTCCGTTTT
251 CGTATTTCTC GGGAAACTCT GGTATATTCC CGTATTTGTC
   CCGTATTTTC
301 CCGACCCACG GACCTGCCAA TCAACCATCA GCCAGTCAGC
   CCATCCCCAC
351 AGCTATGGCC CATGGGGCCA TGTTGGCCAC ATGCCACGC
   AACGCAAGGC
401 AGTAAGGCTG GCAGCCTGGC ACGCATTGAC GCATGTGGAC
   ACACACAGCC
451 GCCGCCTGTT CGTGTTTCTG TGCCGTTGTG CGAGACTGTG
   ACTGCGAGTG
501 GCGGAGTCGG CGAACGGCGA GCGTCTCCG GAGTCTGGAC
   TGCGGCTGTG
551 GACAGCGACG CTGTGACGGC GACTCGGCGA AGCCCCAAGC
   TACCAAGCCC
601 CCAAGTCCCC ATCCATCTCT GCTTCTCTGG TCATCTCCTT
   CCCCTGGTCG
651 ATCTGCAGGC GCCAGACCG

```

(領域2(配列番号29) 記述されていないトウモロコシゲノム配列(相補体))

【数2】

```

670 G CCGAAGCATC ACGAAACGCA CTAAGACCTC
701 GAAGGAGTCA AACTACTCCT CCGAGGCCTC GGGGGCTACA
   CCCGGCGGGT
751 GCGCTCGCGC GCACCCACCG GAACAAAATG TAACCGAGAA
   AGGTCGGTCC
801 CCTTGCAAAA AAAGTGCAC AAAAGCCTCC AAGCGAGTAT
   TAACACTCAC
851 TTTGAGGCTC GGGGGCTAC

```

(領域3(配列番号30) トウモロコシHucK-1レトロトランスポソンの断片)

【数3】

870 T GTCGGGGACC ATAATTAGGG GTACCCCAA
 901 GACTCCTAAT CTCAGCTGGT AACCCCATC AGCACAAAGC
 TGCAAAGGCC
 951 TGATGGGTGC GATTAAGTCA AGGCTCGGTC CACTCAAGGG
 ACACGATCTC
 1001 GCCTCGCCCG AGCCAGCCT CGGGCAAGGG CGGCCGACCC
 CGAGGATTCA
 1051 CGTCTCGCCC GAGGGCCCC TCAAGCGACG GGCACACCTT
 CGGCTCGCCC
 1101 GAGGCCATT CTTCGCCGAG AAGCAACCTT GGCCAGATCG
 CCACACCGAC
 1151 CGACCGTATC GCAGGAGCAT TTAATGCGAG GATCGCCTGA
 CACCTTATCC
 1201 TGACGCGCGC TCTTCAGTCG ACAGAGCCGA AGTGACCGCA
 ATCACTTCGC
 1251 CGTCCACTG ACCGACCTGA CAAGAAGACA GCGCCGCCTG
 CGTCGCTCCG
 1301 ACTGCTGTGC CACTCGACAG AGTGAGGCTG ACAGCAGCCA
 AGTCCGGCCT
 1351 CGGGCGCCAT AGGAAGCTCC GCCTCGCCCG ACCCTAGGGC
 TCGGACTCGG
 1401 CCTCGGCTCC GGAAGACGAC GAACTACGCT TCGCCCGACC
 CCAGGGCTTG
 1451 GACTCAGCCT CGGCTCCGGA AGACGACGAA TTCCGCCTCG
 CCCGACCCCA
 1501 GGGCTCGGAC TCGGCCTCGG CTCCAGAAGA CGACGAACTC
 CGCCTCGCCC
 1551 GACCCAGGG CTCGGACTCA GCCTCGGCTC CGGAAGACGA
 CGAACTCCGC
 1601 CTCGCCGAC CCCAGGGCTC GGAATCAGCC TCGGCCTCAG
 ACGATGGTCT
 1651 CCGCCTCGCC CGACCCGGGG CTCGGACTCG A

(領域4 (配列番号31) cry1F 遺伝子のフラグメント)

【数4 - 1】

1682 CCTTTCTAT CGGACCTTGT
 1701 CAGATCCTGT CTTCGTCCGA GGAGGCTTTG GCAATCCTCA
 CTATGTAATC
 1751 GGTCTTAGGG GAGTGGCCTT TCAACAAACT GGTACGAATC
 ACACCCGCAC
 1801 ATTCAGGAAC TCCGGGACCA TTGACTCTCT AGATGAGATA
 CCACCTCAAG
 1851 ACAACAGCGG CGCACCTTGG AATGACTACT CCCATGTGCT
 GAATCATGTT
 1901 ACCTTTGTGC GCTGGCCAGG TGAGATCTCA GGTTCGACT
 CATGGAGAGC
 1951 ACCAATGTTC TCTTGGACGC ATCGTAGCGC TACCCCAACA
 AACACCATTG

【数4 - 2】

2001 ATCCAGAGAG AATCAC

(領域5 (配列番号32) 葉緑体 r p o c 2 遺伝子の断片)

【数5】

2017 TCAT TCTTCAAGAA CTGCATATCT TGCCGAGATC
 2051 CTCATCCCTA AAGGTAAGT ACAATAGTAT TATTGGAGTC
 GATACACAAC
 2101 TCACAAAAAA TACAAGAAGT CGACTAGGTG GATTGGTCCG
 AGTGAAGAGA
 2151 AAAAAAAGCC ATACAGAAGT CAAAATCTTT TCCGGAGATA
 TTCATTTTCC
 2201 TGAAGAGGCG GATAAGATAT TAGGTGGCAG TTTGATACCA
 CCAGAAAGAG
 2251 AAAAAAAGA TTCTAAGGAA TCAAAAAAAA GGAAAAATTG
 GGTTTATGTT
 2301 CAACGGAAAA AATTTCTCAA AAGCAAGGAA AAGTATT

(領域6 (配列番号33) トウモロコシ葉緑体または u b i Z M 1 (2) プロモーターの断片)

【数6】

2338 GTG GCTATTTATC
 2351 TATC

(ヌクレオチド2355~2358 (CGT) は領域6を領域7aに結合)
(領域7a (配列番号34) p a t 遺伝子の断片)

【数7】

2358 GCA GCTGATATGG CCGCGGTTTG TGATATCGTT AACCAATTACA
 2401 TTGAGACGTC TACAGTGAAC TTTAGGACAG AGCCACAAAC
 ACCACAAGAG
 2451 TGGATTGATG ATCTAGAGAG GTTGCAAGAT AGATACCCTT
 GGTTGGTTGC
 2501 TGAGGTTGAG GGTGTTGTGG CTGGTATTGC TTACGCTGGG
 CCCTGGAAGG
 2551 CTAGGAAC

(領域7b (配列番号35) p a t 遺伝子の断片 (相補体))

【数8】

2559 CC TCAACCTCAG CAACCAACCA ATGGTATCTA TCTTGCAACC
 2601 TCTCTAGATC ATCAATCCAC TCTTGTGGTG TTTGTGGCTC
 TGTCCTAAAG
 2651 TTCCTGTAG ACGTCTCAAT GTAATGGTTA ACGATATCAC AAACCG

(領域7c (配列番号36) c r y 1 遺伝子の断片 (相補体))

【数9】

2697 AGAG
 2701 AAGAGGGATC T

(領域8 (配列番号37) ポリリンカーの断片)

【数 10】

2712 CGAAGCTTC GGCCGGGGCC CATCGATATC CGCGGGCATG
 2751 CCTGCAGTGC AGCGTGACCC GGTCGTGCCC CTCTCTAGAG
 ATAATGAGCA
 2801 TTGCATGTCT AAGTTATAAA AAATTACCA

(領域 9 (配列番号 25) PHI8999A の完全長挿入)

(実施例 5 . トウモロコシのイベント TC1507 の挿入に対して 5' 側にある隣接配列の記述)

イベント TC1507 の 5' 隣接配列をさらに完全に説明するために、相同性検索を、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて、GenBank の公的データベース (リリース 122、2/01) に対しておこなった。BLAST プログラムは、配列類似性検索を実行し、未知の配列に対する相同性を同定する上で特に有用である。公的データベース検索に加えて、二つ一組の位置合わせを AlignX (Informax Inc., Bethesda, Md.) を用いて実行し、トウモロコシのイベント TC1507 の隣接配列と PHI8999A トランスジェニック挿入とのあいだの相同性について調べた。これらの相同性検索の結果を表 1 に示す。TC1507 の 5' 隣接配列に、挿入に対して最も遠い 5' 側の塩基 1 と、完全長 PHI8999A トランスジェニック挿入の開始点の塩基 2830 とによって番号がつけられている (図 1 参照)。同一 性パーセント の値は、分析した配列の長さにもわたる完全な一致の割合を示す。

【0088】

多くの場合、イベント TC1507 の 5' 隣接配列による類似性検索が、かなり高い同一率の値に基づいて 1 つの固有の配列との一致をもたらした。これらの配列は表 1 に同定されている。加えて、2 つ以上の既知の配列に対して高い類似性を持つ TC1507 の 5' DNA 隣接配列に 2 つの領域が存在する。領域 870 ~ 1681 および 2338 ~ 2354 では、単一の一致 (ホモログ) が検出できない 両配列断片による同一性パーセント の得点が十分に高い。これらの領域の各々についての 2 つの可能性のあるホモログを表 1 に示す。

【0089】

非常に類似した配列が、配列の最初の 669 塩基対を除いて全てに関して同定された。一般に、類似性検索の結果は、塩基 1681 に対して 5' 側にあるトウモロコシゲノム配列との高い相同性を示している。塩基 1682 から 2830 位にある PHI8999A の開始点に至る領域は、形質転換イベントに関連したいくつかのフラグメントを含む。

【0090】

【表 1 - 1】

表1. イベントTC1507の挿入に関する配列のまとめ

領域	配列番号 24内での 位置	サイズ bp	同一性%	ホモログ	相同配列内 での位置	説明
1	1-669	669	N/A ¹	N/A	N/A	有意な相同性検出されず
2	670-869	200	90.5	AF123535	52432-52632 (相補体)	未記載のトウモロコシゲノム配列
領域	配列番号 24内での 位置	サイズ bp	同一性%	ホモログ	相同配列内 での位置	説明
3	870-1681	812	89.4	AF050439	1-801	トウモロコシHuck-1 レトロトランスポゾン5' LTR ² のフラグメント
			86.6	AF050438	1-797	トウモロコシHuck-1 レトロトランスポゾン3' LTRのフラグメント
4	1682- 2016	335	100.0	PHI8999A	3149-3483	cry1F遺伝子の フラグメント
5	2017- 2337	321	100.0	X86563	29429-29749	トウモロコシ葉緑体rpo C2遺伝子(RNAポリメ ラーゼβ-2サブユニッ ト)のフラグメント
6	2338- 2354	17	100.0	X86563	97643-97659	トウモロコシ葉緑体trn I遺伝子(tRNA-Ile)の フラグメント
			82.4	PHI8999A	182-197	トウモロコシubiZM1 (2)プロモーターの フラグメント
7a	2358- 2558	201	100.0	PHI8999A	5320-5475	pat遺伝子のフラグメン ト
7b	2559- 2696	138	99	PHI8999A	5336-5518 (相補体)	pat遺伝子のフラグメン ト
7c	2697- 2711	15	100.0	PHI8999A	2544-2558 (相補体)	cry1F遺伝子のフラグメ ント
8	2712- 2829	118	100.0	PHI8999A	36-153	ポリリンカー領域(36 ~80塩基)およびubiZ M1(2)プロモーター(8 1~153塩基)のフラグ メント
9	2830-	6186	100.0	PHI8999A	11-6196	全長挿入

【 0 0 9 1 】

【 表 1 - 2 】

	9015					of PHI8999A
10	9016-9565	550	100.0	PHI8999A	3906-4456 (相補体)	逆ORF25ターミネーター
11	9566-9693	128	100.0	NC_001666	121851-121978 (相補体) および 100759-100886	トウモロコシ葉緑体 rps12 rRNA (23SリボソームRNA) のフラグメント

領域	配列番号 24内での 位置	サイズ bp	同一性%	ホモログ	相同配列内 での位置	説明
12	9696-10087	392	99	NC_001666	17091-17483 (相補体)	トウモロコシ葉緑体ゲノムのフラグメント
13	10088-10275	188	99	PHI8999A	5333-5520 (相補体)	pat遺伝子のフラグメント
14	10278-10358	81	100	NC_001666	137122-137202 (相補体)	トウモロコシ葉緑体「ORF241」-仮想タンパク質遺伝子のフラグメント
15	10359-10612	254	N/A ¹	N/A	N/A	有意な相同性検出されず
16	10613-11361	749	N/A ¹	N/A	N/A	利用可能な記載なし

¹ N/A; 適用不可能

² LTR; 長い末端反復配列

(実施例6: 未修飾コントロールトウモロコシ系統内の領域1、2、および3の存在の確認)

トウモロコシ TC1507 を生成する形質転換について用いられる未修飾コントロールトウモロコシ系統に、イベント TC1507 の5' 隣接領域中の領域1、2、および3 (表1) が存在して、それによってトウモロコシゲノムDNAによって境界が示されるかどうかを判断するために、PCR分析を用いた。9通りの異なるPCR分析を、表3に示すプライマー配列を用いて表2に概説したように、TC1507 および未修飾コントロールトウモロコシ Hi-II 系統から調製したゲノムDNA上で実施した (Hi-II の情報については、Armstrong (1994) The Maize Handbook, ed. Freeling and Walbot, Springer-Verlag, New York, pp. 663-671 を参照せよ)。2つの反応が、25ないし324bpの5' 隣接領域の領域1内のDNA (反応A - 300bp 単位複製配列) と25ないし480bpの5' 隣接領域の領域1内のDNA (反応B - 456bp 単位複製配列) を増幅するように、設計された。予想される単位複製配列は、Hi-II 未修飾トウモロコシ系統およびトウモロコシのイベント TC1507 の両方に存在した。1つのPCRプライマー対、反応C、759ないし1182bpの5' 隣接領域 (424pb 単位複製配列) の領域2ないし領域3をスパン化し、Hi-II および TC1507 の両方で期待される大きさのPCR産物を再び生成した。反応D、415ないし1182bpの5' 隣接領域 (768pb 単位複製配列) の領域1ないし領域3をスパン化し、Hi-II および TC1507 の両方で期待される大きさのPCR産物を再び生成した。反応E および F は、TC1507 内の PHI8999A の完全長挿入の pat 遺伝子領域に対

する特異的プライマー対として設計されたことから、未修飾 $H i - I I$ トウモロコシ系統の単位複製配列は期待されない。結果は、E および F の反応が共に、 $p a t$ 遺伝領域によって形質転換されたトウモロコシ系統に対して特異的であり、期待される単位複製配列を生成し、その一方で未修飾 $H i - I I$ トウモロコシ系統では単位複製配列が生成されなかった。反応 G もまた、トウモロコシのイベント $T C 1 5 0 7$ で $3 6 6 b p$ の単位複製配列を生成し得るプライマー対として設計され、未修飾 $H i - I I$ トウモロコシ系統では単位複製配列の生成は見られなかった。

【 0 0 9 2 】

反応 H および I を、遺伝子組換え挿入の末端を 5' 隣接領域にスパン化し得る $T C 1 5 0 7$ に対する特異的プライマー対として設計した。反応 H および I の両方で、逆方向プライマーが完全長 $P H I 8 9 9 9 A$ 挿入 (表 1 の領域 9) のユビキチンプロモーター領域に配置され、順方向プライマーが領域 5、 $r p o C 2$ 遺伝子フラグメントに配置された (表 1 を参照)。反応 H および反応 I の両方は、トウモロコシ $T C 1 5 0 7$ 系統内で単位複製配列を生成し、未修飾コントロールトウモロコシ系統では単位複製配列を生成しなかった。これらの結果は、反応 H および I の両方が、イベント $T C 1 5 0 7$ に対して特異的であることを示す。

【 0 0 9 3 】

PCR 結果は、未記載の配列 (領域 1) が未修飾トウモロコシ系統 $H i - I I$ に存在し、領域 1、2、および 3 が未修飾トウモロコシ系統 $H i - I I$ に隣接していることを示す。反応 A、B、C、および D で増幅した DNA 配列は、トウモロコシのイベント $T C 1 5 0 7$ の 5' 隣接領域に特有ではなく、また未修飾トウモロコシ系統 $H i - I I$ にも存在している。

【 0 0 9 4 】

【 表 2 - 1 】

表 2. トウモロコシのイベント $T C 1 5 0 7$ における $P H I 8 9 9 9 A$ に対する 5' 配列、およびトウモロコシのイベント $T C 1 5 0 7$ における $P H I 8 9 9 9 A$ の全長挿入内の領域についての PCR 反応

反応	PCR 単位複製配列位置	単位複製配列サイズ (bp)	$T C 1 5 0 7$ 隣接配列または $P H I 8 9 9 9 A$ 挿入の領域	$H i - I I$ に存在する単位複製配列	トウモロコシ系統 $T C 1 5 0 7$ に存在する単位複製配列
A	$T C 1 5 0 7$ 隣接配列の 25~324bp	300	領域 1	あり	あり

【 0 0 9 5 】

【 表 2 - 2 】

	配列				
B	TC1507隣接配列の25~480bp	456	領域 1	あり	あり
反応	PCR単位複製配列位置	単位複製配列サイズ (bp)	TC1507隣接配列またはPHI8999A挿入の領域	Hi-IIIに存在する単位複製配列	トウモロコシ系統TC1507に存在する単位複製配列
C	TC1507隣接配列の759~1182bp	424	領域2~領域3 3	あり	あり
D	TC1507の5'隣接配列の415~1182bp	768	領域1~領域3	あり	あり
E TC1507にとって固有ではない	PHI8999Aの4750~5794bp	1045	領域9(pat遺伝子へのPHI8999A 35Sプロモーターの全長挿入において)	なし	あり
F TC1507にとって固有ではない	PHI8999Aの4827~5308bp	482	領域9(pat遺伝子へのPHI8999A 35Sプロモーターの全長挿入において)	なし	あり

【 0 0 9 6 】

【 表 2 - 3 】

反応	PCR単位複製配列位置	単位複製配列サイズ (bp)	TC1507隣接配列またはPHI8999A挿入の領域	Hi-IIIに存在する単位複製配列	トウモロコシ系統TC1507に存在する単位複製配列
G 5'隣接領域内のcry1Fフラグメントを検出	5'隣接領域内およびPHI8999Aの全長挿入内のcry1F配列	366	5'隣接配列内の335bp cry1F配列および全長挿入内の同一配列をスパン	なし	あり
H TC1507にとって固有	領域5(rpoC2遺伝子フラグメント)の2158bp～領域9(PHI8999Aの全長挿入)の3069bp	912	領域5～領域9 挿入イベントによって固有 [スパン固有連結領域]	なし	あり
I TC1507にとって固有	領域5(rpoC2遺伝子フラグメント)の2158bp～領域9(PHI8999Aの全長挿入)の3001bp	844	領域5～領域9 挿入イベントによって固有 [スパン固有連結領域]	なし	あり

【 0 0 9 7 】

【 表 3 - 1 】

表3. TC1507内のPHI8999Aに対する5'配列およびなトウモロコシのイベントTC1507中のPHI8999Aの全長挿入内の領域についてのPCRプライマー

反応	単位複製配列サイズ(bp)	プライマー対	プライマー配列 5'から3'
A	300	配列番号 10	CCCCTACCCACCGACGTTTAT
		配列番号 11	TTGATTGGCAGGTCCGTGGGTC
B	456	配列番号 10	CCCCTACCCACCGACGTTTAT
		配列番号 12	CACAACGGCACAGAAACACGAA
C	424	配列番号 13	GCGCACCCACCGGAACAAAATG
		配列番号 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
D	768	配列番号 15	CCTGGCACGCATTGACGCATGT
		配列番号 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
E	1045	配列番号 6	TAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGT
		配列番号 7	GAGCTGGCAACTCAAATCCCTTT
反応	単位複製配列サイズ(bp)	プライマー対	プライマー配列 5'から3'
F	482	配列番号 8	AAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGC

【 0 0 9 8 】

【 表 3 - 2 】

		配列番号 9	TAATCTCAACTGGTCTCCTCTCCGG
G	366	配列番号 19	GGCTCGGACTCGACCTTTCTAT
		配列番号 20	GCAGTTCTTGAAGAATGAGTGA
H	912	配列番号 1	GTAGTACTATAGATTATATTATTCGT AGAG
		配列番号 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCC GGAG
I	844	配列番号 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCC GGAG
		配列番号 23	CTTCAAACAAGTGTGACAAA

(実施例7. トウモロコシのイベントTC1507の挿入トランスジェニックDNAに対して3'側の隣接配列)

トウモロコシのイベントTC1507の完全長PHI8999A挿入に対して3'側の配列情報の長さを伸ばすのに、2通りの異なるPCRアプローチを用いた。第1のアプローチでは、PCRプライマー対を、完全長挿入と逆方向ORF25ターミネーターとのあいだの連結をスパン化した産物を増幅するように設計した。逆方向ORF25ターミネーターを示す図1を参照せよ。順方向プライマーを完全長PHI8999A挿入の末端に配置させ、一連の逆方向プライマーを逆方向配列に100bp間隔で配置させた。このようにして、トウモロコシのイベントTC1507に存在する逆方向断片の長さを、成功裏になされるPCR反応に基づいて100bp領域内に定めることができた。この方法は、ORF25ターミネーターの大部分を含むがCry1F配列は含まない逆方向断片を示した。この領域からPCR断片を単離してシーケンシングした。

【0099】

第2のアプローチでは、PCRプライマーを、上記したPCR実験で決定されたように、逆方向ORF25ターミネーター領域から隣接DNA配列に入るように設計した。2ないし3つの個々のイベントTC1507の植物と未修飾コントロールトウモロコシ系統とから単離したゲノムDNAを、種々の制限酵素を用いて消化し、その後、消化に用いた制限酵素に対して特異的なアダプターに結合させた(Universal Genome Walker (登録商標) Kit、Clontech Laboratories, Inc. およびDevonら(1995) Nucleic Acids Res. 23:1644-1645)。一次PCRをORF25ターミネーター特異的プライマーと消化DNAに結合したアダプター配列に対して相同なプライマーとを用いて実施した。反応の特異性を増すために、ネスト化した二次PCRを別のORF25ターミネーター特異的プライマーと一次PCRで使用した各々のプライマーに対して内側である第2のプライマーによりアダプター配列に対して相同な第2のプライマーとを用いて再び実施した。ネスト化PCRによって生産される産物を、アガロース電気泳動によって分析し、TC1507DNAサンプルに特有な断片を単離してシーケンシングした。断片を、完全長PHI8999A挿入の3'末端にある標的(逆方向)ORF25ターミネーターと完全長挿入内に含まれるORF25ターミネーターとの両方から、増幅した。完全長挿入由来の断片は、完全長挿入内に位置した既知の制限酵素部位に基づいた予測サイズであった。3'逆方向ORF25ターミネーターから作られた断片は、予想外のサイズの断片として現れた。3'逆方向ORF25ターミネーター由来の増幅断片の配列分析は、1043bpの隣接DNA配列をもたらした。上記一連のゲノムウォーキング実験から結果として得られる配列を用いて、挿入から2346bpの最終の3'隣接配列を持つボーダリングトウモロコシゲノムの中にウォーキングするためのさらなるプライマーを設計した。

【0100】

TC1507の3'隣接配列を記述するために、相同性検索を、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用いて、GenBank公共データベースに対して実施した。BLASTプログラムは、配列類似性検索を

実行し、特に未知の配列に対するホモログを同定する上で有用である。公共データベースを検索することに加えて、SeqMan 4.05 (商標)、Martinez and Needleman-Wunsch アラインメントアルゴリズム (DNASTAR Inc.) を用いて実行し、TC1507の3'隣接配列とPHI8999A トランスジェニック挿入とのあいだの相同性を調べた。これらの相同性検索の結果を表1に示す。同一性パーセントの値は、分析した配列の長さにわたる完全一致の割合を示す。3'隣接配列についての類似性検索の結果は、トウモロコシの葉緑体DNA、pat 遺伝子の188 bp フラグメント、および有意な相同性のない254 bp のDNA (領域15、表1)の3つの領域と高い相同性があることを示す。領域15 (表1)を超えたさらなる749 bp (領域16)についてもシーケンシングした。領域6について、類似した検索結果はなんら得られなかった。

【0101】

コントロールおよびTC1507ゲノムDNAに対するPCR分析により、254 bp 配列 (領域15、トウモロコシ葉緑体「ORF241」のフラグメント) がトウモロコシゲノムに存在することを決定した。3'隣接領域内の領域15のDNA配列は、トウモロコシのイベントTC1507の3'隣接領域に対して固有ではないが、未修飾コントロールトウモロコシ系統にも存在する。TC1507の3'隣接配列を実施例8に示すとともに、図1に図示する。

【0102】

(実施例8、トウモロコシイベントTC1507における完全長挿入DNAの末端に対して3'側の領域の配列。各々の領域の説明は表1にある)

(領域10 (配列番号38) ORF25ターミネーター (相補体) の断片)

【数11】

```

9016 CTCAC TCCGCTTGAT CTTGGCAAAG ATATTTGACG
9051 CATTATTAG TATGTGTAA TTTTCATTTG CAGTGCAGTA
      TTTTCTATTC
9101 GATCTTTATG TAATTCGTTA CAATTAATAA ATATTCAAAT
      CAGATTATTG
9151 ACTGTCATTT GTATCAAATC GTGTTTAATG GATATTTTTA
      TTATAATATT
9201 GATGATATCT CAATCAAAC GTAGATAATA ATAATATTTA
      TTTAATATTT
9251 TTGCGTCGCA CAGTGAAAAT CTATATGAGA TTACAAAATA
      CCGACAACAT
9301 TATTTAAGAA ACATAGACAT TAACCCTGAG ACTGTTGGAC
      ATCAACGGGT
9351 AGATTCCTTC ATGCATAGCA CCTCATTCTT GGGGACAAAA
      GCACGGTTTG
9401 GCCGTTCCAT TGCTGCACGA ACGAGCTTTG CTATATCCTC
      GGGTTGGATC
9451 ATCTCATCAG GTCCAATCAA ATTTGTCCA GAACTCATGT
      TAGTCGCAAC
9501 GAAACCGGGG CATATGTCGG GTATCTCGAG CTCGCGAAAG
      CTTGGCTGCA
9551 GGTTCGACGGA TCCTT

```

(領域11 (配列番号39) トウモロコシ葉緑体 rps12 rRNA 遺伝子の断片)

【数12】

9566 CAACA AAAGGGTACC TGTACCCGAA ACCGACACAG
 9601 GTGGGTAGGT AGAGAATACC TAGGGGCGCG AGACAACCTCT
 CTCTAAGGAA
 9651 CTCGGCAAAA TAGCCCCGTA ACTTCGGGAG AAGGGGTGCC CCC

(ヌクレオチド9694~9695(CG)が領域11と領域12とを結合する)
 (領域12(配列番号40) トウモロコシ葉緑体ゲノムの断片)

【数13-1】

9696 CTAAC
 9701 AATAAACGAA TACGGTTTAT GTATGGATTG CGGTAAAATA
 CCGGTACTCG
 9751 ATTTTCATAAG AGTCGAATAG GAAGTTAAGA TGAGGGTGGT
 ATCATCATAA
 9801 AAATGGAGTA GTATCCTAAA TTATACTAAT CCACGTATGA
 TATGTATGCC
 9851 TTTCCTTATC AACCGGAAGT AGTGCAAAAA AAATTCTATA
 CTGCACTGCT
 9901 CTCTTTTAC TGAGAAATGC AAAAAAATAA AAGTGAAGTA
 AGGGTGCCCC

【数13-2】

9951 ATAGATATTT GATCTTGCCT CCTGTCCCCC CCCCCCTTTT
 TTCATCAAAA
 10001 ATTTCCATGA AAAAAGAAAA GATGAATTTG TCCATTCATT
 GAACCCTAGT
 10051 TCGGGACTGA CGGGGCTCGA ACCCGCAGCT TCCGCCT

(領域13(配列番号41) pat 遺伝子の断片(相補体))

【数14】

10088 GTT CCTAGCCTTC
 10101 CAGGGCCCAG CGTAAGCAAT ACCAGCCACA GCACCCTCAA
 CCTCAGCAAC
 10151 CAACCAAGGG TATCTATCTT GCAACCTCTC TAGATCATCA
 ATCCACTCTT
 10201 GTGGTGTGTTG TGGCTCTGTC CTAAAGTTCA CTGTAGACGT
 CTCAATGTAA
 10251 TGGTTAACGA TATCACAAAC CGCGG

(ヌクレオチド10276~10277(AA)が領域13と領域14とを結合する)
 (領域14(配列番号42) トウモロコシ葉緑体ORF241(相補体)の断片)

【数15】

10278 CAC AAGAACGAAA GCACCTTTTC
 10301 ATTCCTTCAT ATACTAGGGG TTTTACTTG GAAAAGACAA
 TGTTCCATAC
 10351 TAAAGGAT

(領域15(配列番号43) トウモロコシゲノム(有意な相同性なし))

【数16】

10359 AG CTGCAGAAGC CGCCACCGTC TTGAGGACCT TCCGGGGAGC
 10401 CAGACCGGTC GAACCGTGCC TCCACTTGCT AAGGAGAAAG
 GGAAAATCAG
 10451 GGCCAGGACA TACGAAGGAG GAGCCAGAAC GAAGATATCC
 TAAGATACTT
 10501 ACTCGCTCCG GGCCATGATC AATCATGCCT GTGGGGAGGT
 CTCTCGCACC
 10551 TCGATCCATG AAGGTACCAC CGAGGTCTGC CCCGCCGCCG
 GCTTCGGTAC
 10601 CGTCCTCGCC TT

(領域 1 6 (配列番号 4 4) トウモロコシゲノム)

【数 1 7 - 1】

10613 GGGCGCCC GAGGCACCCG GGGGATGGAC TGCCCAGGCG
 10651 CAGCCACGAC GACCCAAGGA TCACCCTCCT GCGCAGTCGG
 CACGAGCAAT
 10701 AGTTCTCGGG GAACAGGCAG CTTGGCCTGA CTCCCCGGGG
 TCACCTCAAC
 10751 TACCTCGGCC GAGGGGTCAA GTACCCCTC AGTCCGCCCC
 CGCTCTTCGG
 10801 ACCGGGACCC CGACGTCCCG GCCCCGGATA CCGACGGCAC
 CAGCCCGCTC

【数 1 7 - 2】

10851 GGGGGCTGGC TTGACGACCC CTGGCCCAGC CTCAGATCTG
 GGCTGAGGCC
 10901 GAGGCAGGCG GCCATGTCGT CGTCTTCATC ATCGTCTTCA
 TCATCGTCGT
 10951 CGTCATCAGG CGTCTCCGGC GACGGCTCCC TTGGGAGCCC
 CTCCTCTCC
 11001 TGCCGACGAC GAAGCCTTTC CAAGGCATCC CGAGCCCACG
 TCCGCTCGTG
 11051 GGCCCGAGCC TTCTTTGCGT CCTTCTTCTC CTTCTCTTC
 TCCGCGGTGA
 11101 CCCTCCGCGC AGCTCGGTCC ACCGCATCCT CCGGGACTGG
 TGGCAGGGAA
 11151 GGCTTGATGAT GCCCTACCTC CTGGAGACAG ACGAAAAGTC
 TCAGCTATGA
 11201 GAACCGAGGG CAATCTGACG CAAGAAGGAA GAAGGAGCGG
 AACTCACCA
 11251 GAGACACGCA CCCGCGATCG GGACGCATTA AGGGCTGGGA
 AAAAGTGCCG
 11301 GCCTCTAATT TCGCTACCGT GCCGTCCACC CACCTGTGGA
 GGTCATCGAT
 11351 GGGAAGGGGA A

(実施例 9 . 未修飾コントロールトウモロコシ系統の領域 1 5 の存在の確認)

3'隣接配列の末端上の未記載の領域(表 1 の領域 1 5)が、トウモロコシのイベント TC 1 5 0 7 を生成するために形質転換で用いられる未修飾コントロールトウモロコシ系統に存在し、それによってトウモロコシゲノム DNA との境界が示されるかどうかを決定

するために、PCR分析が用いられる。トウモロコシTC1507系統と未修飾Hi-I Iコントロールトウモロコシ系統との両方における領域15の成功裏になされるPCR増幅によって、領域15が実際にトウモロコシゲノムDNAに存在することが明らかになった。5通りの異なるPCR分析を、表8に示すプライマー配列を用いて、トウモロコシTC1507系統と未修飾Hi-I Iコントロールトウモロコシ系統とから調製したゲノムDNA上で、以下の表7に概説したように、実施した。3'隣接領域の領域15内でのDNA増幅をおこなうために、3通りの反応を設計した。すなわち、反応L-175bp単位複製配列を生産、反応M-134bp単位複製配列を生産、さらに反応N-107bp単位複製配列を生産。予想される単位複製配列は、未修飾コントロールトウモロコシ系統とトウモロコシTC1507系統とのなかに存在した。反応JおよびKを、挿入の末端を3'隣接領域にスパン化し得るTC1507に対して特異的プライマー対として設計した。反応Jでは、順方向プライマーを、完全長PHI8999A挿入(表1の領域13)の3'末端上のpat遺伝子フラグメントに配置し、逆方向プライマーを未定義の領域15に配置した。反応Kでは、順方向プライマーを、完全長挿入の3'末端上の葉緑体と仮定するタンパク質遺伝子に配置した(表1の領域14)。また、逆方向プライマーを未定義の領域15に配置した。反応Jおよび反応Kの両方とも、トウモロコシ系統TC1507中で単位複製配列を生産したが、未修飾コントロールトウモロコシ系統では単位複製配列が生産されなかった。このような結果は、反応JおよびKの両方がイベントTC1507に対して特異的であることを示す。

【0103】

PCRは、TC1507の3'隣接配列の未記載の配列(領域15)もまた、未修飾Hi-I Iコントロールトウモロコシ系統由来の単離ゲノムDNA中に存在することを示す。反応L、M、およびNで増幅したDNA配列は、TC1507の3'隣接領域に対して固有ではないが、未修飾コントロールトウモロコシ系統にも存在する。

【0104】

【表4】

表7. トウモロコシイベントTC1507中のPHI8999A挿入に対する3'配列のPCR反応

反応	単位複製配列サイズ(bp)	TC1507の3'隣接配列の領域	コントロールに存在する単位複製配列	トウモロコシ系統TC1507に存在する単位複製配列
J	342	領域13(pat遺伝子フラグメント)~領域15	なし	あり
K	252	領域14(葉緑体遺伝子)~領域15	なし	あり
L	175	領域15	あり	あり
M	134	領域15	あり	あり
N	107	領域15	あり	あり

【0105】

【表5-1】

表8. トウモロコシイベントTC1507のPHI899A挿入に対する3'配列のPCRプライマー

反応	単位複製配列 サイズ(bp)	プライマー対	プライマー配列 5'から3'
J	342	配列番号 3	TGTGGTGTGGTGGCTCTGTCCT AA
		配列番号 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
K	252	配列番号 4	AGCACCTTTTCATTCTTTTCATAT AC
		配列番号 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC

【 0 1 0 6 】

【 表 5 - 2 】

L	175	配列番号 16	AAGCCGCCACCGTCTTGAGGAC CTT
		配列番号 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
M	134	配列番号 17	GTCGAACCGTGCCTCCACTTGC TAA
		配列番号 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
N	107	配列番号 18	AGAAAGGGAAAATCAGGGCCA GGAC
		配列番号 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC

(実施例10. PCRプライマー)

DNAイベント特異的プライマー対を用いて、TC1507に特徴的な単位複製配列を生成した。これらのイベントプライマー対として、限定されるものではないが、配列番号1および配列番号2、配列番号2および配列番号23、配列番号3および配列番号5、ならびに配列番号4および配列番号5が挙げられる。これらのプライマー対に加えて、DNA増幅反応で使用した場合にTC1507に対して特異的なDNA単位複製配列を作る配列番号26および配列番号27に由来する任意のプライマー対は、本発明の一面である。この分析のための増幅条件を表9に示すが、TC1507に特徴的な増幅DNA分子を生産するためのDNAプライマーまたはその相補体を用いたこれらの方法の任意の修飾は、当技術分野の通常技量の範囲内である。配列番号1、2、および23によって同定されるPCRプライマーを利用した反応のための好ましい増幅条件を表10に示す。また、内因性のトウモロコシ遺伝子の増幅のために、コントロールプライマー対(配列番号10および11、配列番号10および12、配列番号13および14、配列番号14および15、配列番号5および16、配列番号5および17、ならびに配列番号5および18を含む)を反応条件の内部基準として包含する。さらに含まれるものは、pat遺伝子を含むトランスジェニックイベントで単位複製配列を生産するプライマー対(配列番号6および7、配列番号8および9)とcry1F遺伝子を含むトランスジェニックイベントで単位複製配列を生産するプライマー対(配列番号19および20)とである。

【 0 1 0 7 】

TC1507イベントの存在について試験するための植物組織DNA抽出物の分析は、陽性の組織DNA抽出物コントロール(トランスジェニック配列を含むことが知られているDNAサンプル)を含むべきである。陽性コントロールの成功裏になされる増幅では、標的配列の増幅を可能とする条件下でPCRが実行される。陰性の、または野生型のDNA抽出物コントロールでは、提供されたテンプレートDNAが非トランスジェニック植物

から調製されたゲノムDNAもしくは非TC1507トランスジェニック植物のいずれかであり、これもまた含まれるべきである。さらに、テンプレートトウモロコシDNA抽出物を含まない陰性のコントロールは、PCRプロトコルで使用する試薬および条件の有用な基準である。

【0108】

十分な長さのさらなるDNAプライマー分子は、DNA増幅法の当業者によって、配列番号26および配列番号27から選択することができ、また表9または表10に示される方法とは異なると思われるが、イベントTC1507に特徴的な単位複製配列を生ずる単位複製配列の生産にとって最適化された条件を選択することができる。表9および表10に示した方法に対する修飾を伴うこれらのDNAプライマー配列の利用は、本発明の範囲内である。十分な長さの少なくとも1つのDNAプライマー分子が、TC1507イベントにとって特徴的な配列番号26および27に由来する単位複製配列は、本発明の一局面である。十分な長さの少なくとも1つのDNAプライマー分子が、TC1507イベントにとって特徴的なPHI8999Aの遺伝エレメントに由来する単位複製配列は、本発明の一局面である。TC1507単位複製配列のアッセイは、Stratagene Robocycler、MJ Engine、Perkin-Elmer 9700、またはEppendorf Mastercycler Gradient thermocyclerを用いて実施することができ、あるいは当業者に公知の方法および装置によって実施することができる。

【0109】

【表6-1】

表9. PCR条件：

条件：	
使用したキット:	Perkin-Elmer AmpliTAQ Gold キット
容量	成分
5 μ l	テンプレート(10 ng/ μ l)
4 μ l	2 μ l 各プライマー(10 μ M)
2 μ l	10X PCR Gold 緩衝剤
2 μ l	25 mM MgCl ₂
2 μ l	50X dNTP's (10 mM)
0.1 μ l	Amplitaq Gold ポリメラーゼ
4.9 μ l	H ₂ O
20 μ l	合計

【0110】

【表6-2】

サイクルパラメーター
GeneAmp® PCR System 9700

9分 92°C
30サイクル:
94°C 30秒
60°C 30秒
72°C 1分
7分 72°C
4°C 保持

【 0 1 1 1 】

【 表 7 】

表10. Advantage®-GC 2 ポリメラーゼミックスを用いて使用したPCR条件:

条件:	
使用したキット:	Advantage®-GC 2 ポリメラーゼミックス
容量	成分
5 µl	テンプレート (10 ng/µl)
5 µl	2.5 µl 各プライマー (10 µM)
10 µl	5x GC2 緩衝剤
10 µl	GC 融解 (1.0 M 最終濃度)
1.5 µl	50X dNTP's (10 mM)
1.0 µl	Advantage GC2 ポリメラーゼ
17.5 µl	H ₂ O
50 µl	合計

サイクルパラメーター
GeneAmp® PCR System 9700

5分 94°C
35サイクル:
94°C 1分
60°C 2分
72°C 3分
7分 72°C
4°C 保持

本発明の原理を例示および説明したが、本発明がそのような原理から逸脱することなく構成および詳細を改変することができることは当業者に容易に理解されなければならない。我々は、添付の請求の精神および範囲内である全ての修飾の権利を主張する。

【 0 1 1 2 】

この明細書で引用した全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具体的かつ個々に参照によって取り込まれることが示されるのと同程度に、本明細書で援用する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 3 】

【図 1】図 1 は、トランスジェニック挿入 P H I 8 9 9 9 Aとともに、そのトランスジェニック挿入に隣接する配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dow AgroSciences LLC
E. I. du Pont de Nemours and Company
Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Corn Event TC1507 and Methods for Detection Thereof

<130> F105U42B1B

<140> PCT/US2004/013538
<141> 2004-04-29

<150> US 60/467,772
<151> 2003-05-02

<160> 57

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 1
gtagtactat agattatatt attcgtagag 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 2
gccatacaga actcaaaaatc ttttccggag 30

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer designed for TC1507.

<400> 3

tggtggtgttt gttgctctgt cctaa

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer for TC1507.

<400> 4

agcacctttt cattctttca tatac

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Genomic DNA primer sequence

<400> 5

gacctcccca caggcatgat tgatc

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer in full length insert, 35S promoter to pat
gene

<400> 6

tagaggacct aacagaactc gccgt

25

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer in full length insert, 35S promoter to pat
gene

<400> 7

gagctggcaa ctcaaaatcc cttt 24

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer in full length insert, 35S promoter to pat
gene

<400> 8
aaaatcttcg tcaacatggt ggagc 25

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer in full length insert, 35S promoter to pat
gene

<400> 9
taatctcaac tggctcctc tccgg 25

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - Zea mays genomic DNA

<400> 10
cccctacccc accgacgttt at 22

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - Zea mays genomic DNA

<400> 11
ttgattggca ggtccgtggg tc 22

<210> 12
<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 12

cacaacggca cagaaacacg aa

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 13

gcgcacccac cggaacaaaa tg

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 14

tcctcgatt aaatgctcct gc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 15

cctggcacgc attgacgat gt

22

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 16
aagccgccac cgtcttgagg acctt 25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 17
gtcgaaccgt gcctccactt gctaa 25

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 18
agaaagggaa aatcagggcc aggac 25

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cry1F sequence primer

<400> 19
ggctcggact cgacctttct at 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cry1F sequence primer

<400> 20
gcagttcttg aagaatgagt ga 22

<210> 21

<211> 2829

<212> DNA

<213> 5' flanking sequence of event TC1507

<400> 21

```

actagtttcc tagcccgcgt cgtgcccta cccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatitcc 120
ggtaccgttt accagatitit tccagccgtt ttcggattta tccggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggittt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
ccgaccacag gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tgttgccac atgccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcatlgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tggcgttgtg 480
cgagactgtg actgaggtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
tgcggctgtg gacagcgac cgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcaccaccg gaacaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggctc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttagggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtaccccaaa 900
gactcctaat ctgagctggt aacccccatc agcacaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaaagtca aggtcggctc cactcaaggg acacgatctc gcctcggccc agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgacct cgaggattca cgtctcggcc gagggcccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggctcggcc gagccccatt ctctcggcag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgctga caccttatcc 1200
tgacgcgccc tcttcagctc acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgctg cgtcgtccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcggccc 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggtctg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc gcctcggccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggtc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcggc cgaccgggg ctcgactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt ctctcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttgagcgc atcgtagcgc 1980
taccaccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatact 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggctactg acaatagtat tattggagt gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactagggt gatgggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcatitctc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttagatacca ccagaaaagag aaaaaaaaaa ttctaaggaa tcaaaaaaaaa 2280
ggaaaaatg ggtttatgtt caacggaaaa aatitctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatattg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccttgaagg ctaggaacct tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg ttgtggctc 2640

```

tgcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
 aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatac cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagtataaaa 2820
 aaattacca 2829

<210> 22

<211> 2346

<212> DNA

<213> 3' flanking sequence of event TC1507

<400> 22

ctcaactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaattttc 60
 atttgcagtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
 caaatcagat tattgactgt catttgtatc aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180
 atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa ttttttgcg 240
 tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
 gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ccttcatgca tagcacctca 360
 ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgcata 420
 tcctcgggtt ggatcatctc atcaggcca atcaaatitg tccaagaact catgttagtc 480
 gcaacgaaac cggggcataat gtcgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggctg 540
 acggatcctt caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacaggtagg taggtagaga 600
 ataccaggg gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc 660
 gggagaaggg gtgcccccg ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggta 720
 aaataccggt actcgatttc ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggatcat 780
 cataaaaatg gagtagtata ctaaatata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc 840
 ttatcaaccg gaagtagtgc aaaaaaat ctatactgca ctgctctctt tttactgaga 900
 aatgcaaaaa aataaaaagt aagtaagggt gccccataga tatttgcatt tgcctcctgt 960
 ccccccccc ctttttcat caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat 1020
 tcattgaacc ctagtctcggg actgacgggg ctcgaaaccg cagcttccgc ctgttccatg 1080
 ccttccaggg ccagcgttaa gcaataccag ccacagcacc ctcaacctca gcaaccaacc 1140
 aagggtatct atcttgcaac ctctctagat catcaatcca ctcttgggt gtttgtggct 1200
 ctgtcctaaa gttcactgta gacgtctcaa tgtaatgggt aacgatatca caaacccgag 1260
 aacacaagaa cgaaagcacc ttttcatctt ttcataact aggggttttt acttggaaaa 1320
 gacaatgttc cactactaaag gatagctgca gaagccgcca ccgtcttgag gaccttccg 1380
 ggagccagac cgttgaacc gtgctccac ttgctaagga gaaagggaaa atcagggcca 1440
 ggacatacga aggaggagcc agaacgaaga tatcctaaga tacttactcg ctccgggcca 1500
 tgatcaatca tgcttggg gaggtctctc gcacctcgat ccatgaagg accaccgagg 1560
 tctgccccgc cgccggttc ggtaccgtcc tcgcttggg cgcccaggc acccggggga 1620
 tggactgccc aggcgcagcc acgacgacc aaggatcacc ctcttgcgca gtcggcacga 1680
 gcaatagttc tcggggaaca ggcagcttgg cctgactccc cggggtcacc tcaactacct 1740
 cggccgagg gtcaagtacc cctcagttc gccccgctc ttcggaccgg gaccccgagc 1800
 tcccggccc ggataccgac ggcaccagcc cgctcggggg ctggcttgac gacccctggc 1860
 ccagcctcag atctgggctg aggcgaggc aggcggccat gtcgtcgtct tcatcatcgt 1920
 ctcatcatc gtcgtctca tcaggctct cggcgacg ctcccttggg agccctccc 1980
 tctcctgccc acgacgaagc cttccaagg catcccagc ccacgtccgc tcgtgggccc 2040
 gagccttctt tgcgtccttc tctccttcc tcttctccgc ggtgacctc cgcgagctc 2100
 ggtccaccgc atctccggg acttggggca ggaaggctt gtgatgccct acctcctgga 2160
 gacagacgaa aagtctcagc tatgagaacc gagggcaatc tgacgcaaga aggaagaagg 2220
 agcggatact caccagagac acgcacccgc gatcgggacg cattaagggc tgggaaaaag 2280
 tgccggcctc taattctgct accgtgccgt ccaccacct gtggaggctc tcgatgggaa 2340

ggggaa

2346

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 23

cttcaaacia gtgtgacaaa

20

<210> 24

<211> 11361

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The sequence represents the transgenic insert in
maize line TC1507 as well as the sequence flanking
the insertion sites.

<400> 24

```

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatfff tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtfff cgtatfttctc gggaaactct ggtatatfcc cgtatftgfc ccgtatfttc 300
ccgaccacag gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tfttgccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgctgtt cgtgtftctg fgccgtftgtg 480
cgagactgtg actgagagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
tgcggctgtg gacagcgagc ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcaccaccg gaacaaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggfcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taaacctcac tftgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattagggt gtaaccccaa 900
gactccta atctcagctgtt aacccccatc agcacaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggtcggfcc cactcaagggt acacgatctc gcctcggccc agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgcgc gagggccccc tcaagcgagc 1080
ggcacacctt cggctcgcgc gaggcccat tctcgcggag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgctg cgtcgcctcg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcggccc 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggtctg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttcgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgcgc gaccccaggg 1560

```

ctcgactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgc cccagggtc 1620
 ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgctcgcg cgacccggg ctcggactcg 1680
 acctttctat cggaccttgt cagatcctgt ctctcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
 attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
 cgcaccttg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
 tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
 tacccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
 tgccgagatc ctcatcccta aaggctactg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
 tcacaaaaaa tacaagaagt cgactagggtg gatgggtccg agtgaagaga aaaaaagcc 2160
 atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
 taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
 ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
 gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgctgtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
 ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
 atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
 ctggtattgc ttacgtggg ccctggaagg ctaggaaacc tcaacctcag caaccaacca 2580
 atggtatcta tcttgaacc tctctagatc atcaatccac tcttgggtg tttgtggctc 2640
 tgcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
 aagagggatc tcgaagcttc gccggggcc catcgatcgc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgacc ggctgtgcc ctctctagag ataagagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
 aaattaccac aactggaaga gcggttacc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
 atccgctggc atgctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
 gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatitt tttgtcaca ctgtttgaa 3000
 gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
 tagtactaca ataatatcag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
 taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatcttt tagtgtgcat 3180
 gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
 tacatccatt tagggtttag ggttaatggt ttttatagac taatttttt agtacatcta 3300
 tttatttcta ttttagctc taaatgaaga aaactaaaac tctattttag ttttttatt 3360
 taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaataaac aaataccctt 3420
 taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttctgtttc gagtagataa tgccagcctg 3480
 ttaaaccgg tcgacgagtc taaccggacac caaccagcga accagcagcg tcgctcggg 3540
 ccaagcgaag cagacggcac ggcatctctg tcgctgccic tggaccctc tcgagagttc 3600
 cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgctggc ggagcggcag 3660
 acgtgagccg gcacggcagg cggcctctc ctctctcac ggacggcag ctacggggga 3720
 ttctttccc accgctcctt cgctttccct tctcggccg ccgtaataaa tagacacccc 3780
 ctccacacc tctttccca acctcgtgtt gttcggagcg cacacacaca caaccagatc 3840
 tccccaaat ccaccctcgc gcacctccgc ttcaaggtag gccctcgtc ctccccccc 3900
 cccctctct acctctcta gatcggcgtt ccggtccatg gttagggcc ggtagttcta 3960
 ctctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttctg 4020
 acacggatgc gacctgacg tcagacacgt tctgatgtc aacttggcag tgtttctctt 4080
 tggggaatcc tgggatggc cttagccgtc cgcagacggg atcgatttca tgattttttt 4140
 tgtttcgtt cataggttt ggtttgccct tttctttat ttcaatata gccgtgcaact 4200
 tgtttgtcgg gtcactttt catgctttt ttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt 4260
 tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctggtg gatattataa 4320
 ttttggatct gatgtgtgt gccatacata ttcatagtta cgaatgaag atgatggatg 4380
 gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgcgggt ttactgatg catatacaga 4440
 gatgctttt gttcgttgg ttgtgatgat gtggtgtggt tgggcggtcg ttcatctgtt 4500
 ctagatcggg gtagaatact gttcaaac acctggtgta tttattaatt ttggaactgt 4560

atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatctag 4620
gataggata catgttgatg tgggttttac tgatgcatat acatgatggc atatgcagca 4680
tctattcata tgccttaacc ttgagtacct atctattata ataaacaagt atgttttata 4740
attatittga tcttgatata ctggatgat ggcatatgca gcagctatat gtggatittt 4800
ttagccctgc ctcatacgc tatttatttg ctgggtactg tttctttgt cgatgctcac 4860
cctgttgttt ggtgttactt ctgcaggctg actctagagg atccaacaat ggagaacaac 4920
atacagaatc agtgcgtccc ctacaactgc ctcaacaatc ctgaagtaga gattctcaac 4980
gaagagaggt cgactggcag attgccgfta gacatctccc tgtcccttac acgtttcctg 5040
ttgtctgagt ttgttccagg tgtgggagtt gcgtttggcc tcttcgacct catctggggc 5100
ttcatcactc catctgatfg gagcctcttt ctctccaga ttgaacagtt gattgaacaa 5160
aggattgaga ccttgaaaag gaatcgggcc atcactacct ttcgtggctt agcagacagc 5220
tatgagatct acattgaagc actaagagag tgggaagcca atcctaacaa tgccaactg 5280
agagaagatg tgcgtatacg ctttgctaac acagatgatg ctttgatcac agccatcaac 5340
aactcacc ttaccagctt cgagatccct ctctctcgg tctatgttca agctgctaac 5400
ctgcacttgt cactactgcg cgacgctgtg tctgttgggc aagggtgggg actggacata 5460
gctactgtca acaatcacta caacagactc atcaatctga ttcactgata cacgaaacat 5520
tgtttggata cctacaatca gggattggag aacctgagag gtactaacac tgcccaatgg 5580
gccaggttca atcagttcag gagagacctt acacttactg tgttagacat agttgctctc 5640
tttccgaact acgatgttcg tacctatccg attcaaactg catccaact tacaaggag 5700
atctacacca gttcagtcct tgaagactct ccagtttctg cgaacatacc caatggtttc 5760
aacagggtg agtttggagt cagaccacc catctcatgg acttcatgaa ctctttgttt 5820
gtgactgcag agactgttag atcccaaact gtgtggggag gacacttagt tagctcacgc 5880
aacacggctg gcaatcgtat caactttcct agttacgggg tcttcaatcc cgggggccc 5940
atctggatfg cagatgaaga tccacgtcct ttctatcgga cctgtcaga tctgtcttc 6000
gtccgaggag gctttggcaa tctcactat gtactcggtc ttaggggagt ggctttcaa 6060
caaactggta cgaatcacac ccgcacatc aggaactccg ggaccattga ctctctagat 6120
gagataccac ctcaagacaa cagcggcgca ccttggaaatg actactccca tgtgctgaat 6180
catgttacct ttgtgcgctg gccaggtgag atctcaggtt ccgactcatg gagagacca 6240
atgttctctt ggacgcatcg tagcgtacc cccacaacaa ccatgatcc agagagaatc 6300
actcagattc ccttggtgaa ggcacacaca ctctcagtcag gaactacagt tgaagaggg 6360
ccgggttca cgggaggaga catcttctga cgcactagtg gaggaccatt cgcgtacacc 6420
attgtcaaca tcaatgggca acttcccaa aggtatcgtg ccaggatagc ctatgcctct 6480
actaccaatc taagaatcta cgttacggtt gcaggtgaac ggatctttgc tggtcagttc 6540
aacaagacaa tggataccgg tgatccactt acattccaat ctttctccta cgccactatc 6600
aacaccgctt cacctttcc aatgagccag agcagtttca cagtaggtgc tgataccttc 6660
agttcaggca acgaagtga cattgacagg tttagagttga ttccagttac tgccacactc 6720
gagtaaggat ccgtcgacct gcagccaagc tttcgcgagc tcgagatccc cgacatatgc 6780
cccggttctg ttgcgactaa catgagttct tggacaaat tgattggacc tgatgagatg 6840
atccaaccgg aggatatagc aaagctcgtt cgtgcagcaa tggaacggcc aaaccgtgct 6900
tttgtccca agaatgaggt gctatgcatg aaggaatcta cccgttgatg tccaacagtc 6960
tcagggttaa tgcctatgta tcttaataa tgttgtcggg attttghtaat ctcatataga 7020
ttttcactgt gcgacgcaaa aatattaaat aaatattatt attatctacg ttttgattga 7080
gatatcatca atattataat aaaaatatcc attaaacagc atttgataca aatgacagtc 7140
aataatctga tttgaatatt tattaattgt aacgaattac ataaagatcg aatagaaaaat 7200
actgcactgc aaatgaaaat taacacatac taataaatgc gtcaaatatc tttgccaaga 7260
tcaagcggag tgagggctc atatccggtc tcagttacaa gcacggtatc cccgaagcgc 7320
gtccaccaa tgccctcgac atagatgccg ggctcgacgc tgaggacatt gcctaccttg 7380
agcatggtct cagcgcgggc ttttaagctca atcccatccc aatctgaata tcctatcccg 7440
cgcccagtc gggtgaagaa cgggtctgtc catccacctc tgttgggaat tccggctccg 7500
gtcacctttg tccaccaaga tggaaactgc gccgcggacc gaattcccat ggagtcaaag 7560

attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaagactg gcgaacagtt catacagagt 7620
 ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tggtaggagca cgacacgctt 7680
 gtctactcca aaaaatacaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat tgagactttt 7740
 caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt 7800
 attgigaaga tagtggaaaa ggaaggtagc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga 7860
 aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtggtagcca aagatggacc cccacccacg 7920
 aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 7980
 gatatctcca ctgacgtaag gtagacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc 8040
 tctataaag gaagttcatt tcattingag aggacagggg acccggggat ccaccatgtc 8100
 tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatattg ccgaggtttg 8160
 tgatatcgtt aaccattaca ttgagacgct tacagtgaac tttaggacag agccacaaac 8220
 accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 8280
 tgaggttgag ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 8340
 ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtccat aggcatacaa ggttgggcct 8400
 aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaaggtt ttaagtctgt 8460
 ggttgcgttt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 8520
 cacagcccgg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttg 8580
 ttttggcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttacca 8640
 gatctgagtc gacctgcagg catgcccgt gaaatcacca gtctctctct acaaatctat 8700
 ctctctctat aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg aattaggggt ctatatagggt 8760
 ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt atttgtattt gtaaaatact 8820
 tctatcaata aaatttctaa ttccataaac caaaatccag tggcgagctc gaattcgagc 8880
 tcgagcccgg gtggatcctc tagagtcgac ctgcagaagc ttcggtccgg cgcgcctcta 8940
 gttgaagaca cgttcatgct ttcatcgtaa gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg 9000
 gcctaactca agcccctcac tccgcttgat ctggcaaaag atatttgacg catttattag 9060
 tatgtgttaa ttttcatttg cagtgagta ttttctattc gatctttatg taattcgtta 9120
 caattaataa atattcaaat cagattattg actgtcattt gtatcaaatc gtgtttaatg 9180
 gatattttta ttataatatt gatgatatct caatcaaac gtagataata ataataat 9240
 ttttaatttt ttgctcgca cagtgaanaa ctatatgaga ttacaaaata ccgacaacat 9300
 tattaagaa acatagacat taacctgag actgttgac atcaacgggt agattccttc 9360
 atgcatagca cctcattctt ggggacaaaa gcacggtttg gccgttccat tgcctgcacga 9420
 acgagctttg ctatatcctc gggttggatc atctcatcag gtccaatcaa atttgtccaa 9480
 gaactcatgt tagtcgcaac gaaaccgggg catatgtcgg gtatctcgag ctgcgaaag 9540
 ctggctgca ggtcgacgga tccctcaaca aaaggtacc tgtaccgaa accgacacag 9600
 gtggtaggt agagaatacc tagggcgcg agacaactct ctctaaggaa ctcgcaaaa 9660
 tagccccgta acttcgggag aaggggtgcc ccccgctaac aataaacgaa tacggtttat 9720
 gatggattc cggtaaaaata ccggtactcg atttcataag agtcgaatag gaagttaaga 9780
 tgagggtgg atcatcataa aaatggagta gtatcctaaa ttataactaat ccacgtatga 9840
 tatgtatgcc tttccttatc aaccggaagt agtgcaaaaa aaattctata ctgcactgct 9900
 ctctttttac tgagaaatgc aaaaaataa aagtgaagta aggtgcccc atagatattt 9960
 gatcttgcc cctgtcccc ccccccttt ttcatacaaaa atttccatga aaaaagaaaa 10020
 gatgaatttg tccattcatt gaaccttagt tcgggactga cggggctcga acccgcagct 10080
 tccgctgtt cctagccttc cagggccag cgtaaagcaat accagccaca gcacctca 10140
 cctcagcaac caaccaaggg tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt 10200
 gtgggtttg tggctctgtc ctaaagtca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga 10260
 tatcacaac cgcggaacac aagaacgaaa gcacctttc atctttcat atactagggg 10320
 tttttacttg gaaaagacaa tgttccatac taaaggatag ctgcagaagc cgccaccgtc 10380
 ttgaggacct tccggggagc cagaccggtc gaaccgtgcc tccacttgct aaggagaaag 10440
 ggaaaatcag ggccaggaca tacgaaggag gagccagaac gaagatatcc taagatactt 10500
 actcgtccg ggccatgatc aatcatgcct gtggggagggt ctctcgacc tcgatccatg 10560

```

aaggtaccac cgaggtctgc cccgccgccg gcttcggtac cgtcctcgcc ttgggcgccc 10620
gaggcaccg ggggatggac tgcccaggcg cagccacgac gacccaagga tcaccctcct 10680
gcgcagtcgg cacgagcaat agttctcggg gaacaggcag ctggcctga ctccccggg 10740
tcacctcaac tacctcggcc gaggggtcaa gtacccccctc agtccgcccc cgctcttcgg 10800
accgggacc cgacgtccc gccccggata ccgacggcac cagcccgtc gggggctggc 10860
ttgacgacc ctggcccagc ctcagatctg ggctgaggcc gaggcaggcg gccatgtcgt 10920
cgtcttcac atcgtcttca tcatcgtcgt cgtcatcagg cgtctccggc gacggctccc 10980
ttgggagccc ctccctctcc tgccgacgac gaagcctttc caaggcatcc cgagcccacg 11040
tccgctcgtg ggcccagacc ttctttgctt cttctcttc ctccctcttc tccgcggtga 11100
ccctccgcgc agctcggctc accgcatcct ccgggactgg tggcagggaa ggcttgtgat 11160
gccctacct ctggagacag acgaaaagt ctagctatga gaaccgagg caatctgacg 11220
caagaaggaa gaaggagcgg atactacca gagacacgca cccgcgatcg ggacgatta 11280
agggctggga aaaagtgccg gcctctaatt tcgctaccgt gccgtccacc cacctgtgga 11340
gtcatcgat gggaagggga a 11361

```

<210> 25

<211> 6186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The sequence represents the DNA molecule used to transform maize line TC1507. This sequence represents insert PHI8999A.

<400> 25

```

caactggaag agcggttacc cggaccgaag cttcggccgg ggcccatcga tatccgcggg 60
catgcctgca gtgcagcgtg acccggctgt gcccctctct agagataatg agcatgcat 120
gtctaagtta taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt 180
atctatcttt atacatata ttaaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac 240
aataatatca gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggc ctaaaggaca 300
attgagtatt ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc 360
tttttttttg caaatagctt cacctatata atacttcatc cattttatta gtacatccat 420
ttagggttta gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct attttatctt 480
at ttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctat tttta gtttttttat ttaataattt 540
agataaaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataacct ttaagaaatt 600
aaaaaaacta aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc 660
gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaagcgaa 720
gcgacggca cggcatctct gtcgctgcc ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc 780
gttgacttg ctccgctgtc ggcatccaga aatgctgtgg cggagcggca gacgtgagcc 840
ggcacggcag gcggctcct cctcctctca cggcacggca gctacggggg attcctttcc 900
caccgctcct tcgctttccc ttctcgtccc gccgtaataa atagacacc cctccacacc 960
ctctttccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat ctccccaaa 1020
tccaccgctc ggcaacctcg ctcaaggta cgcctcgt cctcccccc cccccctctc 1080
taccttctct agatcggcgt tccggtccat ggttagggcc cggtagttct acttctgttc 1140
atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgttag atccgtgctg ctacggttcg tacacggatg 1200
cgacctgtac gtcagacacg ttctgat tgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc 1260
ctgggatggc tctagccgtt ccgacagcgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt 1320

```

gcatagggtt tggtttggcc ttttccttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg 1380
ggcatccttt tcatgccttt ttttgtcttg gttgtgatga tgtggctcgg ttgggaggtc 1440
gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc 1500
tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg 1560
atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg tttfactgat gcatatacag agatgctttt 1620
tgttcgcttg gttgtgatga tgtgggtggg ttgggaggtc gttcatcgt tctagatcgg 1680
agtagaatac tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg 1740
tcatacatct tcatagttac gagtttaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggtat 1800
acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg cataatgcagc atctattcat 1860
atgctctaac cttagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg 1920
atcttgatat acttgatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt ttttagccctg 1980
ccttcatacg ctatttattt gcttggact gtttcttttg tcatgctca cctgttgtt 2040
tgggtttact tctgcaggtc gactctagag gatccaacaa tggagaacaa catacagaat 2100
cagtgctcc cctacaactg cctcaacaat cctgaagtag agattctcaa cgaagagagg 2160
tcgactggca gattgccgtt agacatctcc ctgtccctta cacgtttcct gttgtctgag 2220
ttgttccag gttgaggagt tgcgtttggc ctctcgacc tcatctgggg ctcatcact 2280
ccatctgatt ggagcctctt tcttctccag attgaacagt tgattgaaca aaggattgag 2340
accttgaaa ggaatcgggc catcactacc ctctgtggct tagcagacag ctatgagatc 2400
tacatgaag cactaagaga gtgggaagcc aatcctaaca atgcccaact gagagaagat 2460
gtgcttatac gctttgctaa cacagatgat gctttgatca cagccatcaa caacttcacc 2520
cttaccagct tcgagatccc tcttctctcg gtctatgttc aagctgctaa cctgcacttg 2580
tcactactgc gcgacgctgt gtcgtttggg caaggttggg gactggacat agctactgtc 2640
aacaatcact acaacagact catcaatctg attcacgat acacgaaaca ttgtttggat 2700
acctacaatc agggattgga gaacctgaga ggtactaaca ctcgccaatg ggccagggtc 2760
aatcagttca ggagagacct tacacttact gtgttagaca tagttgctct ctftccgaac 2820
tacgatgttc gtacctatcc gattcaaacg tcatccaac ttacaagga gatctacacc 2880
agttcagtca ttgaagactc tccagtttct gcgaacatac ccaatggttt caacagggct 2940
gagtttgag tcagaccacc ccatctcatg gacttcatga actctttgtt tgtgactgca 3000
gagactgtta gatcccaaac tgtgtgggga ggacacttag ttagctcacg caacacggct 3060
ggcaatcgta tcaacttcc tagttacggg gtcttcaatc ccgggggagc catctggatt 3120
gcagatgaag atccacgtcc tttctatcgg acctgtcag atcctgtctt cgtccgagga 3180
ggctttggca atcctcacta tgtactcggc cttaggggag tggcctttca acaaacgtt 3240
acgaatcaca cccgcacatt caggaactcc gggaccattg actctctaga tgagatacca 3300
cctcaagaca acagcggcgc accttggaaat gactactccc atgtgctgaa tcatgttacc 3360
tttgtcgcct ggccagggtga gatctcaggc tccgactcat ggagagcacc aatgttctct 3420
tggacgcatc gtagcgttac ccccacaaac accattgatc cagagagaat cactcagatt 3480
cccttggtga aggcacacac acttcagtca ggaactacag ttgtaagagg gccgggggtt 3540
acgggaggag acattcttcg acgcactagt ggaggacat tgcgtacac cattgtcaac 3600
atcaatgggc aacttcccca aaggatcgt gccaggatac gctatgcctc tactaccaat 3660
ctaagaatct acgttacggt tgcaggtgaa cggatctttg ctggtcagtt caacaagaca 3720
atggataccg gtgatccact tacattccaa tctttctcct acgccactat caacaccgag 3780
ttcacctttc caatgagcca gagcagtttc acagtaggtg ctgataacct cagttcaggc 3840
aacgaagtgt acattgacag gtttgagttg attcagttt ctgccacact cgagtaagga 3900
tccgtcgacc tgcagccaag ctfttcgaga gctcgagatc cccgacatat gccccggttt 3960
cgttgcgact aacatgagtt ctggacaaa ttgatggga cctgatgaga tgatccaacc 4020
cgaggatata gcaaagctcg ttcgtgcagc aatggaacgg ccaaaccgtg ctfttgtccc 4080
caagaatgag gtgctatgca tgaaggaatc taccgttga tgtccaacag tctcagggtt 4140
aatgtctatg tatctaaat aatgttgtcg gtattttgta atctcatata gattttact 4200
gtgagcagca aaaatatata ataaatata ttattatcta cgttttgatt gagatatcat 4260
caatatata ataaaaat ccatataaca cgatttgata caaatgacag tcaataatct 4320

gatttgaata tttattaatt gtaacgaatt acataaagat cgaatagaaa atactgcact 4380
 gcaaatgaaa attaacacat actaataaat gcgtcaaata tctttgccaa gatcaagcgg 4440
 agtgagggcc tcatatccgg tctcagttac aagcacggta tccccgaagc gcgctccacc 4500
 aatgccctcg acatagatgc cgggctcgac gctgaggaca ttgacctacct tgagcatggt 4560
 ctcagcgccg gctttaagct caatcccac ccaatctgaa tatcctatcc cgcgcccagt 4620
 ccggtgtaag aacgggtctg tccatccacc tctgttggga attccggtcc gggtcacctt 4680
 tgtccaccaa gatggaactg cggccgcgga ccgaattccc atggagtcaa agattcaaat 4740
 agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg 4800
 actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catgggtggag cacgacacgc ttgtctactc 4860
 caaaaaatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag 4920
 ggtaatatcc ggaaacctcc tccgattcca ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa 4980
 gatagtggaa aaggaagggt gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat 5040
 cgttgaagat gcctctgccg acagtggfcc caaagatgga cccccaccca cgaggagcat 5100
 cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc 5160
 cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata 5220
 aggaagtcca ttcatctgg agaggacagg gtaccggggg atccaccatg tctccggaga 5280
 ggagaccagt tgagattagg ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg 5340
 ttaaccatta cattgagacg tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag 5400
 agtggattga tgatctagag aggttgcaag atagataccc ttggttgggt gctgaggttg 5460
 aggggtgttg ggctggtatt gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt 5520
 ggacagttga gactactgtt tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcca 5580
 cattgtacac acatttgctt aagtcctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgcctg 5640
 ttataggcct tccaaacgat ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga tacacagccc 5700
 ggggtacatt gcgcgagct ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc 5760
 aaagggattt tgagttgcca gctcctccaa ggccagttag gccagttacc cagatctgag 5820
 tcgacctgca ggcatgccg tgaaatcacc agtctctctc taaaaatcta tctctctcta 5880
 taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt tcttataggg tttcgcctcat 5940
 gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat 6000
 aaaatftcta attcctaaaa ccaaaatcca gtggcgagct cgaattcgag ctcgagcccg 6060
 ggtggatcct ctagagtcga cctgcagaag cttcggtccg gcgcgccctc agttgaagac 6120
 acgttcatgt ctcatcgtg agaagacact cagtagtctt cggccagaat ggccctaactc 6180
 aaggcc 6186

<210> 26

<211> 3830

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence that represents part of the PH18999A
 insert as well as flanking sequence 5' to the
 insert.

<400> 26

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggctg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
 ggtaccgttt accagatftt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
 gacggaaacg gaataggftt tttttcgaac acggtacggt aaacggtgag acaaaacttac 240

cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
 ccgaccacag gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
 catggggcca tgttggccac atgccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
 acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
 cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
 tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
 ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
 gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
 ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcg gcacccaccg gaacaaaaatg 780
 taaccgagaa aggtcggfcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
 taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattagggtgtacccccaa 900
 gactcctaat ctgagctggg aacccccatc agcacaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
 gattaaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgccc agcccagcct 1020
 cgggcaaggg cggccgacc cgaggattca cgtctcgccc gaggggcccc tcaagcgacg 1080
 ggcacacctt cggctcgccc gaggcccat tctcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
 ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgctga caccttatcc 1200
 tgacgcgcg tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
 accgacctga caagaagaca gcgccgctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
 agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgccc 1380
 accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
 ccagggttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttcgctcg cccgacccca 1500
 gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgctcgccc gaccccagg 1560
 ctcgactca gcctcggctc cgaagacgca cgaactccgc ctcgcccgac cccagggtc 1620
 ggactcagc tcggctcag acgatggtct ccgctcgcc cgacccgggg ctcgactcg 1680
 acctttctat cggacctgt cagatcctgt ctctgctcga ggaggctttg gcaatcctca 1740
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaaaaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
 attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
 cgcaccttg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
 tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
 tacccccaca aacacattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatact 2040
 tgccgagatc ctcatcccta aaggacttg acaatagtat tattggagt gatacacaac 2100
 tcaaaaaaaa tacaagaagt cgactagggt gatgggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
 atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
 taggtggcag tttgatacca ccgaaaagag aaaaaaaaga ttttaaggaa tcaaaaaaaa 2280
 ggaaaaatg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
 gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
 ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
 atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
 ctggtattgc ttacgctggg ccttggagg cttaggaacc tcaacctcag caaccaacca 2580
 atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
 tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
 aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatata cgcgggcatg cctgcagtg 2760
 agcgtgacc ggctgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagtataaa 2820
 aaattaccac aactggaaga gcggttacc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
 atccgcgggc atgcctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
 gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatttt tttgtcaca ctgtttgaa 3000
 gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
 tagtactaca ataatacag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
 taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatcttt tagtgtgcat 3180
 gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240

```

tacatccatt tagggtttag ggtaaatggt ttttatagac taatTTTTTT agtacatcta 3300
ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatTTTtag tttttttatt 3360
taataattta gatataaaaat agaataaaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt 3420
taagaaatta aaaaaactaa gaaacattt ttcttgttc gagtagataa tgccagcctg 3480
ttaaacgccg tgcagcagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
ccaagcgaag cagacggcac ggcatctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagttc 3600
cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
acgtgagccg gcacggcagg cggcctcctc ctctctcac ggacggcag ctacggggga 3720
ttcctttccc accgctcctt cgctttccct tcctcgcccg ccgtaataaa tagacacccc 3780
ctccacacc tctttcccca acctcgtgtt gtfcggagcg cacacacaca 3830

```

<210> 27

<211> 3347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence that represents part of the PH18999A
insert as well as flanking sequence 3' to the
insert.

<400> 27

```

cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga 60
cagggtagcc ggggatccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat taggccagct 120
acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgtaaac attacattga gacgtctaca 180
gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct agagaggttg 240
caagatagat acccttgggt ggttgcctgag gttgagggtg ttgtggctgg tattgcttac 300
gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac gatggacag ttgagagtac tgtttacgtg 360
tcacatagcc atcaaagggt gggcctagga tccacattgt acacacattt gcttaagtct 420
atggaggcgc aaggtttta gtcgtggtt gctgttatag gccttccaaa cgatccatct 480
gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccgggta cattgcgcgc agctggatac 540
aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct 600
ccaaggccag ttaggccagt taccagatc tgagtcgacc tgcaggcatg cccgctgaaa 660
tcaccagtct ctctctacaa atctatctct ctctataata atgtgtgagt agttcccaga 720
taaggaatt aggttctta tagggtttcg ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta 780
gtatgtatTT gtattttaa aatacttcta tcaataaaaat ttctaattcc taaaaccaa 840
atccagtggc gagctcgaat tgcagctcga gcccgggttg atcctctaga gtcgacctgc 900
agaagcttcg gtccggcgcg cctctagtgt aagacagtt catgtcttca tcgtaagaag 960
aactcagta gtcttcggcc agaatggcct aactcaaggc cctcactccg ctgatcttg 1020
gcaaagatat ttgacgatt tattagtatg tgtaatttt catttgcagt gcagtatttt 1080
ctattcgatc tttatgtaat tcgttacaat taataaataat tcaaatcaga ttattgactg 1140
tcatttgtat caaatcgtgt ttaatggata tttttattat aatattgatg atatctcaat 1200
caaacgtag ataataataa tatttattta atattttgc gtcgcacagt gaaaatctat 1260
atgagattac aaaaaccga caacattatt taagaaacat agacattaac cctgagactg 1320
ttggacatca acgggtagat tccttcatgc atagcacctc attcttgggg acaaaagcac 1380
ggtttggccg ttccattgct gcacgaacga gctttgctat atcctcgggt tggatcatct 1440
catcaggtcc aatcaaatTT gtccaagaac tcatgttagt cgcaacgaaa ccggggcata 1500
tgtcgggtat ctgcagctcg cgaaagcttg gctgcaggtc gacggatcct tcaacaaaag 1560
ggtacctgta cccgaaaccg acacaggtgg gtaggtagag aataacctagg ggcgcgagac 1620
aactctctct aaggaactcg gcaaaaatagc cccgtaactt cgggagaagg ggtgcccccc 1680

```

gctaacaata aacgaatacg gtttatgtat ggattccggg aaaataccgg tactcgattt 1740
 cataagagtc gaataggaag ttaagatgag ggtaggatca tcataaaaaat ggagtagtat 1800
 cctaaaattat actaatccac gtatgatatg tatgcctttc cttatcaacc ggaagtagtg 1860
 caaaaaaaaa tctatactgc actgctctct tttfactgag aaatgcaaaa aaataaaagt 1920
 gaagtaaggg tgcccatag atatttgatc ttgcctcctg tcccccccc ctttttttca 1980
 tcaaaaattt ccatgaaaaa agaaaagatg aatttgtcca ttcatggaac cctagttcgg 2040
 gactgacggg gctcgaacct gcagcttccg cctgttccca gccttccagg gccagcgta 2100
 agcaatacca gccacagcac cctcaacctc agcaaccaac caagggtatc tatcttgaac 2160
 cctctctaga tcatcaatcc actcttggg ttgttggggc tctgtcctaa agttcactgt 2220
 agacgtctca atgtaatggt taacgatatc acaaaccgag gaacacaaga acgaaagcac 2280
 cttttcattc tttcatatac taggggtttt tacttggaaa agacaatggt ccatactaaa 2340
 ggatagctgc agaagccgcc accgtcttga ggaccttccg gggagccaga ccggtcgaac 2400
 cgtgcctcca ctgtctaagg agaaaaggaa aatcagggcc aggacatacg aaggaggagc 2460
 cagaacgaag atatcctaag atacttactc gctccgggcc atgatcaatc atgcctgtgg 2520
 ggaggtctct cgcacctcga tccatgaagg taccaccgag gtctgccccg ccgccggctt 2580
 cggtagcgtc ctgccttgg gcgcccggag caccggggg atggactgcc caggcgcagc 2640
 cacgacgacc caaggtcac cctcctgccc agtcggcacg agcaatagtt ctccgggaac 2700
 aggagccttg gcctgactcc ccggggtcac ctcaactacc tccgcccagg ggtcaagtac 2760
 cccctcagtc cgccccgct ctctggaccg ggaccccagc gtcccggccc cggataccga 2820
 cggcaccagc ccgctcgggg gctggcttga cgacccttgg cccagcctca gatctgggct 2880
 gaggccgagg caggcggcca tgcgtcgtc ttcatcatcg tcttcatcat cgtcgtcgtc 2940
 atcaggcgtc tccggcgacg gctcccttgg gagcccctcc ctctcctgcc gacgacgaag 3000
 ctttccaag gcatcccgag cccacgtccg ctctgtggcc cgagccttct ttgcgtcctt 3060
 ctctccttc ctcttctccg cgtgaccct ccgcccagct cggttccacc catcctccgg 3120
 gactggtggc aggaaggct tgtgatgcc tacctcctgg agacagacga aaagtctcag 3180
 ctatgagaac cgagggcaat ctgacgcaag aaggaagaag gagcggatac tcaccagaga 3240
 cacgaccccg cgatcgggac gcattaaggg ctgggaaaaa gtgccggcct ctaatttctc 3300
 tacgtgcccg tccaccacc tgtggaggtc atcgatggga aggggaa 3347

<210> 28

<211> 669

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 28

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggctg gtaaaatccg gtaaat ttc 120
 ggtaccgttt accagat ttt tccagccgtt ttcggattta tccggatata cagaaaacga 180
 gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaaacttac 240
 cgtccgtttt cgtat tctc gggaaactct ggtatat tcc cgtat tgtc ccgtat tttc 300
 ccgaccacag gacctgcaa tcaacctca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
 catggggcca tgttgccac atgccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
 acgcatgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tggcgtgtg 480
 cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
 tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agcccgaagc taccaagccc 600
 ccaagtccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggctg atctgcaggc 660
 gccagaccg 669

<210> 29

<211> 200

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 29

```
gccgaagcat cacgaaacgc actaagacct cgaaggagtc aaaccactcc tccgaggcct 60
cgggggctac acccggcggg tgcgctcgcg cgcacccacc ggaacaaaat gtaaccgaga 120
aaggtcggtc cccttgcaaa aaaagtgcga caaaagcctc caagcgagta ttaacactca 180
ctttgaggct cgggggctac                                     200
```

<210> 30

<211> 812

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Fragment of maize Huck-1 retrotransposon

<400> 30

```
tgtcggggac cataattagg ggtaccccca agactcctaa tctcagctgg taacccccat 60
cagcacaag ctgcaaaggc ctgatgggtg cgattaagtc aaggctcggc ccaactcaagg 120
gacacgatct cgctcgcgcc gagcccagcc tcgggcaagg gcggccgacc ccgaggattc 180
acgtctcgcc cgagggcccc ctcaagcgac gggcacacct tcggctcgcc cgagggcccat 240
tcttcgccga gaagcaacct tggccagatc gccacaccga ccgaccgat cgcaggagca 300
tttaatgcga ggatcgctg acaccttate ctgacgcgcg ctcttcagtc gacagagccg 360
aagtaccgc aatcacttcg ccgctccact gaccgacctg acaagaagac agcggccgct 420
gcgtcgctcc gactgctgtg ccaactcgaca gagtgaggct gacagcagcc aagtccggcc 480
tcgggcgcca taggaagctc cgctcgcgcc gaccctaggg ctccggactcg gcctcggctc 540
cggaagacga cgaactacgc ttcgcccagc cccagggtt ggactcagcc tcggctccgg 600
aagacgacga attccgcctc gcccgacccc agggctcgga ctccggcctcg gctccagaag 660
acgacgaact ccgctcgcgc cgaccccagg gctcggactc agcctcggct ccggaagacg 720
acgaactccg cctcgcgccg ccccagggtc cggactcagc ctccggcctca gacgatggtc 780
tccgcctcgc ccgaccggg gctcggactc ga                                     812
```

<210> 31

<211> 335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of cry1F gene

<400> 31

```
cttttctatc ggacctgtc agatcctgtc ttcgtccgag gaggctttgg caatcctcac 60
tatgtactcg gtcttagggg agtggccttt caacaaactg gtacgaatca caccgcaca 120
ttcaggaact ccgggacat tgactctcta gatgagatac cacctcaaga caacagcggc 180
gcaccttggg atgactactic ccatgtgctg aatcatgtta cctttgtgcg ctggccaggc 240
gagatctcag gttccgactc atggagagca ccaatgttct ctgggacgca tcgtagcgct 300
acccccacaa acaccattga tccagagaga atcac                                     335
```

<210> 32
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <223> Fragment of maize chloroplast rpoC2 gene

<400> 32
 tcattcttca agaactgcat atcttgccga gatcctcatc cctaaaggta ctgacaata 60
 gtattattgg agtcgataca caactcacia aaaatacaag aagtcgacta ggtggattgg 120
 tccgagtgaa gagaaaaaaaa agccatacag aactcaaaat cttttccgga gatattcatt 180
 ttctgaaga ggcggataag atattagggtg gcagtttgat accaccagaa agagaaaaaaaa 240
 aagattctaa ggaatcaaaa aaaaggaaaa attgggttta tgttcaacgg aaaaaatttc 300
 tcaaaagcaa ggaaaagtat t 321

<210> 33
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Represents part of PHI8999A insert
 sequence-fragment of ubiZM1(2) promoter; also a
 fragment of the maize chloroplast trn1 gene

<400> 33
 gtggctattt atctatc 17

<210> 34
 <211> 201
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
 fragment of pat gene

<400> 34
 gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaaccatt acattgagac gtctacagtg 60
 aacttttagga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga gaggttgcaa 120
 gatagatacc cttggttggg tgctgagggt gaggggtgtg tggctgggat tgcttacgct 180
 gggccctgga aggctaggaa c 201

<210> 35
 <211> 138
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of pat gene (complement)

<400> 35

cctcaacctc agcaaccaac caatggatc tatcttgcaa cctctctaga tcatcaatcc 60
actcttgagg tgtttgagg tctgtcctaa agttcactgt agacgtctca atgtaatgg 120
taacgatatc acaaaccg 138

<210> 36

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of cry1F gene (complement)

<400> 36

agagaagagg gatct 15

<210> 37

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of polylinker

<400> 37

cgaagcttcg gccggggccc atcgatatcc gcgggcatgc ctgcagtga gcgtgacccg 60
gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgcta agttataaaa aattacca 118

<210> 38

<211> 550

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of ORF25 terminator (complement)

<400> 38

ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaatcttc 60
atttgcagtg cagtattctc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatcagat tattgactgt catttgtatc aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180
atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa ttttttgcg 240
tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ccttcatgca tagcacctca 360
ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgcctata 420

tcctcgggtt ggatcatctc atcagggtcca atcaaatctg tccaagaact catgtagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tgcagctcgc gaaagcttgg ctgcaggctg 540
acggatcctt 550

<210> 39
<211> 128
<212> DNA
<213> Zea mays

<220>
<223> Fragment of maize chloroplast rps12 rRNA gene
(complement)

<400> 39
caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacagggtgg taggtagaga atacctaggg 60
gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc gggagaaggg 120
gtgcccc 128

<210> 40
<211> 392
<212> DNA
<213> Zea mays

<220>
<223> Fragment of maize chloroplast genome

<400> 40
ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggta aaataccggt actcgatttc 60
ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggatcat cataaaaatg gagtagtata 120
ctaaattata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc ttatcaaccg gaagtagtgc 180
aaaaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt ttactgaga aatgcaaaaa aataaaagtg 240
aagtaagggt gcccataga tatttgatct tgccctcctgt ccccccccc cttttttcat 300
caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat tcattgaacc ctagtccggg 360
actgacgggg ctcgaaaccg cagcttccgc ct 392

<210> 41
<211> 188
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -
fragment of pat gene (complement)

<400> 41
gttcctagcc ttccagggcc cagcgtaagc aataccagcc acagcaccct caacctcagc 60
aaccaaccaa gggatctat ctgcaacct ctctagatca tcaatccact ctgtggtgt 120
ttgtggctct gtccataaagt tcaactgtaga cgtctcaatg taatgggttaa cgatatcaca 180
aaccgagg 188

<210> 42
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <223> Fragment of maize chloroplast ORF241 (complement)

<400> 42
 cacaagaacg aaagcacctt ttcattcttt catatactag gggtttttac ttggaaaaga 60
 caatgttcca tactaaagga t 81

<210> 43
 <211> 254
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 43
 agctgcagaa gccgccaccg tcttgaggac cttccgggga gccagaccgg tcgaaccgtg 60
 cctccacttg ctaaggagaa agggaaaatc agggccagga catacgaagg aggagccaga 120
 acgaagatat cctaagatac ttactcgcctc cgggccatga tcaatcatgc ctgtggggag 180
 gtctctcgca cctcgaatcca tgaaggatcc accgaggtct gccccgccgc cggcttcggt 240
 accgtcctcg cctt 254

<210> 44
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 44
 gggcgcccga ggcacccggg ggatggactg cccaggcgca gccacgacga cccaaggatc 60
 accctcctgc gcagtcggca cgagcaatag ttctcgggga acaggcagct tggcctgact 120
 ccccggggtc acctcaacta cctcggccga ggggtcaagt accccctcag tccgcccccg 180
 ctcttcggac cgggaccccg acgtcccggc cccggatacc gacggcacca gcccgtcgg 240
 gggctggctt gacgacccct ggcccagcct cagatctggg ctgaggccga ggcaggcggc 300
 catgtcgtcg tcttcatcat cgtcttcatc atcgtcgtcg tcatcaggcg tctccggcga 360
 cggctccctt gggagcccct cctctcctg ccgacgacga agcctttcca aggcatcccg 420
 agcccacgtc cgctcgtggg cccgagcctt ctttgcgtcc ttcttctcct tcctcttctc 480
 cgcggtgacc ctccgcgcag ctccgtccac cgcatcctcc gggactggtg gcagggaaagg 540
 cttgtgatgc cctacctctt ggagacagac gaaaagtctc agctatgaga accgagggca 600
 atctgacgca agaaggaaga aggagcggat actcaccaga gacacgcacc cgcgatcggg 660
 acgcattaag ggctgggaaa aagtgccggc ctctaatttc gctaccgtgc cgtccacca 720
 cctgtggagg tcatcgaatg gaaggggaa 749

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 3 and 4

<400> 45

tcggactcga cctttctatc

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 4 and 5

<400> 46

agagaatcac tcattcttca

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 5 and 6

<400> 47

gaaaagtatt gtggtatatt

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 6 and 7a

<400> 48

tctcaaggcc gcagctgata

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 7a and 7b

<400> 49
ggctaggaac cctcaacctc 20

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' event flanking sequence; junction between
regions 7b and 7c

<400> 50
tcacaaaccg agagaagagg 20

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' event flanking sequence; junction between
regions 7c and 8

<400> 51
agagggatct cgaagcttcg 20

<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' event flanking sequence; junction between
regions 8 and 9

<400> 52
aaaattacca caactggaag 20

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' event flanking sequence; junction between
regions 9 and 10

<400> 53

agctatgttt ctcactccgc 20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' event flanking sequence; junction between
regions 10 and 11

<400> 54
acggatcctt caacaaaagg 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' event flanking sequence; junction between
regions 11 and 12

<400> 55
gtgcccccg ctaacaataa 20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' event flanking sequence; junction between
regions 12 and 13

<400> 56
gcttccgcct gttcctagcc 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' event flanking sequence; junction between
regions 13 and 14

<400> 57
aaaccgcgga acacaagaac 20