



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월04일
(11) 등록번호 10-1152465
(24) 등록일자 2012년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7020845
(22) 출원일자(국제) 2004년04월29일
심사청구일자 2008년12월17일
(85) 번역문제출일자 2005년11월02일
(65) 공개번호 10-2006-0034631
(43) 공개일자 2006년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/013538
(87) 국제공개번호 WO 2004/099447
국제공개일자 2004년11월18일
(30) 우선권주장
60/467,772 2003년05월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20020162136 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다우 아그로사이언시즈 엘엘씨
미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자
이언스빌 로드 9330
파이오니어 하이-브레드 인터내셔널 인코포레이
티드
미국 아이오와 50309 데스 모인즈 로커스트 스트
리트 400 캐피탈 스퀘어 800
이 아이 듀폰 디 네모아 앤드 캄파니
미합중국 테라웨아주 (우편번호 19898) 월밍톤시
마마켓트 스트리트 1007
(72) 발명자
바르부어, 에릭
미국 50131 아이오와주 존스톤 엔.더블유. 97번
스트리트6519
빙, 제임스 더블유.
미국 50021 아이오와주 앤케니 엔.이. 118번 애
비뉴 1565
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 56 항

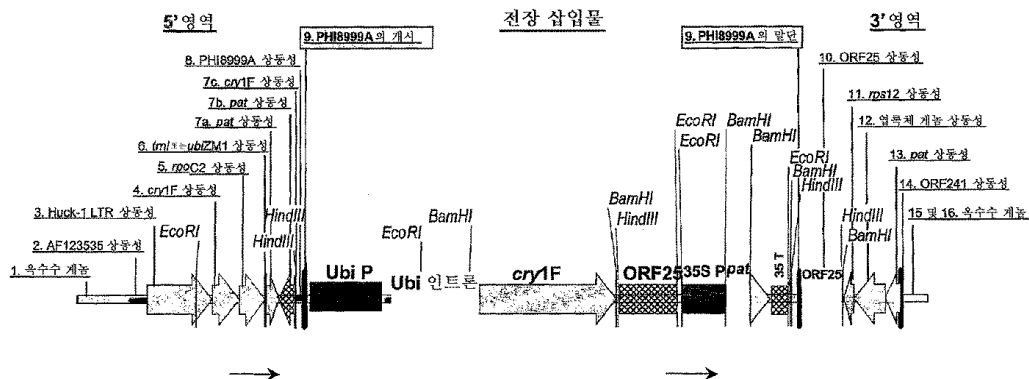
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 옥수수 이벤트 TC 1507 및 그의 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 트랜스제닉 내충성 옥수수 식물과 관련된 DNA 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 옥수수 게놈에 삽입된 재조합 구조물의 DNA 서열 및 삽입 부위를 플랭킹하는 DNA 서열에 기초하여 옥수수 TC1507 이벤트의 존재를 검출하기 위한 분석법을 제공한다. 상기 분석법을 수행하는데 유용한 키트 및 조건도 제공된다.

대표도



(72) 발명자

카르디뉴, 가이 에이.

미국 85282 아리조나주 템페 웨스트 코티지 라인 18

크레스만, 로버트 에프. 주니어

미국 19805 델라웨어주 월밍톤 턴스톤 드라이브 2502

굽타, 만주

미국 46032 인디애나주 카르멜 위나맥 코트 13463

하르트네트 락크, 메리 이.

미국 08056 뉴저지주 미클레톤 밀우드 드라이브 31

혼드레드, 데이비드

미국 50021 아이오와주 엔케니 엔.더블유. 72번 애비뉴1432

키샬, 조셉 더블유.

미국 50325 아이오와주 클리브 서밋 드라이브 13563

코지엘, 마이클 지.

미국 27613 노쓰 캐롤라이나주 랄레이 리아트리스 라인1601

메이어, 테리 이.

미국 50322 아이오와주 어번테일 101번 스트리트 4338

모엘렌베크, 다니엘

미국 50109 아이오와주 그랭거 엔.더블유. 107번 코트11655

나르바, 케네쓰 이.

미국 92009 캘리포니아주 칼스배드 비아 콘퀴스타 도르2856

니룬수크시리, 윌라스

미국 98001 워싱턴주 오번 아비 드라이브 515

리치, 스티븐 더블유.

미국 68130 네브라스카주 오마하 라이트 서클 16218

루더르트, 마르조리 엘.

미국 50036 아이오와주 분 274번 라인 1364

샌더스, 크레이그 디.

미국 19701 델라웨어주 베어 페니 라인 15

샤오, 아이후아

미국 50131 아이오와주 존스톤 애쉬랜드 플레이스 5920

스텔만, 스티븐 제이.

미국 92116 캘리포니아주 샌 디에고 33번 스트리트 4646

스터커, 데이비드 에스.

미국 50131 아이오와주 존스톤 팀버우드 드라이브 9028

타글리아니, 로라 에이.

미국 46077 인디애나주 지운스빌 헌츠맨 드라이브 4100

반 잔테, 윌리엄 엠.

미국 50322 아이오와주 어번테일 73번 플레이스 4424

특허청구의 범위

청구항 1

서열 21로 확인되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 2

서열 22로 확인되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 3

서열 24로 확인되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 4

서열 26으로 확인되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 5

서열 27로 확인되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 6

서열 26내의 서열 또는 그의 상보체 또는 서열 27내의 서열 또는 그의 상보체를 인식하는 제1 프라이머 및 서열 25내의 서열 또는 그의 상보체 또는 서열 22내의 서열 또는 그의 상보체를 인식하는 제2 프라이머를 포함하는, 생물학적 시료에서 TC1507 특정 영역을 검출하여 이벤트(event) TC1507을 확인하기 위한 키트(kit).

청구항 7

제6항에 있어서, 제1 프라이머가 서열 21내의 서열을 인식하는 것인 키트.

청구항 8

제6항에 있어서, 제1 프라이머가 서열 22내의 서열을 인식하는 것인 키트.

청구항 9

제6항에 있어서, 하나 이상의 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 1 및 서열 2를 포함하는 것인 키트.

청구항 10

제6항에 있어서, 하나 이상의 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 2 및 서열 23을 포함하는 것인 키트.

청구항 11

제6항에 있어서, 하나 이상의 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 3 및 서열 5를 포함하는 것인 키트.

청구항 12

제6항에 있어서, 하나 이상의 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 4 및 서열 5를 포함하는 것인 키트.

청구항 13

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 동종이거나 이에 상보적인, 길이가 11개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 하나 이상의 DNA 분자를 포함하는, 옥수수 이벤트 TC1507 및 그의 후손의 접합(junction) DNA에 특이적인 DNA 검출 키트.

청구항 14

서열 25에 인접하고 있는 서열 21 및 서열 25와 혼성화하는 서열을 포함하는 특이적 프로브를 포함하는, 생물학적 시료에서 이벤트 TC1507을 확인하기 위한 키트.

청구항 15

서열 25에 인접하고 있는 서열 22 및 서열 25와 혼성화하는 서열을 포함하는 특이적 프로브를 포함하는, 생물학적 시료에서 이벤트 TC1507을 확인하기 위한 키트.

청구항 16

옥수수 이벤트 TC1507 및 그의 후손에 특이적인 DNA 프라이머 또는 프로브로서 기능하는, 서열 26 또는 서열 27에 동종이거나 이에 상보적인, 길이가 11개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 하나 이상의 DNA 분자를 포함하는, 옥수수 이벤트 TC1507 검출 키트.

청구항 17

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 특이적으로 인식하는 프로브 또는 제1 프라이머로 TC1507 특정 영역을 검출함을 포함하는, 생물학적 시료에서 이벤트 TC1507을 확인하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 2개 이상의 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 생물학적 시료에 존재하는 핵산으로부터 DNA 단편을 증폭시킴을 추가로 포함하고, 이때 제1 프라이머가 서열 26 또는 서열 27 내의 서열을 인식하고, 제2 프라이머가 서열 27 또는 서열 25내의 서열을 인식하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 제1 프라이머가 서열 21내의 서열을 인식하고, 제2 프라이머가 서열 25내의 서열을 인식하는 것인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 제1 프라이머가 서열 22내의 서열을 인식하고, 제2 프라이머가 서열 22내의 서열을 인식하는 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 2 및 서열 1을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 2 및 서열 23을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 3 및 서열 5를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 제1 및 제2 프라이머들이 각각 서열 4 및 서열 5를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, TC1507 PCR 확인 프로토콜을 사용하여 912 bp의 단편을 증폭시킴을 포함하는 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, TC1507 PCR 확인 프로토콜을 사용하여 844 bp의 단편을 증폭시킴을 포함하는 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, TC1507 PCR 확인 프로토콜을 사용하여 342 bp의 단편을 증폭시킴을 포함하는 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, TC1507 PCR 확인 프로토콜을 사용하여 252 bp의 단편을 증폭시킴을 포함하는 방법.

청구항 29

- (a) 생물학적 시료로부터 DNA 시료를 추출하는 단계;
- (b) 서열 1 및 서열 2의 DNA 프라이머 분자들을 제공하는 단계;
- (c) DNA 증폭 반응 조건을 제공하는 단계;
- (d) DNA 증폭 반응을 수행하여 DNA 앰플리콘 분자를 생산하는 단계; 및
- (e) 상기 DNA 증폭 반응에서 DNA 앰플리콘 분자를 검출하여 그로부터 옥수수 이벤트 TC1507의 존재를 확인하는 단계

를 포함하는, 생물학적 시료에서 옥수수 이벤트 TC1507 또는 그의 후손의 존재를 검출하는 방법.

청구항 30

- (a) 생물학적 시료로부터 DNA 시료를 추출하는 단계;
- (b) 서열 2 및 서열 23의 DNA 프라이머 분자들을 제공하는 단계;
- (c) DNA 증폭 반응 조건을 제공하는 단계;
- (d) DNA 증폭 반응을 수행하여 DNA 앰플리콘 분자를 생산하는 단계; 및
- (e) 상기 DNA 증폭 반응에서 DNA 앰플리콘 분자를 검출하여 그로부터 옥수수 이벤트 TC1507의 존재를 확인하는 단계

를 포함하는, 생물학적 시료에서 옥수수 이벤트 TC1507 또는 그의 후손의 존재를 검출하는 방법.

청구항 31

- (a) 생물학적 시료로부터 DNA 시료를 추출하는 단계;
- (b) 서열 3 및 서열 5의 DNA 프라이머 분자들을 제공하는 단계;
- (c) DNA 증폭 반응 조건을 제공하는 단계;
- (d) DNA 증폭 반응을 수행하여 DNA 앰플리콘 분자를 생산하는 단계; 및
- (e) 상기 DNA 증폭 반응에서 DNA 앰플리콘 분자를 검출하여 그로부터 옥수수 이벤트 TC1507의 존재를 확인하는 단계

를 포함하는, 생물학적 시료에서 옥수수 이벤트 TC1507 또는 그의 후손의 존재를 검출하는 방법.

청구항 32

- (a) 생물학적 시료로부터 DNA 시료를 추출하는 단계;
- (b) 서열 4 및 서열 5의 DNA 프라이머 분자들을 제공하는 단계;
- (c) DNA 증폭 반응 조건을 제공하는 단계;
- (d) DNA 증폭 반응을 수행하여 DNA 앰플리콘 분자를 생산하는 단계; 및
- (e) 상기 DNA 증폭 반응에서 DNA 앰플리콘 분자를 검출하여 그로부터 옥수수 이벤트 TC1507의 존재를 확인하는 단계

를 포함하는, 생물학적 시료에서 옥수수 이벤트 TC1507 또는 그의 후손의 존재를 검출하는 방법.

청구항 33

제29항의 방법에 의해 생산된 앰플리콘을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 34

제30항의 방법에 의해 생산된 앰플리콘을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 35

제31항의 방법에 의해 생산된 앰플리콘을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 36

제32항의 방법에 의해 생산된 앰플리콘을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 37

(a) 서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 서열과 엄격한 혼성화 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 프로브를 옥수수 DNA를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시료 및 프로브에 엄격한 혼성화 조건을 적용하는 단계; 및

(c) 상기 DNA에 대한 프로브의 혼성화를 검출하여 그로부터 TC1507 이벤트의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 시료에서 TC1507 이벤트에 상응하는 DNA의 존재를 검출하는 방법.

청구항 38

서열 1, 2, 3, 4, 23, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 또는 그의 상보체를 포함하는 단리된 핵산.

청구항 39

제38항에 있어서, 서열 1, 2, 3, 4 및 23으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 또는 그의 상보체를 포함하는 단리된 핵산.

청구항 40

TC1507 옥수수 식물 또는 그의 후손으로부터 추출된 DNA를 진단하는 DNA 프라이머 또는 프로브로서 기능하는, 서열 26으로부터 길이로 11개 이상의 인접 뉴클레오타이드들 또는 그의 상보체인 제1 DNA 분자 및 제2 DNA 분자를 포함하는 한 쌍의 DNA 분자.

청구항 41

TC1507 옥수수 식물 또는 그의 후손으로부터 추출된 DNA를 진단하는 DNA 프라이머 또는 프로브로서 기능하는, 서열 27로부터 길이로 11개 이상의 인접 뉴클레오타이드들 또는 그의 상보체인 제1 DNA 분자 및 제2 DNA 분자를 포함하는 한 쌍의 DNA 분자.

청구항 42

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 43

종자 시료에서 서열 26 또는 서열 27내의 서열을 특이적으로 인식하는 특이적 프라이머 또는 프로브를 사용하여 TC1507 특정 영역을 검출함을 포함하는, 종자 순도의 확인 방법.

청구항 44

종자 로트(lot)의 시료에서 서열 26 또는 서열 27내의 서열을 특이적으로 인식하는 특이적 프라이머 또는 프로브를 사용하여 TC1507 특정 영역을 검출함을 포함하는, 이벤트 TC1507의 존재에 대해 종자들을 스크리닝(screening)하는 방법.

청구항 45

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나

이상의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA가 식물 계통의 일부를 형성하는 것인, 내충성 옥수수 식물 또는 그의 부분.

청구항 46

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA가 식물 계통의 일부를 형성하는 것인, 제45항의 내충성 옥수수 식물의 혈통(descendant) 식물.

청구항 47

제45항 또는 제46항의 식물의 종자.

청구항 48

제45항 또는 제46항의 식물을 재배하는 단계; 및

서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 분석하여 후손을 선택하는 단계

를 포함하는, 내충성 옥수수 식물의 생산 방법.

청구항 49

서열 26 또는 서열 27로부터 각각 10개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하고, DNA 증폭 절차에서 함께 사용시 이벤트 TC1507을 진단하는 앰플리콘을 생산하며, 쌍의 각각의 일원은 앰플리콘의 반대편 말단에 존재하는, 한 쌍의 단리된 핵산.

청구항 50

(a) 각각 서열 26 또는 서열 27로부터 10개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 쌍을 선택하는 단계;

(b) 옥수수 조직의 시료를 상기 프라이머 쌍과 접촉시키는 단계; 및

(c) DNA 증폭을 수행하고 앰플리콘에 대해 분석하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 프라이머 쌍의 각각의 일원이 TC1507 이벤트의 삽입물을 진단하는 서열의 반대측상에 존재하는 것인, 옥수수 조직에서 TC1507 이벤트 삽입물의 존재를 검출하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 프라이머 쌍이 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 52

(a) 엄격한 혼성화 조건하에서 서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 프로브와 옥수수 조직의 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시료 및 프로브에 엄격한 혼성화 조건을 적용하는 단계; 및

(c) 프로브의 혼성화에 대해 분석하는 단계

를 포함하는, 옥수수 조직에서 TC1507 이벤트 삽입물의 존재를 검출하는 방법.

청구항 53

엄격한 혼성화 조건하에서 서열 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 54

각각 서열 26 및 서열 27로부터 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 쌍을 포함하고, 이때 프라이머 쌍의 각각의 일원은 TC1507 이벤트 삽입물을 진단하는 서열의 반대측상에 존재하는 것인 키트.

청구항 55

제54항에 있어서, 프라이머 쌍이 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 및 57, 및 그의 상보체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 56

서열 24내의 TC1507 특정 영역을 검출하는, 생물학적 시료에서 이벤트 TC1507을 확인하는 방법.

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 식물 분자 생물학에 관한 것으로, 구체적으로는 식물에 내충성을 부여하는 DNA 구조물에 관한 것이다. 본 발명은 보다 구체적으로 내충성 옥수수 식물 TC1507, 및 시료 및 그의 조성물 중에서 옥수수 식물 TC1507 DNA의 존재를 검출하기 위한 분석법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 본 발명은 옥수수 계통 TC1507 또는 옥수수 이벤트(event) TC1507로도 지칭되는 내충성 옥수수 (*Zea mays*) 식물 TC1507, 및 옥수수 식물 TC1507의 DNA 식물 발현 구조물 및 옥수수 식물 TC1507 및 그의 후손 중에서 트랜스유전자/플랭킹(flaning) 삽입 영역의 검출에 관한 것이다.
- [0003] 옥수수는 중요한 곡물로서, 세계의 많은 지역에서 일차적인 식품 공급원이다. 화학적 살충제와 같은 보호적 조치의 사용에도 불구하고 해충으로 인한 손해는 세계적으로 옥수수 곡물의 손실에 있어서 주요 인자이다. 이러한 점을 고려하여, 충해(insect damage)를 방제하고 전통적인 화학적 살충제에 대한 필요성을 감소시키기 위하여 옥수수와 같은 곡물에 내충성을 유전공학적으로 부여해왔다. 트랜스제닉 내충성 곡물의 생산에 사용되어 온 유전자의 한 군은 바실루스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*)(B.t.)로부터의 델타-엔도톡신(delta-endotoxins)이다. 델타-엔도톡신은 목화, 감자, 벼, 해바라기 뿐 아니라 옥수수에서도 성공적으로 발현되어왔고, 해충에 대한 우수한 방제성을 제공한다는 것이 증명되었다(문헌[Perlak, F. J et al. (1990) Bio/Technology 8, 939-943; Perlak, F. J. et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 313-321; Fujimoto H. et al. (1993) Bio/Technology 11: 1151-1155; Tu et al. (2000) Nature Biotechnology 18: 1101-1104; PCT 공보 제WO 01/13731호; 및 Bing JW et al.(2000) Efficacy of Cry1F Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, CO]) 참조).
- [0004] 식물내에서 외부 유전자의 발현은, 아마도 통합 부위에 밀접한 전사 조절 요소 (예: 인핸서)의 근접성 또는 염색질 구조 (예: 헤테로염색질)에 기인하여 식물 게놈 내에서의 그들의 위치에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(문헌[Weising et al., Ann. Rev. Genet 22: 421-477, 1988] 참조). 동시에, 게놈 중의 상이한 위치에서의 트랜스유전자의 존재는 식물의 전체 표현형에 상이한 방식으로 영향을 미칠것이다. 이러한 이유로, 관심의 대상인 도입된 유전자의 최적 발현에 의해 특징화되는 이벤트를 확인하기 위하여 다수의 이벤트를 선별할 필요성이 자주 있다. 예를 들면, 식물 및 기타 유기체에서 이벤트들 간에 도입된 유전자의 발현 수준이 광범위하게 차이가 날 수 있다는 것이 관찰되었다. 또한 발현의 공간적 또는 시간적 패턴에 있어서도 차이점이 있을 수 있는데, 예를 들면, 도입된 유전자 구조물에 존재하는 전사 조절 요소로부터 기대되는 패턴에 상응하지 않은 다양한 식물 조직에서의 트랜스유전자의 상대적 발현에서의 차이점이 있다. 이러한 이유로, 상업적 목적을 위한 목적하는 트랜스유전자 발현 수준 및 패턴을 갖는 단일한 이벤트를 선별하기 위해 수십만의 상이한 이벤트를 생산하고 이들 이벤트 중에서 선별하는 것이 흔하다. 트랜스유전자 발현의 목적하는 수준 또는 패턴을 갖는 이벤트는, 통상적인 번식 방법을 사용하는 유성 유전자 교배에 의해 기타 유전적 배경으로 트랜스유전자를 도입(introgressing)하는데 유용하다. 그러한 교배의 후손은 원래의 형질전환주의 트랜스유전자 발현 특징을 유지한다. 이런 전략은 국부적 성장 조건에 잘 적응하는 다수의 변종 중에서 신뢰할만한 유전자 발현을 확인하는데 사용된다.
- [0005] 유성 교배의 후손이 관심의 대상인 트랜스유전자를 함유하는지 여부를 결정하기 위하여 특정 이벤트의 특정의 존재를 검출할 수 있다면 유리할 것이다. 또한, 특정 이벤트를 검출하기 위한 방법은 예를 들면, 재조합 곡물 식물 유래의 식품의 시판전 승인 및 표시를 요구하고 있는 규정에 맞추는데, 또는 환경 모니터링, 재배지에서 곡물의 특질을 모니터링하는데, 또는 곡물 수확으로 유래된 산물을 모니터링하는데 뿐 아니라 규정 또는 계약 조건을 지켜야 하는 당사자들의 준수 여부를 확인하는 용도에 도움이 될 것이다.
- [0006] 핵산 프로브를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 또는 DNA 혼성화를 포함하나 이로 제한되지 않는 당분야에 공지된 임의의 핵산 검출 방법에 의해 트랜스유전자의 존재를 검출할 수 있다. 많은 DNA 구조물에 있어서, 코딩 영역이 상호교환가능하기 때문에, 상기 검출 방법은 일반적으로 빈번하게 사용되는 유전적 요소, 예컨대 프로모터, 터미네이터, 마커 유전자 등에 집중된다. 결과적으로, 그러한 방법은 상이한 이벤트 사이를 구별하는데, 특히, 삽입된 이중 DNA에 인접한 플랭킹 DNA의 DNA 서열이 알려지지 않는 한, 동일한 DNA 구조물 또는 매우 유사한 구조물을 사용하여 생산된 것들을 구별하는데 유용하지 않을 수도 있다. 예를 들면, 이벤트-특이적 PCR 분석법은 우수종(엘리트) 이벤트 GAT-ZM1 검출을 위한 미국 특허 제6,395,485호에 기재되어 있다. 따라서, 이벤트 TC1507의 확인을 위한 간단하고 구별되는 방법을 갖는다면 바람직할 것이다.
- [0007] 발명의 요약
- [0008] 본 발명은 바람직하게는 내충성 외떡잎 곡물 식물의 생산 및 선별을 위한 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 식물 세포 및 식물에서 발현되는 경우 내충성을 부여하는 DNA 구조물이 제공된다. 본 발명의 한 측면에 따라, 숙주 세포로 도입될 수 있고 숙주 세포 내에서 복제될 수 있는, 식물 세포 및 식물에서 발현되는 경우 식물 세포 및 식물에 내충성을 부여하는 DNA 구조물이 제공된다. DNA 구조물은 PHI8999A로 명명된 DNA 분자로 구성되고, 2개의 트랜스유전자 발현 카세트를 포함한다. 제1 발현 카세트는, Cry1F로서 확인된 B.t. δ -엔도톡신을 인코딩하는 DNA 분자에 작동적으로 연결된 (미국특허 제5,188,960 및 6,218,188호) 아그로박테리

움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로부터 단리된 3' ORF25 전사 터미네이터를 포함하는 DNA 분자 (Barker et al. (1983) Plant Mol. Biol. 2: 335-350) 및 옥수수 유비퀴틴(Ubi-1) 유전자의 프로모터, 5' 비번역된 엑손, 및 제1 인트론을 포함하는 DNA 분자를 포함한다(문헌[Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689 및 Christensen 및 Quail (1996) Transgenic Res. 5:213-218] 참조). DNA 구조물의 제2 트랜스유전자 발현 카세트는, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제(phosphinothricin acetyltransferase) (PAT) 유전자를 인코딩하는 DNA 분자에 작동적으로 연결된 (Wohlleben W. et al. (1988) Gene 70: 25-37) (CaMV) 35S로부터의 3' 전사 터미네이터를 포함하는 DNA 분자(Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37: 49-59 참조) 및 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터의 DNA 분자를 포함한다(문헌[Odell J. T. et al. (1985) Nature 313: 810-812; Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37: 49-59] 참조). 상기 DNA 구조물을 함유하는 식물도 또한 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 측면에 따라, TC1507의 5' 및(또는) 3' 플랭킹 서열을 특이적으로 인식하는 프라이머 또는 프로브에 기초하는 방법인, TC1507로 지정된 신규한 옥수수 식물을 확인하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. DNA 분자는 PCR 반응에 사용되는 경우 트랜스제닉 이벤트 TC1507에 고유한 앰플리콘(amplicon)을 생산할 프라이머 서열을 포함하도록 제공된다. 이들 분자는 하기로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다:

5'-GTAGTACTATAGATTATATTATTCGTAGAG-3' (서열 1);
5'-GCCATACAGAACTCAAAATCTTTCCGGAG-3' (서열 2);
5'-CTTCAAACAAGTGTGACAAA-3' (서열 23);
5'-TGTGGTGTGTTGTGGCTCTGTCCTAA-3' (서열 3);
5'-AGCACCTTTTCATTCTTTCATATAC-3' (서열 4);
5'-GACCTCCCA CAGGCATGAT TGATC-3' (서열 5);

[0010] 및 그의 상보체. 상기 분자를 포함하는 옥수수 식물 및 종자는 본 발명의 한 측면이다. 또한, TC1507 이벤트를 확인하는데 상기 프라이머 서열을 사용하는 키트(kit)도 제공된다.

[0011] 본 발명의 추가의 측면은 생물학적 시료 중에서 TC1507에 대한 특이적 확인 방법을 개발하는데 사용될 수 있는 본원에 기술된 TC1507의 특이적 플랭킹 서열에 관한 것이다. 보다 특정하게는, 본 발명은 특이적 프라이머 및 프로브의 개발을 위해 사용될 수 있는, 각각 서열 21 및 서열 22인 TC1507의 5' 및(또는) 3' 플랭킹 영역에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 특이적 프라이머 또는 프로브의 사용에 근거하여 생물학적 시료 중에서의 TC1507의 존재에 대한 확인 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 측면에 따라, 시료 중에서 옥수수 이벤트 TC1507에 상응하는 DNA의 존재의 검출 방법이 제공된다. 상기 방법은: (a) DNA를 포함하는 시료를, 옥수수 이벤트 TC1507로부터 추출된 게놈 DNA와 핵산 증폭 반응에 사용되는 경우 옥수수 이벤트 TC1507에 대한 진단이 되는 앰플리콘을 생산하는 DNA 프라이머 세트와 접촉시키는 단계; (b) 핵산 증폭 반응을 수행함으로써 앰플리콘을 제조하는 단계; 및 (c) 앰플리콘을 검출하는 단계를 포함한다.

[0013] 신규한 트랜스유전자/플랭킹 삽입 영역, 서열 26 및 서열 27을 포함하고, 서열 26 및 서열 27에 대해 동종 또는 상보적인 DNA 분자는 본 발명의 한 측면이다.

[0014] 신규한 트랜스유전자/플랭킹 삽입 영역, 서열 26을 포함하는 DNA 서열은 본 발명의 측면이다. 옥수수 식물 TC1507에 대한 진단용 앰플리콘 생성물의 생산을 위한 프라이머 서열로서 유용한 서열 26의 옥수수 식물 TC1507로부터의 플랭킹 서열 및(또는) 옥수수 게놈의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 트랜스유전자 삽입 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 서열이 포함된다.

[0015] 또한, 신규한 트랜스유전자/플랭킹 삽입 영역, 서열 27을 포함하는 DNA 서열이 제공된다. 옥수수 식물 TC1507에 대한 진단용 앰플리콘 생성물의 생산을 위한 프라이머 서열로서 유용한 서열 27의 옥수수 식물 TC1507로부터의 플랭킹 서열 및(또는) 옥수수 게놈의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드 및 트랜스유전자 삽입 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 서열이 포함된다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따라, 서열 26 또는 그의 상보체의 DNA 서열의 트랜스유전자 부분의 적어도 11개 이상의 뉴클레오타이드 및 서열 26 또는 그의 상보체의 5' 플랭킹 옥수수 DNA 서열의 유사한 길이를 포함하는 DNA 서열은 DNA 증폭 방법에서 DNA 프라이머로서 유용하다. 상기 프라이머를 사용하여 생산된 앰플리콘은 옥수수 이벤트 TC1507에 대한 진단이 될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 서열 26에 동종 또는 상보적인 DNA 프라이머에 의해 생산된 앰플리콘을 포함한다.

- [0017] 본 발명의 다른 측면에 따라, 서열 27 또는 그의 상보체의 DNA 서열의 트랜스유전자 부분의 적어도 11 이상의 뉴클레오티드 및 서열 27 또는 그의 상보체의 3'플래킹 옥수수 DNA 서열의 유사한 길이를 포함하는 DNA 서열은 DNA 증폭 방법에서 DNA 프라이머로서 유용하다. 상기 프라이머를 사용하여 생산된 앰플리콘은 옥수수 이벤트 TC1507에 대한 진단이 될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 서열 27에 동종 또는 상보적인 DNA 프라이머에 의해 생산된 앰플리콘을 포함한다.
- [0018] 보다 구체적으로, DNA 분자가 서열 1 또는 그의 상보체 및 서열 2 또는 그의 상보체; 서열 2 또는 그의 상보체 및 서열 23 또는 그의 상보체; 서열 3 또는 그의 상보체 및 서열 5 또는 그의 상보체; 서열 4 또는 그의 상보체 및 서열 5 또는 그의 상보체로서 확인된 DNA 프라이머 세트를 포함하는 한 쌍의 DNA 분자는 본 발명의 측면이다.
- [0019] 본 발명의 추가의 측면은 서열 1 및 서열 2의 DNA 분자를 포함하는 앰플리콘; 서열 2 및 서열 23의 DNA 분자를 포함하는 앰플리콘; 서열 3 및 서열 5의 DNA 분자를 포함하는 앰플리콘; 및 서열 4 및 서열 5의 DNA 분자를 포함하는 앰플리콘을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 다른 측면에 따라, 시료 중에서 TC1507 이벤트에 상응하는 DNA 분자의 존재를 검출하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은: (a) 옥수수 식물로부터 추출된 DNA를 포함하는 시료를, 옥수수 이벤트 TC1507로부터 추출된 DNA와는 엄격한 혼성화 조건하에 혼성화되고, 대조 옥수수 식물 DNA와는 엄격한 혼성화 조건하에 혼성화되지 않는 분자인 DNA 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 시료 및 프로브에 엄격한 혼성화 조건을 적용하는 단계; 및 (c) DNA에 대한 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다. 보다 구체적으로, 시료 중에서 TC1507 이벤트에 상응하는 DNA 분자의 존재를 검출하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 옥수수 식물로부터 추출한 DNA를 포함하는 시료를, 이벤트, 예를 들면, 접합(junction) 서열에 고유한 서열로 구성되고, 옥수수 이벤트 TC1507로부터 추출된 DNA와는 엄격한 혼성화 조건하에 혼성화되고, 대조 옥수수 식물 DNA와는 엄격한 혼성화 조건하에 혼성화되지 않는 DNA 프로브 분자와 접촉시키는 단계, (b) 시료 및 프로브에 엄격한 혼성화 조건을 적용하는 단계; 및 (c) DNA에 대한 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0021] 또한, 서열 24 내의 TC1507 특정 영역을 검출하는, 생물학적 시료 중의 이벤트 TC1507을 확인하기 위한 키트 및 방법이 제공된다.
- [0022] DNA 분자는 서열 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 및 57 및 이들의 상보체로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 TC1507의 접합 서열을 포함하도록 제공되며, 이때, 접합 서열은 게놈으로 삽입된 이종 DNA와 삽입 부위를 플래킹하는 옥수수 세포로부터의 DNA, 즉, 플래킹 DNA를 연결하며, TC1507 이벤트에 대한 진단용이 된다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면에 따라, (a) 내충성을 부여하는 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 제1 부모 옥수수 계통과 내충성이 결여된 제2 부모 옥수수 계통을 유성 번식시켜 복수의 후손 식물을 생산하는 단계; 및 (b) 내충성인 후손 식물을 선택하는 단계를 포함하는 내충성 옥수수 식물의 생산방법이 제공된다. 상기 방법은 후손 식물과 제2 부모 옥수수 계통을 역교배하여 내충성인 진정-번식 옥수수 식물을 생산하는 추가의 단계를 임의로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 옥수수 세포를 DNA 구조물 PHI8999A (서열 25)로 형질전환시키고, 형질전환된 옥수수 세포를 옥수수 식물로 성장시키고, 내충성을 나타내는 옥수수 식물을 선택하고, 추가로 옥수수 식물을 교배가능한(fertile) 옥수수 식물로 성장시키는 것을 포함하는 내충성 옥수수 식물의 생산 방법이 제공된다. 교배가능한 옥수수 식물은 자가 수분하거나 상용성 옥수수 변종과 교배하여 내충성 후손을 생산할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한 생물학적 시료 내에서 옥수수 이벤트 TC1507을 확인하기 위한 DNA 검출 키트에 관한 것이다. 바람직하게는 본 발명의 키트는 PCR 확인 프로토콜에 사용하기 위한 TC1507의 5' 또는 3'플래킹 영역을 특이적으로 인식하는 제1 프라이머, 및 TC1507의 외래 DNA 내의 또는 플래킹 DNA 내의 서열을 특이적으로 인식하는 제2 프라이머를 포함한다. 본 발명은 또한 생물학적 시료 내의 이벤트 TC1507를 확인하기 위한 키트에 관한 것이며, 상기 키트는 이벤트 TC1507의 특정 영역과 80% 내지 100% 서열 동일성을 갖는 서열에 상응하거나 이에 상보적인 서열을 갖는 특이적 프로브를 포함한다. 바람직하게는, 프로브의 서열은 이벤트 TC1507의 5' 또는 3' 플래킹 영역의 일부를 포함하는 특이적 영역에 상응한다.
- [0026] 본 발명에 포함되는 방법 및 키트는 하기와 같은 상이한 목적을 위하여 사용될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다: 식물, 식물 재료 또는 산물(예컨대, 식물 재료를 포함하거나 이로부터 유래된 식품 또는 사료 산물(천연 또는 가공)을 포함하나 이로 제한되지는 않음) 중에서 이벤트 TC1507를 확인하고; 추가적으로 또는

별법으로, 본 발명의 방법 및 키트는 트랜스제닉 재료와 비-트랜스제닉 재료를 구별하려는 목적으로 트랜스제닉 식물 재료를 확인하는데 사용될 수 있고; 추가로 또는 별법으로, 본 발명의 방법 및 키트는 옥수수 이벤트 TC1507를 포함하는 식물 재료의 품질을 결정하는데 사용될 수 있다. 키트는 또한 검출 방법의 수행에 필요할 시약 및 재료를 함유할 수도 있다.

[0027] 본 발명은 꽃가루, 배주(ovules), 성장(vegetative) 세포, 꽃가루 세포의 핵, 및 옥수수 식물 TC1507의 난세포의 핵을 포함하나 이로 제한되지 않는 TC1507 옥수수 식물 또는 그의 부분 및 이로부터 유래된 후손에 관한 것이다. 본 발명의 DNA 프라이머 분자가 이로부터 특이적 앰플리콘 산물을 제공하는 옥수수 식물 및 종자 TC1507는 본 발명의 측면이다.

[0028] 본 발명의 상기 및 기타 측면은 하기 상세한 설명 및 첨부되는 도면으로부터 보다 명백하게 될 것이다.

발명의 상세한 설명

[0030] 하기 정의 및 방법은 본 발명을 보다 잘 정의하고, 당업자에게 본 발명의 실시를 안내하기 위하여 제공된 것이다. 달리 언급하지 않으면, 용어는 관련 분야의 당업자에 의한 통상적인 사용에 따라 이해된다. 분자 생물학에서의 통상적인 용어의 정의는 문헌 [Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag; New York, 1991; 및 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994]에서도 기재되어 있다. 37 CFR 1.822에 제시된 바와 같은 DNA 염기에 대한 명명법이 사용되었다.

[0031] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하나 이로 제한되지 않는(including but not limited to)"을 의미한다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "옥수수(corn)"는 제아 메이스(*Zea mays*) 또는 옥수수를 의미하며, 야생형 옥수수 종을 비롯하여 옥수수와 교배될 수 있는 모든 임의의 변종을 포함한다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "TC1507 특이적(specific)"은 식물, 식물 재료, 또는 산물(예컨대 식물 재료를 포함하거나 이로부터 유래된 식품 또는 사료 산물 (천연 또는 가공)을 포함하나 이로 제한되지는 않음) 중에서 이벤트 TC1507를 구별하여 확인하기에 적절한 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "내충성(insect resistant)" 및 "해충 방제(impacting insect pests)"는 곤충을 죽이거나, 성장을 저지시키거나, 생식능력을 억제하는 것 등을 포함하나 이로 제한되지 않는 임의의 발달 단계에서의 곤충의 식이, 성장 및(또는) 행동의 변화에 영향을 미치는 것을 지칭한다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "방충 활성(pesticidal activity)" 및 "살충(insecticidal) 활성"은 해충 치사율, 해충 체중 손실, 해충을 유인하는 것, 해충 쫓아내는 것, 및 적절한 시간 동안 유기체 또는 물질을 먹거나 이에 노출된 후 해충의 기타 행동 및 물리적 변화를 포함하나 이로 제한되지 않은 다수의 파라미터에 의해 측정될 수 있는 유기체 또는 물질 (예컨대, 단백질)의 활성을 나타낸다. 예를 들면 "방충 단백질"은 그 자체로 또는 다른 단백질과 조합하여 방충 활성을 나타내는 단백질이다.

[0036] "코딩 서열"은 특이적 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "코딩(encoding)" 또는 "코딩된(encoded)"은 특정화된 핵산과 관련하여 사용되는 경우 특정화된 단백질로 뉴클레오티드 서열의 번역을 안내하는데 요구되는 정보를 포함하는 핵산을 의미한다. 단백질이 코딩되는 정보는 코돈의 사용에 의해 특정화된다. 단백질을 코딩하는 핵산은 핵산의 번역된 영역 내에 비번역된 서열을 포함할 수 있거나(예: 인트론), 이러한 중간적 비번역된 서열이 없을 수도 있다(예: cDNA에서와 같이).

[0037] "유전자"는 코딩 서열의 선행 (5' 비-코딩 서열) 및 후행 (3' 비-코딩 서열) 조절 서열을 비롯하여 특이적 단백질을 발현하는 핵산 단편을 지칭한다. "천연 유전자(native gene)"는 그 자신의 조절 서열을 가지며 천연에서 발견되는 그대로의 유전자를 지칭한다. "키메라(Chimeric) 유전자"는 자연 상태에서는 함께 발견되지 않는 조절 및 코딩 서열을 포함하는 천연 유전자가 아닌 임의의 유전자를 지칭한다. 따라서, 키메라 유전자는 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되나 천연에서 발견되는 경우와는 다른 방식으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. "내인성(Endogenous) 유전자"는 유기체의 게놈 내부의 천연적 위치에 있는 천연 유전자를 지칭한다. "외래(foreign)"는 관심의 대상이 되는 위치에서는 일반적으로 발견되지 않는 물질을 지칭한다. 따라서, "외래 DNA"는 식물의 재조합 DNA 뿐 아니라 새로이 도입된, 재배열된 DNA를 포함할 수 있다. "외래" 유전자는 숙주 유기체에서는 정상적으로 발견되지 않으나, 유전자 전달에 의해 숙주 유기체로 도입된 유전자를 지칭한다. 외래 유전자는 비-천연 유

기체, 또는 키메라 유전자로 삽입된 천연 유전자를 포함할 수 있다. "트랜스유전자(transgene)"는 형질전환 절차에 의해 계놈으로 도입된 유전자이다. 재조합 DNA가 삽입된 식물 계놈의 부위는 "삽입 부위" 또는 "표적 부위"로 지칭할 수 있다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같이, "삽입 DNA"는 식물 재료를 형질전환시키는데 사용되는 발현 카세트 내의 이중 DNA를 지칭하는 한편, "플래킹 DNA"는 유기체 예컨대 식물에서 천연적으로 존재하는 계놈성 DNA 또는 원래의 삽입 DNA 분자, 예를 들면 형질전환 이벤트와 연관된 단편들에 대해 외인성인, 형질전환 과정을 통하여 도입된 외래 (이종) DNA로서 존재할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "플래킹 영역" 또는 "플래킹 서열"은 원래의 외래 삽입 DNA 분자와 인접하여 바로 상류에 또는 인접하여 바로 하류에 위치할 수 있는 적어도 20 염기쌍, 바람직하게는 적어도 50 염기쌍, 및 5000 이하의 염기쌍의 서열을 지칭한다. 외래 DNA의 무작위 통합에 이르는 형질전환 절차에 의해, 각각의 형질전환주에 특징적이고 고유한 상이한 플래킹 영역을 함유하는 형질전환주를 얻을 수 있다. 재조합 DNA가 전통적인 교배를 통하여 식물에 도입되는 경우, 그 플래킹 영역은 일반적으로 변화되지 않는다. 형질전환주는 또한 이중 삽입 DNA 조각과 계놈성 DNA의 조각, 2 조각의 계놈성 DNA, 또는 2 조각의 이중 DNA 사이의 고유한 접합을 함유할 것이다. "접합"은 2개의 특이적 DNA 단편이 연결되는 지점이다. 예를 들면, 접합은 삽입 DNA가 플래킹 DNA에 연결되는 지점에 존재한다. 접합점은 또한 천연 유기체 내에서 발견되는 것에서 변경되는 방식으로 2개의 DNA 단편이 함께 연결되는 곳에서 형질전환된 유기체 내에 존재한다. "접합 DNA"는 접합점을 포함하는 DNA를 지칭한다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산과 관련하여 "이종"은 외래 종으로부터 유래하는, 또는, 만일 동일한 종으로부터 유래하는 경우, 인간의 계획적인 개입에 의해 조성물 및(또는) 계놈성 유전자자리에서의 그의 천연 형태로부터 실질적으로 변경된 핵산을 지칭한다. 예를 들면, 이중 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터는 그 뉴클레오타이드 서열이 유래된 것과 상이한 종으로부터 유래할 수도 있고, 만일 동일한 종으로부터 유래하는 경우, 그 프로모터는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 것으로 천연적으로 발견되지 아니한다. 이중 단백질은 외래 종으로부터 유래될 수 있거나, 만일 동일한 종으로부터 유래된 경우, 인간의 계획적인 개입에 의해 원래의 형태에서 실질적으로 변경된다.

[0040] "조절(Regulatory) 서열"은 코딩 서열의 상류 (5' 비-코딩 서열)에, 그 내부에, 또는 하류 (3' 비-코딩 서열)에 위치하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭하며, 전사, RNA 가공 또는 안정성, 또는 연관된 코딩 서열의 번역에 영향을 미친다. 조절 서열은 프로모터, 번역 리더(leader) 서열, 인트론, 및 폴리아데닐화 인식 서열을 포함할 수 있다.

[0041] "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 제어할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일반적으로, 코딩 서열은 프로모터 서열에 대하여 3'에 위치한다. 프로모터 서열은 근위 요소 및 보다 원위의 상류 요소로 구성되는데, 후자의 요소는 종종 인핸서(enhancer)로 지칭된다. 따라서, "인핸서"는 프로모터 활성을 자극할 수 있는 뉴클레오타이드 서열이고, 프로모터의 고유 요소일 수도 있고 프로모터의 수준 또는 조직-특이성을 향상시키기 위해 삽입된 이중 요소일 수도 있다. 프로모터는 그 전체가 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 천연 상태에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성되거나 또는 심지어 합성 뉴클레오타이드 구획을 포함할 수 있다. 당업자는 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 유형에서 또는 상이한 발달 단계에서, 또는 상이한 환경 조건에 대응하여 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 핵산 단편이 대부분의 세포 유형에서 대부분의 시간 동안 발현되도록 하는 프로모터는 통상적으로 "항상성(constitutive) 프로모터"로 지칭된다. 식물 세포에서 유용한 다양한 유형의 새로운 프로모터가 계속 발견되고 있다; 수많은 예가 문헌[Okamuro 및 Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82]에서 발견될 수 있다. 대부분의 경우에서 조절서열의 정확한 경계가 완전히 정의되지 않기 때문에, 상이한 길이의 핵산 단편이 동일한 프로모터 활성을 가질 수도 있다는 것이 더욱 인식된다.

[0042] "번역 리더(leader) 서열"은 유전자의 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 번역 리더 서열은 번역 개시 서열의 상류에 완전히 가공된 mRNA 내에 존재한다. 번역 리더 서열은 mRNA로의 일차적 전사 과정, mRNA 안정성 및(또는) 번역 효율을 비롯한 다수의 파라미터에 영향을 준다. 번역 리더 서열의 예는 문헌[Turner 및 Foster(1995) *Mol. Biotech* 7101, 3: 225-236]에 기재되어 있다.

[0043] "3' 비-코딩 서열"은 코딩 서열의 하류에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 지칭하며, 폴리아데닐화 인식 서열 및 mRNA 가공 또는 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 기타 조절 신호를 코딩하는 서열을 포함한다. 폴리아데닐화 신호는 통상적으로 폴리아데닐산 관(tract)을 mRNA 전구체의 3' 말단에 첨가하도록 영향을 미치는 것이 특징이다. 상이한 3' 비-코딩 서열의 용도는 문헌[Ingelbrecht et al. (1989) *Plant Cell* 1:671-680]에 예

시된다.

- [0044] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 내의 코딩 서열에 의해 결정된 특정 순서로 배열된 아미노산의 쇠이다.
- [0045] DNA 구조물은 하나 이상의 발현 카세트를 제공하는 함께 결합된 DNA 분자의 조립체이다. DNA 구조물은 박테리아 세포 내에서 자기 복제를 할 수 있는 플라스미드일 수 있고 기능성 유전 요소, 즉, 프로모터, 인트론, 리더(leader), 코딩 서열, 3' 종결 영역 등을 제공하는 DNA 분자를 도입하는데 유용한 다양한 엔도뉴클라아제 효소 제한 자리를 함유하거나; 또는 DNA 구조물은 DNA 분자의 선형 조립체, 예를 들면, 발현 카세트일 수 있다. DNA 구조물 내에 함유된 발현 카세트는 메신저 RNA의 전사를 제공하도록 필수 유전 요소를 포함한다. 발현 카세트는 원핵 세포 또는 진핵 세포 내에서 발현하도록 설계될 수 있다. 본 발명의 발현 카세트는 가장 바람직하게는 식물 세포 내에서 발현하도록 설계된다.
- [0046] 본 발명의 DNA 분자는 관심있는 유기체에서의 발현을 위한 발현 카세트 내에 제공된다. 카세트는 본 발명의 코딩 서열에 작동 가능하게 결합된 5' 및 3' 조절 서열을 포함할 것이다. "작동 가능하게 결합"은 결합되는 핵산 서열이 인접해 있고, 두 단백질 코딩 영역을 결합하는 것이 필수적인 경우 인접하여 있고 동일 리더 프레임 내에 있는 것을 의미한다. 작동 가능하게 결합은 프로모터와 제2 서열 사이의 기능성 결합을 지시하도록 의도되는데, 여기서 프로모터 서열은 제2 서열에 상응하는 DNA 서열의 전사를 개시 및 매개한다. 카세트는 부가적으로 유기체 내로 공동형질전환되는 하나 이상의 유전자를 함유할 수 있다. 별법으로, 부가적인 유전자(들)가 다중 발현 카세트 또는 다중 DNA 구조물 상에 제공될 수 있다.
- [0047] 발현 카세트는, 전사의 5'에서 3'으로의 방향 내에, 숙주로서 작용하는 유기체 내에서 기능성인 전사 및 번역 개시 영역, 코딩 영역, 및 전사 및 번역 종결 영역을 포함할 것이다. 전사 개시 영역(즉, 프로모터)은 숙주 유기체에 대해 천연 또는 유사, 또는 외래 또는 이중일 수 있다. 부가적으로, 프로모터는 천연 서열 또는 합성 서열일 수 있다. 발현 카세트는 부가적으로 5' 리더 서열을 발현 카세트 구조물 내에 함유할 수 있다. 상기 리더 서열은 번역을 향상하도록 작용할 수 있다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "트랜스제닉"은 초기에 그렇게 변경된 상기 트랜스제닉 및 초기 트랜스제닉으로부터의 유성 교배 또는 무성 번식에 의해 생성된 것들을 포함하는, 이중 핵산의 존재에 의해 변경된 유전자형을 갖는 임의의 세포, 세포주, 유합조직(callus), 조직, 식물 부분, 또는 식물을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "트랜스제닉"은 통상적인 식물 육종 방법에 의한 또는 임의의 무작위 교차-교배, 비-재조합 바이러스 감염, 비-재조합 박테리아 형질전환, 비-재조합 전위, 또는 자연 돌연변이 같은 천연 발생 이벤트에 의한 게놈(염색체 또는 염색체 외)의 변경을 포함하지 않는다.
- [0049] 트랜스제닉 "이벤트"은, 관심 있는 형질전환 유전자를 포함하는 핵산 발현 카세트를 포함하는 이중 DNA 구조물(들)을 사용한 식물 세포의 형질 전환, 트랜스 유전자를 식물의 게놈 내로 삽입하는 것에서 야기되는 식물 집단의 재생, 및 특정 게놈 위치 내로의 삽입에 의해 특징지어지는 특정 식물의 선택에 의해 야기된다. 이벤트는 트랜스유전자의 발현에 의해 표현형적으로 특징지어진다. 유전 수준에서, 이벤트는 식물의 유전자 구성 양식의 일부이다. 용어 "이벤트"은 또한 형질전환체와 이중 DNA를 포함하는 다른 변종과의 유성 이중 교배에 의해 생성되는 후손을 의미한다. 반복친(recurrent parent)과의 반복되는 역교배(back-crossing) 후에도, 형질전환된 친(parent)의 삽입된 DNA 및 플랭킹 DNA는 동일 염색체 위치에서의 교배의 후손에 존재한다. 용어 "이벤트"은 또한, 삽입된 DNA를 포함하는 하나의 친주(parental line)(예를 들면, 원 형질전환체 및 자가교배(selfing)로부터 초래하는 후손) 및 삽입된 DNA를 함유하지 않는 친주의 유성 교배의 결과로서, 관심 있는 트랜스유전자를 포함하는 삽입된 DNA를 수용하는 후손으로 전달될 것이라 예상되는 삽입된 DNA 및 삽입된 DNA에 바로 인접한 플랭킹 서열을 포함하는 원래 형질전환체로부터의 DNA를 의미한다.
- [0050] 내충성 TC1507 옥수수 식물은, 우선, 트랜스제닉 TC1507 옥수수 식물로부터 성장한 옥수수 식물 및 내충성을 부여한 본 발명의 발현 카세트를 사용한 형질전환으로부터 유도된 그 후손으로 구성된 제1 친 옥수수 식물, 및 내충성을 결여하여 다수의 제1 후손 식물을 생산하는 제2 친 옥수수 식물을 유성 교배하고; 그 후 내충성인 제1 후손 식물을 선택하고; 그 제1 후손 식물을 자가교배(selfing)하여, 다수의 제2 후손 식물을 생성하고; 그 후 제2 후손 식물로부터 내충성 식물을 선택하는 것에 의해 육종될 수 있다. 이들 단계들은 제1 내충성 후손 식물 또는 제2 내충성 후손 식물의 제2 친 옥수수 식물 또는 제3 친 옥수수 식물로의 역교배를 추가로 포함할 수 있으며, 그로 인해 내충성인 옥수수 식물을 생산할 수 있다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "식물"은 전체 식물과 관련하여, 식물 기관(예를 들면, 잎, 줄기, 뿌리 등), 종자, 식물 세포, 및 그 후손을 포함한다. 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 이해되는 트랜스제닉 식물의

부분은, 예를 들면, 식물 세포, 원형질체, 조직, 유합조직, 배 및 트랜스제닉 식물에서 기원하는 꽃, 줄기, 열매, 잎, 및 뿌리를 포함하거나 또는 본 발명의 DNA 분자로 이전에 형질전환되고 그로 인해 트랜스제닉 세포를 적어도 일부 포함하는 그들의 후손 또한 본 발명의 한 태양이다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "식물 세포"는 종자, 현탁액 배양, 배, 분열 조직 영역, 유합조직, 잎, 뿌리, 발아, 배우체, 포자체, 꽃가루, 및 소포자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 형질전환 기술을 받을 수 있는 더 높은 부류의 식물 정도로 넓고, 외떡잎 및 쌍떡잎 식물 모두를 포함한다.

[0053] "형질전환"은, 유전학적으로 안정한 유전적 성질을 초래하는, 핵산 단편의 숙주 유기체 게놈 내로의 전달을 의미한다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 유기체는 "트랜스제닉" 유기체로 언급된다. 식물 형질전환의 방법의 예들은 아그로박테리아(*Agrobacterium*)-매개 형질 전환(문헌[De Blaere et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 143: 277]) 및 입자-가속 또는 "유전자 총" 형질전환 기술(본원에 참조 문헌으로 도입된 문헌[Klein et al. (1987) *Nature* (London) 327: 70-73]; 미국 특허 제 4,945,050호)을 포함한다. 부가적인 형질전환 방법이 아래 개시된다.

[0054] 따라서, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내로 도입될 수 있고 숙주 세포 내에서 복제될 수 있는 재조합 구조물, 전형적으로 DNA 구조물 내로 혼입될 수 있다. 상기 구조물은 복제 시스템 및 주어진 숙주 세포 내에서 폴리펩티드-코딩하는 서열의 전사 및 번역을 할 수 있는 서열을 포함하는 벡터일 수 있다. 식물 세포의 안정한 형질감염 또는 트랜스제닉 식물의 형성에 적합한 다수의 벡터는, 예를 들면, 문헌[Pouwels et al., (1985; Supp. 1987) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Weissbach and Weissbach(1989) *Methods for Plant Molecular Biology*, (Academic Press, New York)]; 및 [Flewin et al., (1990) *Plant Molecular Biology Manual*, (Kluwer Academic Publishers)]에 기술되었다. 전형적으로, 식물 발현 벡터는, 예를 들면, 5' 및 3' 조절 서열의 전사 조절하의 하나 이상의 클로닝된 식물 유전자 및 우성 선택가능한 마커를 포함한다. 상기 식물 발현 벡터는 또한 프로모터 조절 영역(예를 들면, 유발성 또는 항상성, 환경적으로- 또는 발달상으로 조절된, 또는 세포- 또는 조직-특이적인 발현을 조절하는 조절 영역), 전사 개시 출발 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 가공 신호, 전사 종결 부위, 및(또는) 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다.

[0055] 두 가지 상이한 트랜스제닉 식물이 또한 짝지워져 두 개의 독립적으로 분리되면서 첨가되는 외인성 유전자를 함유하는 후손을 생산할 수 있다. 적절한 후손의 자가교배(selfing)는 첨가된 외인성 유전자 둘다에 대해 동형접합인 식물을 생산할 수 있다. 친 식물로의 역교배 및 비-트랜스제닉 식물과의 이중 교배가 또한 식물 영양 번식과 고려될 수 있다. 상이한 형질 및 곡물에 통상적으로 사용되는 다른 육종 방법이 몇몇 참조 문헌들 중 하나, 예를 들면, 문헌[Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)]에서 발견될 수 있다.

[0056] "프로브"는 통상적인 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자, 예를 들면, 방사성 동위원소, 리간드, 화학발광제, 또는 효소가 부착된 단리된 핵산이다. 상기 프로브는 표적 핵산의 가닥에 상보적이고, 본 발명의 경우에는, 이벤트로부터의 DNA를 포함하는 옥수수 식물로부터든지 시료로부터든지 간에 옥수수 이벤트 TC1507로부터의 단리된 DNA의 가닥에 상보적이다. 본 발명에 따른 프로브는 데옥시리보핵산 또는 리보핵산 뿐만 아니라 폴리아미드 및 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하고 표적 DNA 서열의 존재를 검출하는데 사용될 수 있는 다른 프로브 재료를 포함한다.

[0057] "프라이머"는 핵산 혼성화에 의해 상보적 표적 DNA 가닥에 어닐링(annealing)되어 프라이머와 표적 DNA 가닥 사이의 혼성을 형성한 후, 폴리머라제, 예를 들면, DNA 폴리머라제에 의해 표적 DNA 가닥을 따라 연장되는 단리된 핵산이다. 본 발명의 프라이머 쌍은, 예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 다른 통상적인 핵산 증폭 방법에 의한 표적 핵산 서열의 증폭에 대한 그들의 용도를 의미한다. "PCR" 또는 "폴리머라제 연쇄 반응"은 특정 DNA 절편의 증폭에 사용된 기술이다(본원에 참조 문헌으로 도입된 미국 특허 제 4,683,195호 및 제 4,800,159호를 참조한다).

[0058] 프로브 및 프라이머는 실험자에 의해 결정된 혼성 조건 또는 반응 조건하에서 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하기에 충분한 뉴클레오티드 길이를 가진다. 이 길이는 선택된 검출 방법에 유용할 정도로 충분한 길이인 임의의 길이일 수 있다. 일반적으로, 11개 뉴클레오티드 이상, 바람직하게는 18개 뉴클레오티드 이상, 및 더 바람직하게는 22개 뉴클레오티드 이상의 길이가 사용된다. 상기 프로브 및 프라이머는 매우 엄격(stringency)한 혼성화 조건하에서 표적 서열에 특이적으로 혼성화한다. 바람직하게는, 본 발명에 의한 프로

브 및 프라이머는, 표적 DNA 서열과 다르고 표적 DNA 서열에 혼성화할 능력을 보유하는 프로브가 통상적인 방법에 의해 설계될 수 있을지라도, 표적 서열과 완전한 DNA 서열 유사성을 갖는 연속 뉴클레오티드이다. 프로브는 프라이머로 사용될 수 있지만, 일반적으로는 표적 DNA 또는 RNA에 결합하도록 설계되고 증폭 과정에서는 사용되지 않는다.

[0059] 특정 프라이머가 통합 단편을 증폭시켜 생물학적 시료에서 이벤트 TC1507을 확인하기 위한 "특정 프로브"로 사용될 수 있는 앰플리콘을 생산할 수 있다. 프로브가 시료에 결합하게 하는 조건하에서 프로브가 생물학적 시료의 핵산과 혼성화되는 경우, 이 결합은 검출될 수 있고 따라서 생물학적 시료 내의 이벤트 TC1507의 존재를 나타내게 한다. 결합된 프로브의 상기 확인은 당업계에 설명되어 있다. 특정 프로브는 바람직하게는, 최적 조건하에서, 이벤트의 5' 또는 3' 플랭킹 영역 내의 영역에 특이적으로 혼성화하는 서열이고 또한 바람직하게는 그것과 함께 인접한 외래 DNA의 일부를 포함한다. 바람직하게는 특정 프로브는 80% 이상, 바람직하게는 80 내지 85% 사이, 더 바람직하게는 85 내지 90% 사이, 특히 바람직하게는 90 내지 95% 사이, 및 가장 바람직하게는 95 내지 100% 사이의 이벤트의 특정 영역과 동일한(또는 상보적인) 서열을 포함한다.

[0060] 프로브 및 프라이머의 제조 및 사용 방법은, 예를 들면, 문헌[Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989](이하, [Sambrook et al., 1989]); [Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992](주기적으로 갱신)(이하, [Ausubel et al., 1992]); 및 [Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990]에 기재된다. PCR 프라이머 쌍은, 예를 들면, 벡터(Vector) NTI 버전 6(인포맥스 사(Informax Inc.), 베테스다, 메릴랜드주); 프라이머셀렉트(PrimerSelect)(디엔에이스타 사(DNASTAR Inc.), 메디슨, 위스콘신주); 및 프라이머(Primer)(버전 0.5, © 1991, 화이트헤드 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치(Whitehead Institute for Biomedical Research), 캠브리지, 메사추세츠주) 내의 PCR 프라이머 분석 툴과 같은 그 목적을 위해 의도된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 공지된 서열로부터 유도될 수 있다. 부가적으로, 서열은 시각적으로 주사될 수 있고 프라이머는 당업자에게 공지된 지침을 이용하여 수동으로 확인될 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 "키트"는 본 발명의 방법, 더 특별하게는 생물학적 시료 내에서의 이벤트 TC1507의 확인을 수행하기 위한 일련의 시약들을 의미한다. 본 발명의 키트는 사용될 수 있고, 그 성분은, 품질 조절(예를 들면, 종자 로트의 순도), 식물 재료, 또는 식물 재료를 포함하거나 또는 그로부터 유도되는 재료, 예를 들면 식품 또는 사료 산물(이에 한정되지는 않음) 내에서의 이벤트 TC1507의 검출을 위해 특이적으로 조절될 수 있다. 본원에 사용된 "식물 재료"는 식물로부터 얻거나 또는 유도된 재료를 의미한다.

[0062] 플랭킹 DNA에 기초한 프라이머 및 프로브 및 본원에 개시된 삽입 서열은 통상적인 방법, 예를 들면, 개시된 서열들을 재-클로닝 및 서열화하는 것에 의해 개시된 서열들을 확인(및, 필요한 경우, 정정)하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산 프로브 및 프라이머는 엄격 조건하에서 표적 DNA 서열에 혼성화한다. 임의의 통상적인 핵산 혼성화 또는 증폭 방법이 시료 내의 트랜스제닉 이벤트로부터 DNA의 존재를 확인하는데 사용될 수 있다. 핵산 분자 또는 그 단편은 특정 환경하에서 다른 핵산 분자에 특이적으로 혼성화할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 두 개의 핵산 분자가, 두 개의 분자가 역평행, 이중가닥 핵산 구조를 형성할 수 있다면, 서로 특이적으로 혼성화할 수 있다고 언급된다.

[0063] 핵산 분자는 완전한 상보성을 보이는 경우 다른 핵산 분자의 "상보체"라고 언급된다. 본원에 사용된 바와 같이, 분자들 중 하나의 모든 뉴클레오티드가 다른 하나의 뉴클레오티드에 상보적인 경우 분자들은 "완전한 상보성"을 보인다고 언급된다. 두 개의 분자들은, 그들이 적어도 통상적인 "낮은-엄격" 조건하에서 서로에게 어닐링된 채로 유지되는 것이 허용되기에 충분한 안정성으로 서로에게 혼성화할 수 있는 경우, "최소한으로 상보적"이라고 언급된다. 유사하게, 분자들은, 그들이 통상적인 "높은-엄격" 조건하에서 서로에게 어닐링된 채로 유지되는 것이 허용되기에 충분한 안정성으로 서로에게 혼성화할 수 있는 경우, "상보적"이라고 언급된다. 통상적인 엄격 조건은 문헌[Sambrook et al., 1989] 및 [Haymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)]에 의해 기재되고, 따라서 완전한 상보성으로부터의 변형은, 상기 변형이 분자가 이중가닥 구조를 형성하는 가능성을 배제하지 않는 한, 허용될 수 있다. 핵산 분자가 프라이머 또는 프로브로 작용하기 위해서, 그것은 서열 내에서 특별한 용매 및 사용된 염 농도하에서 안정한 이중가닥 구조를 형성할 수 있기에 충분히 상보적이기만 하면 된다.

[0064] 혼성화 반응에서, 특이성은 전형적으로 임계 인자가 최종 세척 용액의 이온 강도 및 온도인 사후-혼성화 세척의 함수이다. 열적 용점(Tm)은 50%의 상보적 표적 서열이 완벽하게 매치되는 프로브에 혼성화하는 온도(한정

된 이온 강도 및 pH 하에서)이다. DNA-DNA 혼성에 있어서, T_m 은 문헌[Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284]의 방정식: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%\text{포름}) - 500/L$ (여기서, M 은 일가 양이온의 몰 농도이고, %GC는 DNA 내의 구아노신 및 사이토신 뉴클레오티드의 백분율이고, %포름은 혼성화 용액 내의 포름아미드의 백분율이고, L은 염기 쌍을 이루는 혼성체의 길이이다)로부터 근사치를 구할 수 있다. T_m 은 각각 1%의 미스매치에 대해 약 1°C 씩 감소한다; 따라서, T_m , 혼성화, 및(또는) 세척 조건은 원하는 동일성의 서열에 혼성화하도록 조절될 수 있다. 예를 들면, 90% 초과와 동일성을 갖는 서열을 원하는 경우, T_m 은 10°C 감소될 수 있다. 일반적으로, 엄격 조건은 한정된 이온 강도 및 pH 하에서의 특정 서열 및 그 상보체에 대해 T_m 보다 약 5°C 낮도록 선택된다. 그러나, 심한 엄격 조건은 혼성화 및(또는) 세척을 T_m 보다 1, 2, 3 또는 4°C 낮은 온도에서 사용할 수 있고; 중간 엄격 조건은 혼성 및(또는) 세척을 T_m 보다 6, 7, 8, 9 또는 10°C 낮은 온도에서 사용할 수 있고; 낮은 엄격 조건은 혼성 및(또는) 세척을 T_m 보다 11, 12, 13, 14, 15 또는 20°C 낮은 온도에서 사용할 수 있다.

[0065] 방정식, 혼성화 및 세척 조성, 및 원하는 T_m 을 사용하여, 당업자는 혼성화 및(또는) 세척 용액의 엄격에 있어서의 변경이 고유하게 기술된다는 것을 이해할 것이다. 원하는 미스매치의 정도가 45°C (수용액) 또는 32°C (포름아미드 용액) 미만의 T_m 을 초래하는 경우, SSC 농도를 증가시켜 높은 온도가 사용될 수 있게 하는 것이 바람직하다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 안내는 문헌[Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York)]; 및 [Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)]에서 발견된다. 문헌[Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)]을 참조한다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 실질적으로 동종인 서열은 높은 엄격 조건하에서 비교되는 핵산 분자의 상보체에 특이적으로 혼성화할 핵산 분자이다. DNA 혼성화를 촉진하는 적당한 엄격 조건은 예를 들면, 약 45°C 에서 6X 염화나트륨/시트르산 나트륨(SSC) 및 후속하는 50°C 에서의 2X SSC 세척은 당업자에게 공지되어 있거나 또는 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 발견할 수 있다. 전형적으로, 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.5M Na 이온 미만, 전형적으로는 약 0.01 내지 1.0M Na 이온 농도(또는 다른 염)이고 온도는 짧은 프로브(예를 들면, 10 내지 50개 뉴클레오티드)에 대해서는 약 30°C 이상 및 긴 프로브(예를 들면, 50개 뉴클레오티드 이상)에 대해서는 약 60°C 이상이다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드 같은 불안정화제의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 낮은 엄격 조건은 37°C 에서의 30 내지 35% 포름아미드의 완충액, 1M NaCl, 1% SDS(소듐 도데실 술페이트)를 사용한 혼성화, 및 50 내지 55°C 에서의 1X 내지 2X SSC(20X SSC=3.0M NaCl/0.3M 시트르산 삼나트륨)으로의 세척을 포함한다. 예시적인 중간 엄격 조건은 37°C 에서의 40 내지 45% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS으로의 혼성화, 및 55 내지 60°C 에서의 0.5X 내지 1X SSC으로의 세척을 포함한다. 예시적인 높은 엄격 조건은 37°C 에서의 50% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS으로의 혼성화, 및 60 내지 65°C 에서의 0.1X SSC으로의 세척을 포함한다. 바람직한 실시태양에 있어서, 본 발명의 핵산은 중간 엄격 조건하에서 하나 이상의 TC1507 이벤트에 고유한 핵산 분자 또는 그 상보체 또는 단편에 특이적으로 혼성화할 것이다.

[0067] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 임의의 두 서열들 간의 백분율 동일성의 측정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다. 상기 수학적 알고리즘의 비-제한적인 예들은 문헌[Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17]의 알고리즘; 문헌[Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482]의 국부 상동성 알고리즘; 문헌[Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453]의 상동성 알고리즘; 문헌[Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444-2448]의 유사성 조사 방법; 문헌[Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877]에서와 같이 변경된 문헌[Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264]의 알고리즘이다.

[0068] 이들 수학적 알고리즘들의 컴퓨터 작업은 서열 동일성을 측정하기 위한 서열들의 비교에 사용될 수 있다. 상기 작업은, 이들에 제한되는 것은 아니지만, PC/진(GENE) 프로그램 내의 클루스탈(CLUSTAL)(인텔리제네틱스(Intelligenetics), 마운틴 뷰, 캘리포니아주로부터 입수가능); 얼라인(ALIGN) 프로그램(버전 2.0); 얼라인 플러스(PLUS) 프로그램(버전 3.0, © 1997); 및 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package), 버전 10의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA(액셀라이스(Accelrys), 9685 스트란톤 로드, 샌디에고, 캘리포니아주 92121, 미국으로부터 입수가능)를 포함한다. 이들 프로그램을 사용한 정렬은 내정된 매개 변수를 사용하여 수행될 수 있다.

- [0069] 클루스탈 프로그램은 문헌[Higgins and Sharp, *Gene* 73: 237-244 (1988)]; [Higgins and Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989)]; [Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988)]; [Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992)], 및 [Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology* 24: 307- 331(1994)]에 잘 기술된다. 열라인 및 열라인 플러스 프로그램은 문헌[Myers and Miller (1988) *supra*]의 알고리즘에 기초한다. 문헌[Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403]의 BLAST 프로그램은 문헌[Karlin and Altschul (1990) *supra*]의 알고리즘에 기초한다. 데이터베이스 유사성 조사를 위해 사용될 수 있는 BLAST 계열의 프로그램은 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의(query) 서열용 BLASTN; 단백질 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의 서열용 BLASTX; 단백질 데이터베이스 서열에 대한 단백질 질의 서열용 BLASTP; 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 단백질 질의 서열용 TBLASTN; 및 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의 서열용 TBLASTX를 포함한다. 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)]를 참조한다. 정렬은 또한 조사에 의해 수동으로 수행될 수 있다.
- [0070] 비교 목적을 위한 틈이 많은(gapped) 정렬을 얻기 위해, 틈이 많은 BLAST(BLAST 2.0 내)가 문헌[Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389]에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. 별법으로, PSI-BLAST(BLAST 2.0 내)가 분자간의 거리 관계를 검출하는 반복되는 조사를 수행하는데 사용될 수 있다. 문헌[Altschul et al. (1997) *supra*]을 참조한다. BLAST, 틈이 많은 BLAST, PSI-BLAST를 사용하는 경우, 각각의 프로그램(예를 들면, 뉴클레오티드 서열용 BLASTN, 단백질용 BLASTX)의 내장된 매개 변수가 사용될 수 있다. www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조한다.
- [0071] 본원에 사용된 바와 같이, 두 개의 핵산 분자 또는 폴리펩티드 서열 간의 "서열 동일성" 또는 "동일성"은, 구체화된 비교 창에 대해 최대 상응하도록 정렬되는 경우 동일한, 두 서열 내의 잔기와 관련된다. 서열 동일성의 백분율이 단백질에 대해 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 부분이 종종 보존적인 아미노산 치환(여기서, 아미노산 잔기는 유사한 화학적 성질(예를 들면, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되고 그로 인해 분자의 기능성 성질을 변화시키지 않는다)에 의해 상이해진다고 인식된다. 서열이 보존적인 치환에 의해 상이해지는 경우, 백분율 서열 동일성은 치환의 보존적 성질을 감안하여 보정을 통해 상향 조절될 수 있다. 상기 보존적인 치환에 의해 상이해지는 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는다고 언급된다. 이런 조절을 하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 전형적으로, 이는 완전한 미스매치보다는 부분적인 미스매치로서 보존적인 치환을 스코어링하고, 그로 인해 백분율 서열 동일성을 증가시키는 것을 포함한다. 따라서, 예를 들면, 동일한 아미노산에 스코어 1을 제공하고 비-보존적인 치환에는 스코어 0을 제공하는 경우, 보존적인 치환에는 0 내지 1 사이의 스코어가 제공된다. 보존적인 치환의 스코어링은, 예를 들면, 프로그램 PC/Gene(인텔리제네틱스, 마운틴 뷰, 캘리포니아주)에서 수행된 것처럼 계산된다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같이, "서열 동일성의 백분율"은 비교 창에 대해 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하는 것에 의해 측정된 값을 의미하고, 여기서 비교 창 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 부분은 두 서열의 최적의 정렬을 위해 참조 서열(첨가 또는 삭제 포함하지 않음)과 비교하여 첨가 또는 삭제(즉, 갭(gap))를 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 양 서열 내에서 발생하는 위치의 수를 측정하여 매치된 위치의 수를 산출하고, 매치된 위치의 수를 비교 창 내의 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출하는 것에 의해 계산된다.
- [0073] 특정 증폭 프라이머 쌍을 사용한 표적 핵산 서열의 증폭(예를 들면, PCR에 의한)에 대해, "엄격 조건"은 프라이머 쌍이 상응하는 야생형 서열(또는 그 상보체)을 갖는 프라이머가 결합될 표적 핵산 서열에만 혼성화하게 하고 바람직하게는 DNA 열적 증폭 반응에서 고유한 증폭 산물인 앰플리콘을 생성하는 조건이다.
- [0074] 용어 "(표적 서열)에 특이적"은 프로브 또는 프라이머가 엄격 혼성화 조건하에서 표적 서열을 포함하는 시료 내의 표적 서열에만 혼성화한다는 것을 나타낸다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같이, "증폭된 DNA" 또는 "앰플리콘"은 핵산 주형의 일부인 표적 핵산 서열의 핵산 증폭의 산물을 의미한다. 예를 들면, 유성 교배로부터 야기되는 옥수수 식물 본 발명의 옥수수 식물로부터의 트랜스제닉 이벤트 계통 DNA를 함유하는지를 측정하기 위해, 옥수수 식물 조직 시료로부터 추출한 DNA에 삽입된 이중 DNA의 삽입 자리에 인접한 플랭킹 서열로부터 유도된 제1 프라이머, 및 삽입된 이중 DNA로부터 유도된 제2 프라이머를 포함하는 DNA 프라이머 쌍을 사용하는 핵산 증폭 방법을 가하여 이벤트 DNA의 존재의 특징인 앰플리콘을 제조할 수 있다. 별법으로, 제2 프라이머는 플랭킹 서열로부터 유도될 수 있다. 앰플리콘은 소정의 길이를 가지고 이벤트에 대해 진단성이기도 한 서열을 가진다. 앰플리콘은 프라이머 쌍에 한개의 뉴클레오티드 염기쌍을 조합한 길이 내지 DNA 증폭 프로토콜에 의해 생성가능한 임의의 앰플리콘 길이일 수 있

다. 별법적으로, 프라이머 쌍은 삽입된 DNA 양측의 플랭킹 서열로부터 유래되어 크기 약 6.2Kb인, PHI8999A 발현 구조물의 전체 삽입 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 앰플리콘을 생산할 수 있다 (도 1 참조). 플랭킹 서열로부터 유래된 프라이머 쌍 중 한 일원은 삽입된 DNA 서열로부터 소정의 거리에 위치할 수 있는데, 상기 거리는 한 개 뉴클레오타이드 염기쌍 내지 증폭 반응의 한계치까지 또는 약 2만 뉴클레오타이드 염기쌍까지의 범위일 수 있다. 용어 "앰플리콘"의 사용은 DNA 열 증폭 반응에 의해 생성될 수 있는 프라이머 이량체를 특이적으로 제외한다.

[0076] 핵산 증폭은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 비롯한 업계에 공지된 임의의 다양한 핵산 증폭 방법에 의해 달성될 수 있다. 다양한 증폭 방법은 업계에 공지되어 있고 특히 미국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호 및 문헌[PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic press, San Diego, 1990]에 기술되어 있다. PCR 증폭 방법은 22 Kb 이하의 게놈 DNA 및 42 Kb 이하의 박테리오파지 DNA를 증폭시키도록 개발되어 왔다 (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). 상기 방법들 및 업계에 공지된 다른 DNA 증폭 방법은 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 구체적인 PCR 프로토콜의 다수의 변수들이 구체적인 실험 조건을 조정하기 위해 필요할 수 있고 약간 변형되어도 유사한 결과 수집을 허용함을 이해해야 한다. 상기 조정은 당업자에게는 자명할 것이다.

[0077] 상기 방법에 의한 생산된 앰플리콘은, 인접 플랭킹 DNA 서열 및 삽입된 DNA 서열 모두에 중첩되는 DNA 올리고뉴클레오타이드를 고안하는 유전자 비트 분석 (Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994))을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 기술에 의해 검출될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 마이크로웰 플레이트의 웰에 고정된다. 관심 영역의 PCR 후 (삽입된 서열 내의 한 개의 프라이머 및 인접 플랭킹 서열 내의 한 개의 프라이머 사용) 단일 가닥 PCR 생성물은 고정된 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되고, DNA 폴리머라제 및 예상되는 다음 염기에 대해 특이적인 표지된 ddNTP를 사용한 단일 염기 확장 반응에 대한 주형으로서 역할할 수 있다. 관독은 형광 또는 ELISA-기재일 수 있다. 신호는 성공적 증폭, 혼성화 및 단일 염기 확장으로 기인한 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

[0078] 또다른 검출 방법은 윈게 (Winge (Innov, Pharma, Tech. 00:18-24, 2000))에 의해 기술된 파이로씨퀀싱 (Pyrosequencing) 기술이다. 상기 방법에서, 올리고뉴클레오타이드는 인접 DNA 및 삽입 DNA 접합부를 중첩하도록 고안된다. 올리고뉴클레오타이드는 관심 영역 유래의 단일-가닥 PCR 생성물에 혼성화되고 (삽입된 서열 내의 한 개의 프라이머 및 인접 플랭킹 서열 내의 한 개의 프라이머) DNA 폴리머라제, ATP, 술폰릴라제, 루시페라제, 아피라제, 아데노신 5' 포스포술포이트 및 루시페린의 존재하에 인큐베이션된다. dNTP는 개별적으로 첨가되고 그의 도입은 광 신호를 발생시켜 이를 측정한다. 광 신호는 성공적 증폭, 혼성화 및 단일 또는 다중-염기 확장으로 기인한 트랜스유전자 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

[0079] 첸 등 (Chen et al.)(Genome Res. 9: 492-498, 1999)에 의해 기술된 형광 분광은 본 발명의 앰플리콘을 검출하는데 사용될 수 있는 방법이다. 상기 방법을 사용해 플랭킹 및 삽입된 DNA 접합부에 중첩하는 올리고뉴클레오타이드가 고안된다. 올리고뉴클레오타이드는 관심 영역 유래의 단일-가닥 PCR 생성물에 혼성화되고 (삽입된 DNA 내의 한 개의 프라이머 및 플랭킹 DNA 서열 내의 한 개의 프라이머) DNA 폴리머라제 및 형광-표지 ddNTP의 존재하에 인큐베이션된다. 단일 염기 확장은 ddNTP를 도입시킨다. 상기 도입은 형광기를 사용해 분광의 변화로서 측정될 수 있다. 분광의 변화는 성공적 증폭, 혼성화 및 단일 염기 확장으로 기인한 트랜스유전자 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

[0080] 테크맨(Taqman)[®]

(피이 어플라이드 바이오시스템스 (PE Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티 소재)는 DNA 서열의 존재를 검출 및 정량화하는 방법으로서 기술되어 있고 제조자에 의해 제공된 지시서로 완전히 이해된다. 요약하면, 플랭킹 및 삽입된 DNA 접합부에 중첩하는 FRET 올리고뉴클레오타이드 프로브가 고안된다. FRET 프로브 및 PCR 프라이머 (삽입된 DNA 서열 내의 한 개의 프라이머 및 플랭킹 게놈 서열 내의 한 개의 프라이머)가 열 안정성 폴리머라제 및 dNTP의 존재하에 사이클링된다. FRET 프로브의 혼성화는 FRET 프로브 상의 켄칭 잔기로부터 형광 잔기를 절단 및 방출시킨다. 형광 신호는 성공적 증폭 및 혼성화로 기인한 플랭킹/트랜스유전자 삽입 서열의 존재를 지시한다.

[0081] 몰레큘라 비이콘 (Molecular Beacon)은 티안지 등 (Tyangi et al.)(Nature Biotech. 14:303-308, 1996)에 기술된 바와 같이 서열 검출에 사용되는 것으로 기술되어 왔다. 요약하면, 플랭킹 및 삽입된 DNA 접합부에 중첩하는 FRET 올리고뉴클레오타이드 프로브가 고안된다. FRET 프로브의 독특한 구조는 그가 형광 및 켄칭 잔기를 가까이 유지하는 제2 구조를 함유하도록 한다. FRET 프로브 및 PCR 프라이머 (삽입된 DNA 서열 내의 한

개의 프라이머 및 플랭킹 서열 내의 한 개의 프라이머)는 열안정성 폴리머라제 및 dNTP의 존재하에 사이클링된다. 성공적 PCR 증폭 후, FRET 프로브의 표적 서열로의 혼성화는 프로브 제2 구조를 제거하고 형광 및 켄칭 잔기를 공간적으로 분리시킨다. 형광 신호가 생긴다. 형광 신호는 성공적 증폭 및 혼성화로 기인한 플랭킹/트랜스유전자 삽입 서열의 존재를 지시한다.

[0082] 앰플리콘내에 발견되는 서열에 특이적인 프로브를 사용한 혼성화 반응은 PCR 반응에 의해 앰플리콘 생산을 검출하는데 사용되는 또다른 방법이다.

[0083] 본 발명은 하기의 실시예들에 의해 추가로 정의된다. 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 태양을 지시하기는 하나 단지 예시 방식임을 이해해야 한다. 상기 논의 및 하기 실시예들로부터 당업자는 본 발명의 필수적 특성들을 확인할 수 있고 그의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명을 다양하게 변화 및 변형하여 다양한 용도 및 조건에 적용되도록 만들 수 있다. 따라서, 본원에 보여지고 기술된 것에 덧붙여 본 발명의 다양한 변형물들이 상기 기술로부터 당업자에게는 자명할 것이다. 상기 변형물들도 첨부된 청구항의 범위내에 속하는 것으로 의도된다.

[0084] 본원에 제시된 각 참고문헌의 내용은 본원에 그 전체로서 참고문헌으로 도입된다.

실시예

[0085] 실시예 1. 옥수수의 입자 충격에 의한 형질전환 및 Cry1F 유전자를 함유하는 트랜스제닉 식물의 재생

[0086] 아그로박테리움 투메파시엔스로부터 단리된 3' ORF25 전사 터미네이터(Barker et al. (1983) Plant Mol. Biol. 2: 335-350)를 포함하는 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 Cry1F로 확인된 바실러스 쉐린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) δ-엔도톡신 (미국 특허 제5,188,960호 및 제6,218,188호)을 코딩하는 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 옥수수 유비퀴틴 (Ubi-1) 유전자의 제1 인트론 (Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689 and Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5:213-218), 프로모터, 5' 비번역된 엑손을 포함하는 제1 트랜스유전자 발현 카세트, 및 (CaMV) 35S 유래 3' 전사 터미네이터(Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37:49-59)를 포함하는 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 선별성 마커 포스포노쓰리신 아세틸트랜스퍼라제 (PAT) 유전자 (Wohlleben W. et al. (1988) Gene 70:25-37)를 코딩하는 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 폴리플라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터 (Ode11 J. T. et al. (1985) Nature 313: 810-812; Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37: 49-59)의 DNA 분자를 포함하는 제2 트랜스유전자 발현 카세트를 포함하는 PHI8999A (도 1 및 서열 25 참조)로 지정된 DNA 분자 6.2 Kb를 사용해 옥수수 배아 조직을 형질전환했다.

[0087] 바이오-래드(Bio-Rad, 캘리포니아주 허큘레스 소재)에 의해 제조된 바이올리스틱스 (Biolistics)[®]

PDS-1000He 입자 총을 사용해 문헌[Klein et al.(1987) Nature, UK 327(6117): 70-73]에 본질적으로 기술된 바와 같이 유전자 총 충격 (microprojectile bombardment)에 의해 B.t. Cry1F 옥수수 식물을 얻었다. 수분 직후에 수확된 옥수수 이삭으로부터 단리된 미성숙 배아를 수일간 유합조직(callus) 초기 배지에 배양했다. 형질전환한 날에, 미세 텅스텐 입자를 정제된 PHI8999A DNA (서열 25)로 코팅하고 배양 배아내로 가속시켜 삽입 DNA를 세포 염색체에 도입했다. 삽입물 PHI8999A만을 형질전환 동안에 사용하고 추가의 플라스미드 DNA를 형질전환체에 도입하지 않았다. 충격 후, 선별제로서 글루포시네이트를 함유하는 유합조직 초기 배지로 배아를 전이했다. 개개 배아를 배양 동안 물리적으로 분리하여 저장하고 대다수의 외식체 (explant)는 선별 배지에서 사멸했다.

[0088] 건강한 글루포시네이트-내성 유합조직을 생산하고 생존시키는 상기 배아들을 추정 형질전환 이벤트를 나타내는 독특한 확인 코드로 지정하고 신선한 선별 배지에 계속 전이했다. 독특한 이벤트 각기에서 유래한 조직으로부터 식물을 재생하고 온실로 전이했다. 일 시료를 분자 분석을 위해 수거하고 트랜스유전자의 존재를 PCR로 증명하고 Cry1F 단백질의 발현을 ELISA로 확인했다. 그 후 유럽 조명충(European corn borer) 곤충을 사용해 전체 식물의 생검을 식물에 실시했다. 양성 식물을 근교계(inbred line)와 교배하여 초기 형질전환 식물로부터 종자를 얻었다. 다수의 계를 필드에서 평가했다. 내충성 및 재배 특성 (본원에 참고문헌으로 도입된 문헌[Bing JW et al. (2000) Efficacy of Cry1F Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop] 참조, 콜로라도주 포트 콜린스)을 비롯한 우수한 특성 조합에 기초해 독립적 트랜스제닉 이벤트의 군으로부터 TC1507 이벤트를 선별했다.

[0089] 실시예 2. 바실러스 쉐린기엔시스(B.t.) Cry1F 옥수수 계통 TC1507내의 트랜스제닉 삽입 DNA의 5'에 있는 플

랭킹 서열을 포함하는 뉴클레오타이드의 확인

[0090] 이벤트 TC1507 중의 PHI8999A 삽입물의 5'에 있는 서열을 포함하는 DNA 단편을 동정하기 위해, 이벤트 TC1507 계놈 DNA 유래의 Spe I 제한효소 단편을 아가로스 겔상에서 크기분별하고, 정제하고, Cry1F 프로브와의 혼성화를 확인하기 위해 서던 분석으로 스크리닝했다. 혼성화 및 단편 크기의 확인 후, 관심 단편을 pBluescript II SK (+)TM 클로닝 벡터내로 클로닝하여 농축된 크기 선별된 플라스미드 기재 계놈 DNA 라이브러리를 제조했다. 양성 클론에 대해 플라스미드 라이브러리를 스크리닝하기 위해 Cry1F 유전자 일부에 동종인 프로브를 사용했다. 양성 클론을 확인하고, 추가의 스크리닝으로 정제하고, Cry1F 프로브에 혼성화시 양성 신호를 보임을 확인했다. 단리된 양성 클론에 함유된 Spe I 단편의 약 3 Kb를 프라이머 위킹 접근법으로 서열화했다. 제1 서열화 수행을 개시하기 위해, 관심 DNA 일부를 서열화하기 위한 클로닝 벡터 DNA 내 공지된 서열에 결합하는 프라이머를 고안했다. 역 방향으로 배향된 또다른 프라이머를 사용한 동일한 영역상의 제2 서열화 수행은 제2 가닥 범위를 제공했다. 옥수수 이벤트 TC1507 중의 삽입된 트랜스제닉 DNA의 5'에 있는 플랭킹 서열이 얻어질 때까지 이전 수행 유래의 서열 데이터를 반복적으로 사용해 신규한 프라이머를 고안한 후, 관심 DNA의 더 안쪽으로 다음 번의 서열화를 확장하기 위해 상기 프라이머를 사용해 프라이머 위킹을 달성했다. 구체적 서열 정보는 실시예 4에 제공된다.

[0091] 실시예 3. B.t. Cry1F 옥수수 계통 TC1507 삽입물의 5'에 있는 플랭킹 서열의 확인

[0092] B.t. Cry1F 옥수수 계통 TC1507 삽입물의 5' 플랭킹 서열의 확인을 위해, 5' 플랭킹 영역으로부터 전장 PHI8999A 트랜스제닉 삽입물로 확장되는 중첩 PCR 생성물을 얻기 위한 PCR 프라이머 쌍을 고안했다. B.t. Cry1F 옥수수 계통 TC1507 계놈 DNA로부터 PCR 생성물을 성공적으로 증폭시키고, 단리하고, 영역 1 내지 6에 걸쳐 표 1에 보여진 것처럼 서열화하고, 실시예 2에 기술된 Spe I 단편 유래의 이미 정해진 서열과 매치됨을 확인했다. 그러나, 전장 삽입물의 개시점에 최근접하고 5'에 있는 bp 2358 내지 bp 2829 영역은 PCR 증폭에 대해 저항성이고 상기 Spe I 클론으로부터 얻어진 서열보다 큰것으로 보였다. 상기 영역을 플랭킹하는 프라이머 쌍 및 어드벤처지 ⑥

-GC 2 폴리머라제 믹스 (비디 바이오사이언스 클론테크 (BD Biosciences Clontech), 캘리포니아주 팔로 알토 소재)의 사용은 서열화를 위한 B.t. Cry1F 옥수수 계통 TC1507 계놈 DNA로부터의 PCR 생성물의 증폭에 성공적이었다. 어드벤처지 ⑥

-GC 2 시스템으로의 앰플리콘의 생산에 사용된 증폭 조건은 표 10에 나타나 있다. bp 2358 내지 2829 영역의 서열을 확인하기 위해 사용된 DNA 프라이머 쌍은 서열 1과 서열 2; 서열 2와 서열 23에 나열되어 있다. 상기 영역으로부터의 서열은 표 1에 기술되어 있다 (영역 7a, 7b, 7c, 및 8).

[0093] 실시예 4. 이벤트 TC1507 5' 플랭킹 서열. 각 영역의 기술은 표 1에 제공된다.

[0094]

영역 1(서열 28) 옥수수 게놈(의미있는 상동성 없음)

```

1  ACTAGTTTCC TAGCCCCGCT CGTGCCCCTA CCCCACCGAC
   GTTTATGGAA
51  GGTGCCATTG CACGGTTCTT CGTGGCCGCC CTAAGGATG
   TAAATGGTCG
101 GTAAATCCG GTAAATTTCC GGTACCGTTT ACCAGATTTT
   TCCAGCCGTT
151 TTCGGATTGA TCGGGATATA CAGAAAACGA GACGGAAACG
   GAATAGGTTT
201 TTTTTCGAAA ACGGTACGGT AAACGGTGAG ACAAACCTAC
   CGTCCGTTT
251 CGTATTTCTC GGGAACTCT GGTATATTCC CGTATTTGTC
   CCGTATTTTC
301 CCGACCCACG GACCTGCCAA TCAACCATCA GCCAGTCAGC
   CCATCCCCAC
351 AGCTATGGCC CATGGGGCCA TGTGGCCAC ATGCCACGC
   AACGCAAGGC
401 AGTAAGGCTG GCAGCCTGGC ACGCATTGAC GCATGTGGAC
   ACACACAGCC
451 GCCGCCTGTT CGTGTTCCTG TGCCGTTGTG CGAGACTGTG
   ACTGCGAGTG
501 GCGGAGTCGG CGAACGGCGA GGCGTCTCCG GAGTCTGGAC
   TCGCGCTGTG
551 GACAGCGACG CTGTGACGGC GACTCGGCGA AGCCCCAAGC
   TACCAAGCCC
601 CCAAGTCCCC ATCCATCTCT GCTTCTCTGG TCATCTCCTT
   CCCCTGGTCG
651 ATCTGCAGGC GCCAGACCG

```

[0095]

[0096]

영역 2(서열 29) 미기재된 옥수수 게놈 서열(상보체)

```

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

```

[0097]

[0098]

영역 3(서열 30) 옥수수 Huck-1 레트로트랜스포손의 단편

```

870 T GTCGGGGACC ATAATTAGGG GTACCCCCAA
901 GACTCCTAAT CTCAGCTGGT AACCCCCATC AGCACAAAGC
   TGCAAAGGCC
951 TGATGGGTGC GATTAAGTCA AGGCTCGGTC CACTCAAGGG
   ACACGATCTC
1001 GCCTCGCCCG AGCCCAGCCT CGGGCAAGGG CGGCCGACCC
   CGAGGATTCA
1051 CGTCTCGCCC GAGGGCCCCC TCAAGCGACG GGCACACCTT
   CGGCTCGCCC
1101 GAGGCCATT CTTCGCCGAG AAGCAACCTT GGCCAGATCG
   CCACACCGAC
1151 CGACCGTATC GCAGGAGCAT TTAATGCGAG GATCGCCTGA
   CACCTTATCC
1201 TGACGCGCGC TCTTCAGTCG ACAGAGCCGA AGTGACCGCA
   ATCACTTCGC
1251 CGCTCCACTG ACCGACCTGA CAAGAAGACA GCGCCGCTG
   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 CTCGCCCAGC CCCAGGGCTC GGAATCAGCC TCGGCCTCAG
   ACGATGGTCT
1651 CCGCCTCGCC CGACCCGGGG CTCGGACTCG A

```

[0099]

- [0100] 영역 4(서열 31) *cry1F* 유전자의 단편
- 1682 CCTTTCTAT CGGACCTTGT
 1701 CAGATCCTGT CTTCGTCCGA GGAGGCTTTG GCAATCCTCA
 CTATGTACTC
 1751 GGCTTAGGG GAGTGGCCTT TCAACAACT GGTACGAATC
 ACACCCGCAC
 1801 ATTCAGGAAC TCCGGGACCA TTGACTCTCT AGATGAGATA
 CCACCTCAAG
 1851 ACAACAGCGG CGCACCTTGG AATGACTACT CCCATGTGCT
 GAATCATGTT
 1901 ACCTTTGTGC GCTGGCCAGG TGAGATCTCA GGTTCCGACT
 CATGGAGAGC
 1951 ACCAATGTTT TCTTGACGC ATCGTAGCGC TACCCCCACA
 AACACCATTG
 2001 ATCCAGAGAG AATCAC
- [0101]
- [0102] 영역 5(서열 32) 옥수수 염색체 *rpoC2* 유전자의 단편
- 2017 TCAT TCTTCAAGAA CTGCATATCT TGCCGAGATC
 2051 CTCATCCCTA AAGGTACTTG ACAATAGTAT TATTGGAGTC
 GATACACAAC
 2101 TCACAAAAAA TACAAGAAGT CGACTAGGTG GATTGGTCCG
 AGTGAAGAGA
 2151 AAAAAAAGCC ATACAGAACT CAAAATCTTT TCCGGAGATA
 TTCATTTTCC
 2201 TGAAGAGGCG GATAAGATAT TAGGTGGCAG TTTGATACCA
 CCAGAAAGAG
 2251 AAAAAAAGA TTCTAAGGAA TCAAAAAAAA GGAAAAATTG
 GGTTTATGTT
 2301 CAACGGAAAA AATTCTCAA AAGCAAGGAA AAGTATT
- [0103]
- [0104] 영역 6(서열 33) 옥수수 염색체 또는 *ubiZM1(2)* 프로모터의 단편
- 2338 GTG GCTATTTATC
 2351 TATC
- [0105]
- [0106] 뉴클레오티드 2355-2358 (CGT)은 영역 6을 영역 7a에 연결시킨다.
- [0107] 영역 7a(서열 34) *pat* 유전자의 단편
- 2358 GCA GCTGATATGG CCGCGGTTTG TGATATCGTT AACCATTACA
 2401 TTGAGACGTC TACAGTGAAC TTAGGACAG AGCCACAAAC
 ACCACAAGAG
 2451 TGGATTGATG ATCTAGAGAG GTTGCAAGAT AGATACCCTT
 GGTGTTGTC
 2501 TGAGGTTGAG GGTGTTGTGG CTGGTATTGC TTACGCTGGG
 CCCTGGAAGG
 2551 CTAGGAAC
- [0108]
- [0109] 영역 7b(서열 35) *pat* 유전자의 단편(상보체)
- 2559 CC TCAACCTCAG CAACCAACCA ATGGTATCTA TCTTGCAACC
 2601 TCTCTAGATC ATCAATCCAC TCTTGTGGTG TTTGTGGCTC
 TGTCCTAAAG
 2651 TTCACTGTAG ACGTCTCAAT GTAATGGTTA ACGATATCAC AAACCG
- [0110]
- [0111] 영역 7c(서열 36) *cry1F* 유전자의 단편(상보체)
- 2697 AGAG
 2701 AAGAGGGATC T
- [0112]
- [0113] 영역 8(서열 37) 폴리링커의 단편
- 2712 CGAAGCTTC GGCCGGGGCC CATCGATATC CGCGGGCATG
 2751 CCTGCAGTGC AGCGTGACCC GGTCGTGCCC CTCTCTAGAG
 ATAATGAGCA
 2801 TTGCATGTCT AAGTTATAAA AAATTACCA
- [0114]
- [0115] 영역 9(서열 25) PHI8999A의 전장 삽입물
- [0116] 실시예 5. 옥수수 이벤트 TC1507 중의 삽입물의 5'에 있는 플랭킹 서열의 기술

- [0117] 이벤트 TC1507 5' 플랭킹 서열을 보다 완전히 기술하기 위해, 진뱅크 공용 데이터베이스에 대해 (release 122, 2/01) 베이식 로칼 얼라인먼트 서치 툴 (Basic Local Alignment Search Tool (BLAST))를 사용해 동종성 검색을 실시했다. BLAST 프로그램은 서열 유사성 검색을 실시하는데 미지 서열에 대한 동종체를 동정하기 위해 특히 유용하다. 공용 데이터베이스 검색과 더불어, 옥수수 이벤트 TC1507 플랭킹 서열 및 PHI8999A 트랜스제닉 삽입물 간의 동종성을 조사하기 위해 쌍별 정렬을 얼라인 엑스(AlignX) (인포맥스 인크(InforMax Inc.), 메릴랜드주 베데스타 소재)를 사용해 실시했다. 상기 동종성 검색의 결과는 표 1에 제시된다. TC1507 5' 플랭킹 서열에서 삽입물의 가장 5'에 있는 염기를 1, 전장 PHI8999A 트랜스제닉 삽입물의 개시점을 염기 2830로 번호지정했다 (도 1 참조). 퍼센트 동일성 값은 분석된 서열의 길이를 걸쳐 동일한 매치의 퍼센트를 지시한다.
- [0118] 대부분의 경우에, 이벤트 TC1507 5' 플랭킹 서열과의 유사성 검색은 매우 높은 퍼센트 동일성 값에 기초한 하나의 독특한 서열과의 매치를 보여준다. 상기 서열은 표 1에서 확인된다. 또한, TC1507 5' DNA 플랭킹 서열에는 하나 초과와 공지된 서열과 높은 유사성을 갖는 2개 영역이 존재한다. 영역 870-1681 및 2338-2354에서, 서열 단편 모두와의 퍼센트 동일성 점수는 충분히 높아 단일 매치 (동종성)이 결정될 수 없다. 상기 영역 각각에 대한 두개의 가능한 동종체가 표 1에 지시된다.
- [0119] 서열의 첫번째 669개 염기쌍을 제외하고 모두에 대해 고도로 유사한 서열을 확인했다. 보통, 유사성 검색 결과는 염기 1681의 5'에 있는 옥수수 게놈 서열과의 높은 동종성을 지시한다. 염기 1682로부터 PHI8999A 삽입물의 위치 2830에서의 개시점까지의 영역은 형질전환 이벤트와 관련된 일부 단편을 함유했다.

표 1a

이벤트 TC1507 삽입물에 대한 서열 요약

영역	서열 24 에서의 위치	크기 bp	% 동일성	상동성	동종 서열 에서의 위치	설명
1	1-669	669	N/A ¹	N/A	N/A	의미있는 상동성이 검출되지 않음
2	670-869	200	90.5	AF123535	52432-52632 (상보체)	미기재된 옥수수 게놈 서열
영역	서열 24 에서의 위치	크기 bp	% 동일성	상동성	동종 서열 에서의 위치	설명
3	870-1681	812	89.4	AF050439	1-801	옥수수 Huck-1 레트로트랜스포손 5' LTR ² 의 단편
			86.6	AF050438	1-797	옥수수 Huck-1 레트로트랜스포손 3' LTR의 단편
4	1682- 2016	335	100.0	PHI8999A	3149-3483	<i>cry1F</i> 유전자의 단편
5	2017- 2337	321	100.0	X86563	29429-29749	옥수수 염색체 <i>rpoC2</i> 유전자 (RNA 폴리머라제 베타-2 서브유닛) 의 단편
6	2338- 2354	17	100.0	X86563	97643-97659	옥수수 염색체 <i>trnI</i> 유전자 (tRNA-Ile)의 단편
			82.4	PHI8999A	182-197	옥수수 <i>ubiZM1(2)</i> 프로모터의 단편
7a	2358- 2558	201	100.0	PHI8999A	5320-5475	<i>pat</i> 유전자의 단편
7b	2559- 2696	138	99	PHI8999A	5336-5518 (상보체)	<i>pat</i> 유전자의 단편
7c	2697- 2711	15	100.0	PHI8999A	2544-2558 (상보체)	<i>cry1F</i> 유전자의 단편
8	2712- 2829	118	100.0	PHI8999A	36-153	폴리펩티드 영역 (염기 36-80) 및 <i>ubiZM1(2)</i> 프로모터 (염기 81-153) 단편
9	2830-	6186	100.0	PHI8999A	11 - 6196	PHI8999A의

[0120]

표 1b

	9015					전장 삽입물
10	9016- 9565	550	100.0	PHI8999A	3906-4456 (상보체)	역방향 ORF25 터미네이터
11	9566- 9693	128	100.0	NC_0016 66	121851- 121978 (상보체) & 100759- 100886	옥수수 염색체 <i>rps12</i> rRNA (23S 리보솜 RNA) 의 단편

[0121]

표 1c

영역	서열 24 에서의 위치	크기 bp	% 동일성	상동성	동종 서열 에서의 위치	설명
12	9696- 10087	392	99	NC_0016 66	17091-17483 (상보체)	옥수수 엽록체 계놈의 단편
13	10088- 10275	188	99	PHI8999A	5333-5520 (상보체)	<i>pat</i> 유전자의 단편
14	10278- 10358	81	100	NC_0016 66	137122- 137202 (상보체)	옥수수 엽록체 “ORF241”- 의 단편 가정 단백질 유전자
15	10359- 10612	254	N/A ¹	N/A	N/A	의미있는 상동성이 검출되지 않음
16	10613- 11361	749	N/A ¹	N/A	N/A	설명 불가
¹ N/A; 적용 불가 ² LTR; 긴 말단 반복단위						

[0122]

[0123]

[0124]

실시예 6: 비변형 대조 옥수수 계통 중의 영역 1, 2, 및 3 존재의 확인

이벤트 TC1507의 5' 플랭킹 영역 중의 영역 1, 2, 및 3 (표 1)이 옥수수 이벤트 TC1507을 생산하기 위해 형질전환용으로 사용된 비변형 대조 옥수수 계통에 존재하고 따라서 옥수수 계통 DNA와 경계를 이루는지를 결정하기 위해 PCR 분석법을 사용했다. TC1507 및 비변형 대조 옥수수 계통 Hi-II로부터 제조된 계통 DNA 상에서 표 3에 보여진 프라이머 서열을 사용해 표 2에 개요된 바와 같이 9번의 다른 PCR 분석을 실시했다 (Hi-II에 대한 정보를 위해 문헌[Armstrong (1994) The Maize Handbook, ed. Freeling and Walbot, Springer-Verlag, New York, pp. 663-671] 참조). bp 25 내지 324 (반응 A-300 bp 앰플리콘); 및 bp 25 내지 480 (반응 B-456 bp 앰플리콘)의 5' 플랭킹 영역의 영역 1 내의 DNA를 증폭시키기 위해 두개의 반응을 고안했다. 예상된 앰플리콘은 Hi-II 비변형 옥수수 계통 및 옥수수 이벤트 TC1507 모두에 존재했다. 하나의 PCR 프라이머 쌍, 반응 C, bp 759 내지 1182 (424개 bp 앰플리콘) 유래의 5' 플랭킹 영역 중의 스페닝된 영역 2 내지 영역 3 및 또한 Hi-II 및 TC1507의 예상된 크기의 생산된 PCR 생성물. 반응 D, bp 415 내지 1182 (768개 bp 앰플리콘) 유래의 5' 플랭킹 영역 중의 스페닝된 영역 1 내지 영역 3 및 또한 Hi-II 및 TC1507의 예상된 크기의 생산된 PCR 생성물. 반응 E 및 F는 TC1507 중의 PHI8999A의 전장 삽입물의 *pat* 유전자 영역에 특이적인 프라이머 쌍으로서 고안되어 비변형 Hi-II 옥수수 계통내의 앰플리콘은 예상되지 않는다. 반응 E 및 F 모두가 *pat* 유전자 영역으로 형질전환된 옥수수 계통에 특이적이고 예상된 앰플리콘을 생산하는 반면, 비변형 Hi-II 옥수수 계통내에서는 앰플리콘이 생산되지 않음을 결과는 지시한다. 또한 옥수수 이벤트 TC1507 중에서 366 bp의 앰플리콘을 생산하고 비변형 Hi-II 옥수수 계통내에서 앰플리콘을 생산하지 않을 프라이머 쌍으로서 반응 G를 고안했다.

[0125]

트랜스제닉 삽입물의 말단에서 5' 플랭킹 영역으로 스페닝될 TC1507에 대한 특이적 프라이머 쌍으로서 반응 H 및 I를 고안했다. 반응 H 및 I 모두에서, 역향 프라이머는 전장 PHI8999A 삽입물의 유비퀴틴 프로모터 영역에 위치하고 (표 1 중의 영역 9) 순향 프라이머는 *rpoC2* 유전자 단편인 영역 5에 위치한다 (표 1 참조). 반응 H 및 반응 I 모두는 옥수수 계통 TC1507 내에 앰플리콘을 생산하고 비변형 대조 옥수수 계통에서는 앰플리콘을 생산하지 않았다. 상기 결과는 반응 H 및 반응 I가 TC1507 이벤트에 대해 특이적임을 지시한다.

[0126]

미기재(undescribed) 서열 (영역 1)이 비변형 옥수수 계통 Hi-II에 존재하고 영역 1, 2 및 3이 비변형 옥수수 계통 Hi-II 내에 인접함을 PCR 결과는 보여준다. 반응 A, B, C, 및 D에서 증폭된 DNA 서열은 옥수수 이벤트 TC1507의 5' 플랭킹 영역에 특이적이지 않고 비변형 옥수수 계통 Hi-II에도 존재한다.

표 2a

옥수수 이벤트 TC1507에서 PHI8999A 삽입물의 5' 서열 및 옥수수 이벤트 TC1507에서

PHI8999A의 전장 삽입물내의 영역들에 대한 PCR 반응

반응	PCR 앰플리콘 위치	앰플리콘 크기 (bp)	TC1507 플랭킹 서열 또는 PHI8999A 삽입물에서의 영역	Hi-II에 존재하는 앰플리콘	옥수수 계통 TC1507에 존재하는 앰플리콘
A	TC1507 플랭킹 서열에서의 25-324 bp	300	영역 1	있음	있음
B	TC1507 플랭킹 서열에서의 25-480 bp	456	영역 1	있음	있음

반응	PCR 앰플리콘 위치	앰플리콘 크기 (bp)	TC1507 플랭킹 서열 또는 PHI8999A 삽입물에서의 영역	Hi-II에 존재하는 앰플리콘	옥수수 계통 TC1507에 존재하는 앰플리콘
C	TC1507 플랭킹 서열에서의 759-1182 bp	424	영역 2 내지 영역 3	있음	있음
D	TC1507 5' 플랭킹 서열에서의 415-1182 bp	768	영역 1 내지 영역 3	있음	있음
E TC1507에 고유하지 않음	PHI8999A에서의 4750-5794 bp	1045	영역 9(pat 유전자에 대한 PHI8999A 35S 프로모터의 전장 삽입물중에서)	없음	있음
F TC1507에 고유하지 않음	PHI8999A에서의 4827-5308 bp	482	영역 9(pat 유전자에 대한 PHI8999A 35S 프로모터의 전장 삽입물중에서)	없음	있음

[0127]

표 2b

반응	PCR 앰플리콘 위치	앰플리콘 크기 (bp)	TC1507 플랭킹 서열 또는 PHI8999A 삽입물에서의 영역	Hi-II에 존재하는 앰플리콘	옥수수 계통 TC1507에 존재하는 앰플리콘
G 5' 플랭킹 영역에서 cry1F 단편 의 검출	PHI8999A의 5' 플랭킹 서열 및 전장 삽입물에서의 cry1F 서열	366	5' 플랭킹 서열에서의 335bp cry1F 서열 및 전장 삽입물에서의 동일 서열에 걸쳐있음	없음	있음
H TC1507에 고유함	영역 5(rpoC2 유전자 단편)에서의 2158bp 내지 영역 9(PHI8999A의 전장 삽입물)에서의 3069bp	912	영역 5 내지 영역 9 삽입 이벤트에 고유함 [고유한 접합 영역에 걸쳐있음]	없음	있음
I TC1507에 고유함	영역 5(rpoC2 유전자 단편)에서의 2158bp 내지 영역 9(PHI8999A의 전장 삽입물)에서의 3001bp	844	영역 5 내지 영역 9 삽입 이벤트에 고유함 [고유한 접합 영역에 걸쳐있음]	없음	있음

[0128]

표 3

TC1507에서 PHI8999A 삽입물에 대한 5' 서열 및 옥수수 이벤트 TC1507에서 PHI8999A의 전장 삽입물 내의 영역에 대한 PCR 프라이머

반응	앰플리콘 크기 (bp)	프라이머 쌍	5'에서 3' 프라이머 서열
A	300	서열 10	CCCCTACCCACCGACGTTTAT
		서열 11	TTGATTGGCAGGTCCGTGGGTC
B	456	서열 10	CCCCTACCCACCGACGTTTAT
		서열 12	CACAACGGCACAGAAACACGAA
C	424	서열 13	GCGCACCCACCGGAACAAAATG
		서열 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
D	768	서열 15	CCTGGCACGCATTGACGCATGT
		서열 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
E	1045	서열 6	TAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGT
		서열 7	GAGCTGGCAACTCAAAATCCCTTT
반응	앰플리콘 크기 (bp)	프라이머 쌍	5'에서 3' 프라이머 서열
F	482	서열 8	AAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGC
		서열 9	TAATCTCAACTGGTCTCCTCTCCGG
G	366	서열 19	GGCTCGGACTCGACCTTTCTAT
		서열 20	GCAGTTCTTGAAGAATGAGTGA
H	912	서열 1	GTAGTACTATAGATTATATTATTCGT AGAG
		서열 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCC GGAG
I	844	서열 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCC GGAG
		서열 23	CTTCAAACAAGTGTGACAAA

[0129]

[0130]

실시예 7. 옥수수 이벤트 TC1507 내의 삽입된 트랜스제닉 DNA의 3'에 있는 플랭킹 서열

[0131]

옥수수 이벤트 TC1507 중의 전장 PHI8999A 삽입물의 3'에 있는 서열 정보 길이를 확장하기 위해 두개의 별도의 PCR 접근법을 사용했다. 제1 접근법에서, 전장 삽입물과 역전된 ORF25 터미네이터 (역전된 ORF25 터미네이터의 도서를 위해 도 1 참조) 사이의 접합부를 스페닝하는 생성물을 증폭시키기 위해 PCR 프라이머 쌍을 고안했다. 순향 프라이머는 전장 PHI8999A 삽입물의 말단에 위치하고 일련의 역향 프라이머는 역전 서열 중에 100 bp 간격으로 존재했다. 이 방식으로, 옥수수 이벤트TC1507에 존재하는 역전 단편의 길이를 성공적 PCR 반응에 기초해 100 bp 영역내로 결정할 수 있었다. 상기 방법은 역전 단편이 대다수의 ORF25 터미네이터를 함유하나 Cry1F 서열을 함유하지 않음을 지시했다. PCR 단편을 단리하고 이 영역으로부터 서열화했다.

[0132]

제2 접근법에서, 상기 PCR 실험에서 결정된 바와 같이 역전 ORF25 터미네이터 영역으로부터 플랭킹 DNA 서열 내로 워킹하도록 PCR 프라이머를 고안했다. 이벤트 TC1507의 둘 내지 세개의 개별 식물 및 비변형 대조 옥수수 계통으로부터 단리된 게놈 DNA를 다양한 제한 효소로 분해한 후 분해에 사용된 제한 효소에 특이적인 어댑터에 결합했다 (유니버설 게놈 워커™ 키트 (Universal Genome Walker™ kit), 클론테크 래보라토리즈 인크 (Clontech Laboratories, Inc) 및 문헌[Devon et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23: 1644-1645]). ORF25 터미네이터 특이 프라이머 및 분해된 DNA 상에 결합된 어댑터 서열에 동종인 프라이머를 사용해 1차 PCR을 실시했다. 반응의 특이성을 증가시키기 위해, 또다른 ORF25 터미네이터 특이 프라이머 및 어댑터 서열에 동종인 제2 프라이머 (제2 프라이머는 제1 PCR에 사용된 각각의 프라이머의 내부에 존재)로 다시 네스티드(nested) 제2 PCR을 실시했다. 네스티드 PCR에 의해 생산된 생성물을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하고 TC1507 DNA 시료에 독특한 단편을 단리하고 서열화했다. 전장 삽입물내에 함유된 ORF25 터미네이터 및 전장 PHI8999A 삽입물의 3' 말단에 존재하는 표적 (역전) ORF25 터미네이터 모두로부터 단편을 증폭했다. 전장 삽입물 유래의 단편은 전장 삽입물에 위치한 제한 효소 부위의 인지를 기초로 예상된 크기였다. 3' 역전 ORF25 터미네이터로부터 생산된 단편은 예상치 못한 크기의 단편을 보였다. 3' 역전 ORF25 터미네이터로부터 증폭된 단편의 서열 분석은 1043 bp의 플랭킹 DNA 서열을 초래했다. 상기의 일련의 게놈 워킹 실험으로부터 얻어진 서열을 사용해 삽입물로부터 최종 3' 플랭킹 서열을 갖는 경계 옥수수 게놈 내로 추가로 워킹하기 위한 추가의 프라이머들을 고안했다(2346개 bp).

[0133]

이벤트 TC1507 3' 플랭킹 서열을 기술하기 위해, 진뱅크 공용 데이터베이스에 대해 베이식 로칼 얼라인먼트 서치 툴 (BLAST)를 사용해 동종성 검색을 실시했다. BLAST 프로그램은 서열 유사성 검색을 실시하는데 미지 서열에 대한 동종체를 동정하기 위해 특히 유용하다. 공용 데이터베이스 검색에 덧붙여, TC1507 3' 플랭킹

서열 및 PHI8999A 트랜스제닉 삽입물 사이의 동종성을 검사하기 위해 세크맨 4.05™(SeqMan 4.05™, 마르티네즈 및 니들먼-분쉬 정렬 알고리즘 (Martinez and Needleman-Wunsch alignment algorithms) (디엔에이스타인크(DNASTAR Inc.))를 사용해 정렬을 실시했다. 상기 동종성 검색의 결과는 표 1에 나타나 있다. 퍼센트 동종성 값은 분석된 서열의 길이를 거쳐 동일한 매치의 퍼센트를 지시한다. 3' 플랭킹 서열에 대한 유사성 검색의 결과는 유의한 동종성 없이 옥수수 엽록체 DNA의 3개 영역, pat 유전자의 188 bp 단편, 및 254 bp DNA (영역 15, 표 1)과의 높은 동종성을 나타낸다. 영역 15 이후의 추가의 749 bp (영역 16) (표 1)도 또한 서열화했다. 영역 16에 대한 아무런 유사성 검색 결과를 얻지 못했다.

[0134] 대조군 및 TC1507 게놈 DNA 상의 PCR 분석은 254 bp 서열 (영역 15, 옥수수 엽록체 "ORF241"의 단편)이 옥수수 게놈에 존재함을 결정해 주었다. 3' 플랭킹 영역 중의 영역 15의 DNA 서열은 옥수수 이벤트 TC1507의 3' 플랭킹 영역에서 독특하지 않고 비변형 대조군 옥수수 게놈내에도 존재한다. TC1507 3' 플랭킹 서열은 실시예 8에 있고, 도 1에 도시된다.

[0135] 실시예 8. 옥수수 이벤트 TC1507 중의 전장 삽입물 말단의 3'에 있는 영역의 서열. 각 영역은 표 1에 기술되어 있다.

[0136] 영역 10(서열 38) ORF25 터미네이터의 단편(상보체)

```

9016 CTCAC TCCGCTTGAT CTTGGCAAAG ATATTTGACG
9051 CATTTATTAG TATGTGTTAA TTTTCATTTG CAGTGCAGTA
      TTTTCTATTC
9101 GATCTTTATG TAATTCGTTA CAATTAATAA ATATTCAAAT
      CAGATTATTG
9151 ACTGTCATTT GIATCAAATC GTGTTTAAATG GATATTTTTA
      TTATAATATT
9201 GATGATATCT CAATCAAAAC GTAGATAATA ATAATATTTA
      TTTAATATTT
9251 TTGCGTCGCA CAGTGAAAAT CTATATGAGA TTACAAAATA
      CCGACAACAT
9301 TATTTAAGAA ACATAGACAT TAACCCTGAG ACTGTTGGAC
      ATCAACGGGT
9351 AGATTCCTTC ATGCATAGCA CCTCATTCCT GGGGACAAAA
      GCACGGTTTG
9401 GCCGTTCCAT TGCTGCACGA ACGAGCTTTG CTATATCCTC
      GGGTTGGATC
9451 ATCTCATCAG GTCCAATCAA ATTTGTCCAA GAACATCATGT
      TAGTCGCAAC
9501 GAAACCGGGG CATATGTCGG GTATCTCGAG CTCGCGAAAG
      CTTGGCTGCA
9551 GGTCGACGGA TCCTT
  
```

[0137]

[0138] 영역 11(서열 39) 옥수수 엽록체 *rps12* rRNA 유전자의 단편(상보체)

```

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

[0139]

[0140] 뉴클레오티드 9694 내지 9695 (CG)는 영역 11을 영역 12에 연결시킨다.

[0141] 영역 12(서열 40) 옥수수 엽록체 게놈 단편

```

9696 CTAAC
9701 AATAAACGAA TACGGTTTAT GTATGGATTC CGGTAAAATA
      CCGGTACTCG
9751 ATTTCATAAG AGTCGAATAG GAAGTTAAGA TGAGGGTGGT
      ATCATCATAA
9801 AAATGGAGTA GTATCCTAAA TTATACTAAT CCACGTATGA
      TATGTATGCC
9851 TTTCTTTATC AACCAGAAAGT AGTGCAAAAA AAATTCTATA
      CTGCACTGCT
9901 CTCTTTTTAC TGAGAAATGC AAAAAAATAA AAGTGAAGTA
      AGGGTGCCCC
9951 ATAGATATTT GATCTTGCCT CCTGTCCCCC CCCCCCTTTT
      TTCATCAAAA
10001 ATTTCCATGA AAAAAGAAAA GATGAATTTG TCCATTCAAT
      GAACCCTAGT
10051 TCGGGACTGA CGGGGCTCGA ACCCGCAGCT TCCGCCT
  
```

[0142]

- [0143] 영역 13(서열 41) *pat* 유전자의 단편(상보체)
- 10088 GTT CCTAGCCTTC
 10101 CAGGGCCAG CGTAAGCAAT ACCAGCCACA GCACCCTCAA
 CCTCAGCAAC
 10151 CAACCAAGGG TATCTATCTT GCAACCTCTC TAGATCATCA
 ATCCACTCTT
 10201 GTGGTGTGTTG TGGCTCTGTC CTAAGTTCA CTGTAGACGT
 CTCAATGTAA
 10251 TGGTTAACGA TATCACAAAC CGCGG
- [0144]
- [0145] 뉴클레오티드 10276 내지 10277 (AA)는 영역 13을 영역 14에 연결시킨다.
- [0146] 영역 14(서열 42) 옥수수 엽록체 ORF241의 단편(상보체)

10278 CAC AAGAACGAAA GCACCTTTTC
 10301 ATTCTTTTCAT ATACTAGGGG TTTTACTTG GAAAAGACAA
 TGTTCATAC
 10351 TAAAGGAT

- [0147]
- [0148] 영역 15(서열 43) 옥수수 계놈(의미있는 상동성 없음)
- 10359 AG CTGCAGAAGC CGCCACCGTC TTGAGGACCT TCCGGGGAGC
 10401 CAGACCGGTC GAACCGTGCC TCACTTGCT AAGGAGAAAG
 GGAAAATCAG
 10451 GGCCAGGACA TACGAAGGAG GAGCCAGAAC GAAGATATCC
 TAAGATACTT
 10501 ACTCGCTCCG GGCCATGATC AATCATGCCT GTGGGGAGGT
 CTCTCGCACC
 10551 TCGATCCATG AAGGTACCAC CGAGGTCTGC CCCGCCGCCG
 GCTTCGGTAC
 10601 CGTCCTCGCC TT
- [0149]

- [0150] 영역 16(서열 44) 옥수수 계놈
- 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 GCCCGGATA CCGACGGCAC
 CAGCCCGCTC
 10851 GGGGGCTGGC TTGACGACCC CTGGCCCAGC CTCAGATCTG
 GGCTGAGGCC
 10901 GAGGCAGGCG GCCATGTCGT CGTCTTCATC ATCGTCTTCA
 TCATCGTCGT
 10951 CGTCATCAGG CGTCTCCGGC GACGGTCCC TTGGGAGCCC
 CTCCCTCTCC
 11001 TGCCGACGAC GAAGCCTTTC CAAGGCATCC CGAGCCCACG
 TCCGCTCGTG
 11051 GGCCCGAGCC TTCTTTGCGT CCTTCTTCTC CTCCTCTTC
 TCCGCGGTGA
 11101 CCCTCCGCGC AGCTCGGTCC ACCGCATCCT CCGGGACTGG
 TGGCAGGGAA
 11151 GGCTTGTGAT GCCCTACCTC CTGGAGACAG ACGAAAAGTC
 TCAGCTATGA
 11201 GAACCGAGGG CAATCTGACG CAAGAAGGAA GAAGGAGCGG
 ATACTACCA
 11251 GAGACACGCA CCCGCGATCG GGACGCATTA AGGGCTGGGA
 AAAAGTGCCG
 11301 GCCTCTAATT TCGTACCGT GCCGTCCACC CACCTGTGGA
 GGTCAATCGAT
 11351 GGGAAGGGGA A
- [0151]

- [0152] 실시예 9. 비변형 대조 옥수수 계통 내의 영역 15의 존재 확인

- [0153] 3' 플랭킹 서열의 말단 서열의 미기재 영역 (표 1의 영역 15)이 옥수수 이벤트 TC1507을 생산하기 위해 형질 전환용으로 사용된 비변형 대조 옥수수 계통에 존재하고 따라서 옥수수 계놈 DNA과 경계를 이루는지를 결정하기 위해 PCR 분석법을 사용했다. 옥수수 계통 TC1507 및 비변형 Hi-II 대조 옥수수 계통 모두에서의 영역 15

의 성공적 PCR 증폭은 영역 15가 옥수수 게놈 DNA에 역시 존재함을 보였다. 표 7에 개요된 TC1507 및 비변형 Hi-II 대조 옥수수 계통으로부터 제조된 게놈 DNA 상에서 표 8에 보여진 프라이머 서열을 사용해 5번의 다른 PCR 분석을 실시했다. 3' 플랭킹 영역 중의 영역 15내 DNA를 증폭하도록 3개의 반응을 고안했다; 반응 L은 175 bp 앰플리콘, 반응 M은 134 bp 앰플리콘, 반응 N은 107 bp 앰플리콘을 제조했다. 예상된 앰플리콘은 비변형 대조 옥수수 계통 및 옥수수 계통 TC1507 모두에 존재했다. 삽입물의 말단으로부터 3' 플랭킹 영역을 스캐닝할 TC1507에 대한 특이 프라이머 쌍들로서 반응 J 및 K를 고안했다. 반응 J에서, 순향 프라이머는 전장 PHI8999A 삽입물의 3' 말단 상의 pat 유전자 단편에 위치하고 (표 1 중 영역 13) 역향 프라이머는 정의되지 않은 영역 15에 위치했다. 반응 K에서, 순향 프라이머는 전장 삽입물의 3' 말단 상의 엽록체 가상 단백질 유전자에 위치하고 (표 1 중 영역 14) 역향 프라이머는 정의되지 않은 영역 15에 위치했다. 반응 J 및 반응 K는 옥수수 계통 TC1507에서 앰플리콘을 생산하나 비변형된 대조 옥수수 계통에서는 앰플리콘을 생산하지 않았다. 결과는 반응 J 및 K 모두가 TC1507 이벤트에 특이적임을 지시한다.

[0154]

PCR 결과는 TC1507의 3' 플랭킹 서열의 미기재 서열 (영역 15)도 비변형 Hi-II 대조 옥수수 계통으로부터 단리된 게놈 DNA에 존재함을 지시한다. 반응 L, M, 및 N에서 증폭된 DNA 서열은 TC1507의 3' 플랭킹 영역에 독특하지 않고 비변형 대조 옥수수 계통에도 존재한다.

표 7

옥수수 이벤트 **TC1507**에서 **PHI8999A** 삽입물의 **3'**서열에 대한 **PCR** 반응

반응	앰플리콘 크기 (bp)	TC1507 3' 플랭킹 서열 내 영역	대조군에 존재하는 앰플리콘	옥수수 계통 TC1507에 존재하는 앰플리콘
J	342	영역 13 (<i>pat</i> 유전자 단편) 내지 영역 15	없음	있음
K	252	영역 14 (엽록체 유전자) 내지 영역 15	없음	있음
L	175	영역 15	있음	있음
M	134	영역 15	있음	있음
N	107	영역 15	있음	있음

[0155]

표 8

옥수수 이벤트 **TC1507**에서 **PHI8999A** 삽입물의 **3'**서열에 대한 **PCR** 프라이머

반응	앰플리콘 크기 (bp)	프라이머 쌍	5' 에서 3' 프라이머 서열
J	342	서열 3	TGTGGTGTGTTGTGGCTCTGTCCTAA
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
K	252	서열 4	AGCACCTTTTCATTCTTTCATATAC
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
L	175	서열 16	AAGCCGCCACCGTCTTGAGGACCTT
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
M	134	서열 17	GTCGAACCGTGCCTCCACTTGTCTAA
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
N	107	서열 18	AGAAAGGGAAAATCAGGGCCAGGAC
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC

[0156]

- [0157] 실시예 10. PCR 프라이머
- [0158] DNA 이벤트 특이 프라이머 쌍들을 사용해 TC1507에 대해 진단성인 앰플리콘을 생산했다. 상기 이벤트 프라이머 쌍들은 서열 1과 서열 2; 서열 2와 서열 23; 서열 3과 서열 5; 및 서열 4와 서열 5를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 프라이머 쌍들에 덧붙여, DNA 증폭 반응에 사용시 TC1507에 대해 진단성인 DNA 앰플리콘을 생산하는, 서열 26과 서열 27 유래의 임의의 프라이머 쌍은 본 발명의 한 측면이다. 상기 분석을 위한 증폭 조건은 표 9에 예시되어 있으나, TC1507에 대해 진단성인 앰플리콘 DNA 분자를 생산하기 위한 DNA 프라이머 또는 그의 상보체를 사용하는 임의의 상기 방법의 변형은 업계의 통상의 기술에 속한다. 서열 1, 2, 및 23로 확인된 PCR 프라이머를 사용하는 반응의 바람직한 증폭 조건은 표 10에 예시된다. 또한, 서열 10과 11; 서열 10과 12; 서열 13과 14; 서열 14와 15; 서열 5와 16; 서열 5와 17; 및 서열 5와 18을 포함하는 내재성 옥수수 유전자의 증폭을 위한 대조 프라이머 쌍은 반응 조건에 대한 내부 표준으로서 포함된다. pat 유전자를 함유하는 트랜스제닉 이벤트 중의 앰플리콘을 생산할 프라이머 쌍(서열 6과 7; 서열 8과 9), 및 cry1F 유전자를 함유하는 트랜스제닉 이벤트 중의 앰플리콘을 생산할 프라이머 쌍(서열 19와 20)도 포함된다.
- [0159] TC1507 이벤트의 존재에 대한 시험을 위해 식물 조직 DNA 추출물의 분석은 양성 조직 DNA 추출물 대조군 (트랜스제닉 서열을 함유하는 것으로 공지된 DNA 시료)을 포함해야 한다. 양성 대조군의 성공적 증폭은 PCR이 표적 서열의 증폭을 허용하는 조건하에 수행됨을 증명한다. 제공된 주형 DNA가 비-트랜스제닉 식물로부터 제조된 계놈 DNA이거나 비-TC1507 트랜스제닉 식물로부터 제조된 계놈 DNA인, 음성 또는 야생형 DNA 추출물 대조군도 포함되어야 한다. 또한, 주형 옥수수 DNA 추출물을 함유하지 않는 음성 대조군은 PCR 프로토콜에 사용된 조건 및 시약의 유용한 척도가 될 것이다.
- [0160] 충분한 길이의 또다른 DNA 프라이머 분자들이 DNA 증폭 방법의 당업자에 의해 서열 26 및 서열 27로부터 선택될 수 있으며, 하기 표 9 또는 10에 나타낸 방법과 상이하지만 이벤트 TC1507을 진단하는 앰플리콘을 생산할 수 있는 앰플리콘 생산에 최적인 조건을 사용할 수 있다. 하기 표 9 또는 10에 나타낸 방법의 변형방법에서 이들 DNA 프라이머 서열들을 사용하는 것은 본 발명의 범위내에 있다. 이벤트 TC1507을 진단하는 서열 26 및 서열 27로부터 유래한 충분한 길이의 하나 이상의 DNA 프라이머 분자를 포함하는 앰플리콘은 본 발명의 양태이다. 이벤트 TC1507을 진단하는 PHI8999A의 임의의 유전 요소들로부터 유래한 충분한 길이의 하나 이상의 DNA 프라이머 분자를 포함하는 앰플리콘은 본 발명의 양태이다. TC1507 앰플리콘에 대한 분석법은 스트라타진 로보사이클러(Stratagene Robocycler), MJ 엔진, 퍼킨-엘머 9700, 또는 에펜도르프 마스터사이클러 구매 써모사이클러(Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler)를 사용하여, 또는 당업자에게 공지된 방법 및 장치에 의해 수행할 수 있다.

표 9

PCR 조건:

조건:	
사용된 키트:	퍼킨-엘머 애플리타크 골드 키트
부피	성분
5 μ l	주형 (10 ng/ μ l)
4 μ l	2 μ l 각각의 프라이머 (10 μ M)
2 μ l	10X PCR 골드 완충액
2 μ l	25 mM MgCl ₂
2 μ l	50X dNTP's (10 mM)
0.1 μ l	애플리타크 골드 폴리머라제
4.9 μ l	H ₂ O
20 μ l	총합
사이클링 파라미터	
진엠프(등록상표) PCR 시스템 9700	
9 분 92°C	
30사이클:	
94°C 30 초	
60°C 30 초	
72°C 1 분	
7 분 72°C	
정지 4°C	

[0161]

표 10

어드벤처[®]-GC 2 폴리머라제 믹스와 함께 사용된 PCR 조건:

조건:	
사용된 키트:	어드벤처 [®] -GC 2 폴리머라제 믹스
부피	성분
5 μ l	주형 (10 ng/ μ l)
5 μ l	2.5 μ l 각각의 프라이머 (10 μ M)
10 μ l	5x GC2 완충액
10 μ l	GC 용융물(1.0 M 최종 농도)
1.5 μ l	50X dNTP's (10 mM)
1.0 μ l	어드벤처 GC2 폴리머라제
17.5 μ l	H ₂ O
50 μ l	총합
사이클링 파라미터	
진엠프(등록상표) PCR 시스템 9700	
5 분 94°C	
35사이클:	
94°C 1 분	
60°C 2 분	
72°C 3 분	
7 분 72°C	
정지 4°C	

[0162]

[0163] 본 발명의 원리를 예시하고 설명하였지만, 본 발명이 이러한 원리로부터 벗어나지 않으면서 각색되고 상세하게 변형될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다. 본 출원인들은 모든 변형이 하기 첨부된 청구의 범위의 요지 및 범주내에 있음을 주장한다.

[0164] 본원에 인용된 모든 공개공보 및 공개된 문헌 문헌들은 각각의 개별 공개공보 또는 특허권이 구체적이고 개별

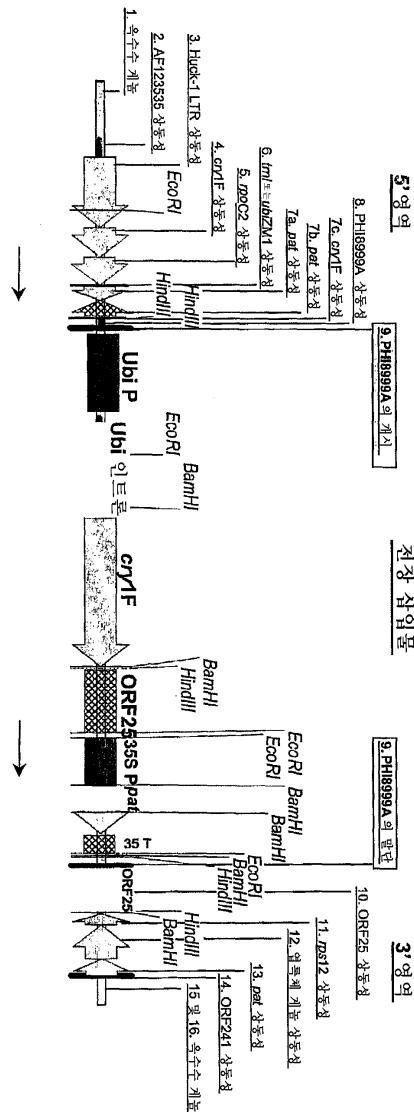
적으로 참고로 인용되도록 지시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 트랜스제닉 삽입물 PHI8999A, 및 트랜스제닉 삽입물을 플랭킹하는 서열을 나타내는 선형 지도이다.

도면

도면1



서열 목록

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> 1523-PCT

<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 actcaaaatc ttttcggag

30

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer designed for TC1507.

<400> 3
tgtgggtgttt gtggctctgt 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 ctcaaatcc 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 cagaacacg aa

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 13

g'gcacccac cggaacaaaa tg

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 14

tcctcgcatt aaatgctcct gc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 15

cctggcagcg attgacgcat 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

agaaaggga aatcagggcc aggac

25

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CrylF sequence primer

<400> 19

ggctcggact cgacctttct at

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CrylF sequence primer

<400> 20

gcagttcttg aagaatgagt ga

22

<210> 21

<211> 2829

<212> DNA

<213> 5' flanking sequence of event TC1507

<400> 21

actagtttcc tagcccgctg cgtgcccccta cccacccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatcttc 120
ggtagcgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaaacg gaataggattt tttttcgaaa acggtacggt aaacgggtgag aaaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatatctc cgtattttgc ccgtattttc 300
ccgaccacag gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccc agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagt ggcggagtcg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
tgccgctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gtttctctgg tcatctctt cccctggctg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcaccacccg gaacaaaatg 780
taaccagaa aggtcggctc ctttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtaccccaa 900

gactccta atctcagctggt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggtcggctc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
cgggcaaggc cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggtcggccc gagggccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc ttttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgactga caagaagaca gcgcgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agttaggctg acagcagcca agtcggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgccc 1380

accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgtc tcgcccgacc 1440
ccagggttgg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctgcgccgac cccagggtc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatgggtc cgcctcgcc cgaccggggg ctcggtactc 1680
acctttctat cggaccttgg cagatcctgt ctctgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860

cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttgacgc atcgtagcgc 1980
tacccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatact 2040
tgccgagatc ctcatccta aaggtaggtg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactagggtg gattgggtccg agtgaagaga aaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcatcttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag ttgatacca ccagaagag aaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340

gctattttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatategtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc tgaggttgag ggtgttgtg 2520
ctggtattgc ttacgtggg ccctggaagg ctagggaacc tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgggtg tttgtggctc 2640
tgtcctaag ttactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatcac aaaccgagag 2700
aagagggtc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagtataaa 2820

aaattacca 2829

<210> 22

<211> 2346

<212> DNA

<213> 3' flanking sequence of event TC1507

<400> 22

ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcatth attagtatgt gtttaatttc 60
atttgcagtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatcagat tattgactgt catttgcata aaatcgtgt taatggatat ttttattata 180
atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa ttttttgcg 240
tcgcacagtg aaaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt cttcatgca tagcacctca 360
ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420

tcctcgggtt ggatcatctc atcagggtcca atcaaatttg tccaagaact catgttagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtccgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggctc 540
acggatcctt caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacagggtggg taggtagaga 600
atacctaggg gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc 660
gggagaaggg gtccccccg ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggtg 720
aaataccggt actcgatttc ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggtatcat 780
cataaaaatg gagtagtata ctaaatata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc 840
ttatcaaccg gaagtagtgc aaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt tttactgaga 900

aatgcaaaaa aataaaagtg aagtaagggt gcccataga ttttgatct tgccctctgt 960
ccccccccc ctttttcat caaaaatttc catgaaaaa gaaaagatga atttgtccat 1020

tcattgaacc ctagttcggg actgacgggg ctgaaccg cagcttccgc ctgttcctag 1080
 ccttcaggg ccagcgtaa gcaataccag ccacagcacc ctcaacctca gcaaccaacc 1140
 aagggtatct atcttgcaac ctctctagat catcaatcca ctcttggtgt gtttgggtgt 1200
 ctgtcctaaa gticactgta gacgtctcaa tgaatgggt aacgatatca caaacccgg 1260
 aacacaagaa cgaaagcacc ttttcattct ttcatatact aggggttttt acttggaata 1320
 gacaatgttc catactaaag gatagctgca gaagccgcca ccgtcttgag gaccttccgg 1380

ggagccagac cggtcgaacc gtgcctccac ttgctaagga gaaagggaaa atcaggggcca 1440
 ggacatacga aggaggagcc agaacgaaga taccctaaga tacttactcg ctccggggcca 1500
 tgatcaatca tgctgtggg gaggtctctc gcacctcgat ccatgaaggt accaccgagg 1560
 tctgccccgc cgcgggttc ggtaccgtcc tcgccttggg cggccgaggc acccggggga 1620
 tggactgccc aggcgcagcc acgacgaccc aaggatcacc ctcttgccga gtcggcacga 1680
 gcaatagtgc tcggggaaca ggcagcttgg cctgactccc cggggtcacc tcaactacct 1740
 cggccgaggg gtcaagtacc cctcagtcg gccccgctc ttcggaccgg gaccccgacg 1800
 tccccggccc ggataccgac ggcaccagcc cgtcggggg ctggcttgac gacccctggc 1860

ccagctcag atctgggctg aggcggaggc aggcggccat gtcgtcgtct tcatcatcgt 1920
 cttcatcgc gtcgtcgtca tcaggcgtct ccggcgacgg ctcccttggg agccctctcc 1980
 tctcctgccg acgacgaagc ctttccaagg catcccagc ccacgtccgc tcgtggggccc 2040
 gagccttctt tgcgtcctc ttctccttc tcttctccgc ggtgacctc cgcgcagctc 2100
 ggtccaccgc atctccggg actggtggca gggaaggctt gtgatgcct acctcctgga 2160
 gacagacgaa aagtctcagc tatgagaacc gagggcaatc tgacgcaaga aggaagaagg 2220
 agcggatact caccagagac acgcacccgc gatcgggacg cattaagggc tgggaaaaag 2280
 tgccggcctc taatttcgct accgtgccgt ccaccacct gtggaggtca tcgatgggaa 2340

ggggaa 2346

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 23

cttcaaaaca 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

actagtctcc tagcccgctg cgtgccccta cccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 caccgttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120

ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tccggatata cagaaaacga 180
 gacggaaacg gaatagggtt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtagg acaaaacttac 240
 cgtccgtttt cgtattttct gggaaactct ggtatattcc cgtattttgc ccgtattttc 300
 ccgaccacag gacctgcca tcaaccatca gccagtcagc ccatcccccac agctatggcc 360
 catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

 acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
 cgagactgtg actgacgagt gcggagtcgg cgaacggcga ggctctccg gactctggac 540
 tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
 ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctctt cccctggtcg atctgcaggc 660
 gccagaccgg ccgaagcacc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
 ccgagggctc gggggctaca cccggcgggt gcgtctcgcc gcaccaccg gaacaaaatg 780
 taaccagaaa aggtcggctc ctttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
 taacactcac tttgaggctc gggggctact gtccggggacc ataattagggtgtaccccaa 900

 gactcctaatt ctacgttgtt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
 gattaagtca aggtcgggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
 cgggcaaggg cggccgaccg cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
 ggacacacct cggctcgccc gagggccatt ctctcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
 ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaattcgag gatcgctga cactttatcc 1200
 tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
 accgacctga caagaagaca gcgcgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
 agtgaggctg acagcagcca agtcgggcct cgggcgccc atggaagctcc gcctcgcccg 1380

 accctagggc tcggactcgg cctcggtctc ggaagacgac gaactacgtc tcgcccgacc 1440
 ccagggttg gactcagcct cggtccgga agacgacgaa ttccgctcg cccgacccca 1500
 gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgctcgccc gacccagagg 1560
 ctccgactca gcctcggtc cggaagacga cgaactccgc ctgcccgcac cccagggtc 1620
 ggactcagcc tcggcctcag acgatgggtc cgcctcgcc cgaccgggg ctccgactcg 1680
 acctttctat cggaccttgt cagatcctgt ctctgctcga ggaggctttg gcaatcctca 1740
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
 attcaggaa tccgggacca ttgactctct agatgagata ccactcaag acaacagcgg 1860

 cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
 tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttgacgc atcgtagcgc 1980
 tacccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
 tgccgagatc ctcatccta aaggtaactg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
 tcacaaaaaa tacaagaagt cgactagggt gattgggtccg agtgaagaga aaaaaagcc 2160
 atacagaact caaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
 taggtggcag ttgatacca ccagaagag aaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaa 2280
 ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aattttctca aagcaaggaa aagtattgtg 2340

 gctatttata tatccgtgca gctgatattg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
 ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
 atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
 ctggtattgc ttacgtggg ccctggaagg ctaggaacct tcaacctcag caaccaacca 2580
 atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgggtg tttgtggctc 2640
 tgtcctaagg ttactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatcac aaaccgagag 2700
 aagagggatc tcgaagctc ggccggggcc catcgatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgacct ggtcgtgccc ctctctagag ataattagca ttgcatgtct aagttataaa 2820

 aaattaccac aactggaaga gcggttacc ggaccgaagc ttccggccgg gcccatcgat 2880
 atccgcgggc atgctcgag tcgacgctga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
 gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatatt tttgtcaca ctgtttgaa 3000
 gtgcagttaa tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
 tagtactaca ataatacag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
 taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatcttt tagtgtgcat 3180
 gtgttctct tttttttgca aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240

tacatccatt tagggtttag ggtaaatggt ttttatagac taatttttt agtacatcta 3300

ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatttttag tttttttatt 3360
taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataaccctt 3420
taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttggttc gagtagataa tgccagcctg 3480
ttaaacgccg tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
ccaagcgaag cagacggcac ggcattctctg tcgctgcctc tggacccctc tcgagagtgc 3600
cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
acgtgagcgg gcacggcagg cggcctctc ctcctctcac ggcacggcag ctacggggga 3720
ttcctttccc accgctcctt cgctttccct tcctcgcccg ccgtaataaa tagacacccc 3780

ctccacaccc tctttcccca acctcgtgtt gtteggagcg cacacacaca caaccagatc 3840
tcccccaaat ccaccctgcg gcacctccgc ttcaaggtac gccgctcgtc tcccccccc 3900
ccccctctct accttctcta gatcggcgtt ccggtccatg gttaggggccc ggtagtctta 3960
cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttcgt 4020
acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt tctgattgct aacttgccag tgtttctctt 4080
tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc cgcagacggg atcgatttca tgattttttt 4140
tgtttcgttg catagggttt gggtttgccct tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact 4200
tgtttgtcgg gtcattcttt catgcttttt ttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt 4260

tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctggtg gattttattaa 4320
ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg 4380
gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgcgggt tttactgatg catatacaga 4440
gatgcttttt gtgcgttgg ttgtgatgat gtggtgtggt tgggcggtcg ttcattcgtt 4500
ctagatcgga gtagaatact gtttcaaaact acctggtgta tttatttaatt ttggaactgt 4560
atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatctag 4620
gataggatata catgttgatg tgggttttac tgatgcata atcatgatggc atatgcagca 4680
tctattcata tgctctaacc ttgagtacct atctattata ataaacaagt atgttttata 4740

attattttga tcttgatata cttggatgat ggcatatgca gcagctatat gtggattttt 4800
ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg cttggtactg tttcttttgt cgatgctcac 4860
cctgtttgtt ggtgttactt ctgcaggctg actctagagg atccaacaat ggagaacaac 4920
atacagaatc agtgcgtccc ctacaactgc ctcaacaatc ctgaagtaga gattctcaac 4980
gaagagaggt cgactggcag attgccgtta gacatctccc tgtcccttac acgtttcctg 5040
ttgtctgagt ttgttccagg tgtgggagtt gcgtttggcc tcttcgacct catctggggc 5100
ttcatcactc catctgatg gagcctcttt cttctccaga ttgaacagtt gattgaacaa 5160
aggattgaga ccttggaagc gaatcgggcc atcactaccc ttcgtggctt agcagacagc 5220

tatgagatct acattgaagc actaagagag tgggaagcca atcctaaca tgcccaactg 5280
agagaagatg tgcgtatagc ctttgcctaac acagatgatg ctttgatcac agccatcaac 5340
aacttcaccc ttaccagctt cgagatccct cttctctcgg tctatgttca agctgctaac 5400
ctgcacttgt cactactgcg cgacgtgtg tcgtttgggc aaggttgggg actggacata 5460
gctactgtca acaatcacta caacagactc atcaatctga ttcatcgata cacgaaacat 5520
tgtttggata cctacaatca gggattggag aacctgagag gtactaacac tcgccaatgg 5580
gccaggttca atcagttcag gagagacctt acacttactg tgttagacat agttgctctc 5640
tttcgaact acgatgttcg tacctatccg attcaaact catcccaact tacaaggag 5700

atctacacca gttcagtc tgaagactct ccagtttctg cgaacatacc caatggtttc 5760
aacagggtg agtttggagt cagaccaccc catctcatgg acttcatgaa ctctttgttt 5820
gtgactgcag agactgttag atccccaaact gtgtggggag gacacttagt tagctcacgc 5880
aacacggctg gcaatcgtat caactttcct agttacgggg tcttcaatcc cggggcgccc 5940
atctggattg catatgaaga tccacgtcct ttctatcgga ccttgtcaga tctgtcttc 6000
gtccgaggag gctttggcaa tctcactat gtactcggtc ttaggggagtt ggcccttcaa 6060
caaactggta cgaatcacac ccgcacattc aggaactccg ggaccattga ctctctagat 6120
gagataccac ctcaagacaa cagcggcgca ccttggatg actactcca tgtgtgaat 6180

catgttacct ttgtgcgtg gccaggtgag atctcaggtt ccgactcatg gagagcacca 6240

atgttctctt ggacgcacg tagcgctacc cccacaaaca ccattgatcc agagagaatc 6300
 actcagattc ccttgggtgaa ggcacacaca cttcagtcag gaactacagt tgtaagaggg 6360
 ccgggggttca cgggaggaga cattcttcga cgcactagtg gaggaccatt cgcgtacacc 6420
 attgtcaaca tcaatgggca acttcccca aggtatcgtg ccaggatacg ctatgcctct 6480
 actaccaatc taagaatcta cgttacggtt gcaggagaac ggatctttgc tggtcagttc 6540
 aacaagacaa tggataccgg tgatccactt acattccaat ctttctccta cggcactatc 6600
 aacaccgctg tcacctttcc aatgagccag agcagtttca cagtaggtgc tgataccttc 6660

agttcaggca acgaagtgtta cattgacagg tttgagttga ttccagttac tgccacactc 6720
 gagtaaggat ccgtcgacct gcagccaagc tttcgcgagc tcgagatccc cgacatatgc 6780
 cccgggtttcg ttgcgactaa catgagttct tggacaaatt tgattggacc tgatgagatg 6840
 atccaacccg aggatatagc aaagctcgtt cgtgcagcaa tggaaacggc aaaccgtgct 6900
 tttgtcccca agaattgagggt gctatgcatt aaggaatcta cccgttgatg tccaacagtc 6960
 tcagggttaa tgtctatgta tcttaataa tgtgtcgggt attttgtaat ctcatataga 7020
 ttttactgtg gcgacgcaa aatatataat aatatattt attatctacg ttttgattga 7080
 gatatcatca atattataat aaaaatatcc attaaacacg atttgataca aatgacagtc 7140

aataatctga ttgaatatt tattaattgt aacgaattac ataagatcg aatagaaaat 7200
 actgcactgc aaatgaaaa taacacatac taataaatgc gtcaaatatc ttgccaaga 7260
 tcaagcggag tgagggcctc atatccggtc tcagttacaa gcacggatc cccgaagcgc 7320
 gctccaccaa tgcctcgcac atagatgccg ggctcgacgc tgaggacatt gcctaccttg 7380
 agcatggctc cagcgccggc tttaaagctc atccatccc aatctgaata tcctatccc 7440
 cgcccagtc ggtgtaagaa cgggtctgtc catccacctc tgttgggaat tccggtccgg 7500
 gtcacctttg tcaccaaga tggaaactgc gccgcggacc gaattccat ggagtcaaag 7560
 attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaaagactg gcgaacagtt catacagagt 7620

ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tgggtggagca cgacacgctt 7680
 gtctactcca aaaaatcaaa agatacagtc tcagaagacc aaagggaat tgagactttt 7740
 caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt 7800
 attgtgaaga tagtggaaaa ggaagggtgc tctacaaat gccatcattg cgataaagga 7860
 aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc cccacccacg 7920
 aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 7980
 gatattctca ctgacgtaag ggatgacgca caatccact atccttcgca agaccttcc 8040
 tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacagggt acccggggat ccacatgtc 8100

tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg 8160
 tgatactgtt aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac 8220
 accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc 8280
 tgagggttag ggtgttggg ctgggtattgc ttacgctggg ccttgggaagg ctaggaaacg 8340
 ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtcacat aggcatcaa ggttgggcct 8400
 aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaagggt ttaagtctgt 8460
 ggttgcgtgt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 8520
 cacagcccgg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttg 8580

tttttggcaa agggattttg agttgccagc tctccaagg ccagttaggc cagttacce 8640
 gatctgagtc gacctgcagg catgccgct gaaatcacca gtctctctc acaaatctat 8700
 ctctctctat aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg aattagggtt cttatagggt 8760
 ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt atttgattt gtaaaatact 8820
 tctatcaata aaatttctaa ttctaaaaac caaaatccag tggcgagctc gaattcgagc 8880
 tcgagcccgg gtggatctc tagagtcgac ctgcagaagc ttcgggtccg gcgcctcta 8940
 gttgaagaca cgttcattgc ttcatcgtaa gaagacactc agtagtctc ggccagaatg 9000
 gcctaactca aggccctcac tccgtttgat cttggcaaag atatttgacg catttattag 9060

tatgtgttaa ttttcatttg cagtgcagta ttttctattc gatctttatg taattcgta 9120
 caattaataa atattcaaat cagattattg actgtcattt gtatcaaatc gtgtttaatg 9180
 gatattttta ttataatatt gatgatattc caatcaaac gtagataata ataattttta 9240
 tttaatattt ttgcgtcgca cagtgaatct ctatatgaga ttacaaaata ccgacaacat 9300
 tatttaagaa acatagacat taacctgag actgttggac atcaacgggt agattccttc 9360

```

atgcatagca cctcattctt ggggacaaaa gcacggtttg gccgttccat tgctgcacga 9420
acgagctttg ctatatcttc ggggttggatc atctcatcag gtccaatcaa atttgtccaa 9480
gaactcatgt tagtcgcaac gaaaccgggg catatgtcgg gtatctcgag ctgcgaaag 9540

cttggctgca ggtcgacgga tccttcaaca aaagggtacc tgtacccgaa accgacacag 9600
gtgggtaggt agagaatacc taggggcgcg agacaactct ctctaaggaa ctgggcaaaa 9660
tagccccgta acttcgggag aaggggtgcc ccccgctaac aataaacgaa tacggtttat 9720
gtatggattc cggtaaaata ccggtactcg atttcataag agtcgaatag gaagttaaga 9780
tgagggtggt atcatcataa aaatggagta gtatcctaaa ttataactaat ccacgtatga 9840
tatgtatgcc tticcttate aaccggaagt agtgcaaaaa aaattctata ctgcactgct 9900
ctctttttac tgagaaatgc aaaaaataa aagtgaagta aggggtgccc atagatattt 9960
gatcttgctt cctgtcccc cccccctttt ttcatacaaa atttccatga aaaaagaaaa 10020

gatgaatttg tcatttcatt gaaccttagt tcgggactga cggggctcga accgcagct 10080
tccgcctgtt ctagccttc cagggcccag cgttaagcaat accagccaca gcacctcaa 10140
cctcagcaac caaccaaggg tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt 10200
gtggtgtttg tggtctgtc ctaaagtcca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga 10260
tatcacaaac cgcggaacac aagaacgaaa gcaccttttc attctttcat atactagggg 10320
tttttacttg gaaaagacaa tgttcatac taaaggatag ctgcagaagc gccaccgctc 10380
ttgaggacct tccggggagc cagaccggtc gaaccgtgcc tccacttgct aaggagaaag 10440

ggaaaatcag ggccaggaca tacgaaggag gagccagaac gaagatatcc taagatactt 10500
actcgctccg ggccatgac aatcatgcct gtggggaggt ctctcgacc tcgatccatg 10560
aaggtaccac cgaggtctgc cccgcgcgcg gcttcggtac cgtcctcgcc ttgggcgccc 10620
gaggcacccc ggggatggac tgcccaggcg cagccacgac gaccaagga tcacctcct 10680
gcgcagtcgg cagagcaat agttctcggg gaacaggcag cttggcctga ctccccgggg 10740
tcacctcaac tacctcgcc gaggggtcaa gtacccctc agtccgccc cgtctctcgg 10800
accgggaccc cgacgtccc gcccggata ccgacggcac cagcccgtc gggggctggc 10860

ttgacgacce ctggcccage ctcatatctg ggctgaggcc gaggcaggcg gccatgtcgt 10920
cgtcttcac atcgtcttca tcatcgtcgt cgtcatcagg cgtctcggc gacggctccc 10980
ttgggagccc ctccctctcc tgccgacgac gaagcctttc caaggcatcc cgagcccacg 11040
tccgctcgtg gggccgagcc ttctttgcgt ccttcttctc cttctcttc tccgcggtga 11100
ccctccgcgc agtcggtcc accgcatcct ccgggactgg tggcagggaa ggctttgat 11160
gccctacctc ctggagacag acgaaaagtc tcagctatga gaaccgaggg caatctgacg 11220
caagaaggaa gaaggagcgg atactacca gagacacgca ccccgcatcg ggacgcatta 11280

agggtctggga aaaagtgccg gcctctaatt tcgctaccgt gccgtccacc cacctgtgga 11340
ggtcacgat 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 acccggtcgt gccctctct agagataatg agcattgcat 120
gtctaagtta taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt 180

```

atctatcttt atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac 240
aataatatca gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca 300
attgagtatt ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc 360
tttttttttg caaatagctt cacctatata atacttcac ctttttatta gtacatccat 420

ttagggttta gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct atttttattct 480
attttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaataattt 540
agataaaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt 600
aaaaaaacta aggaaacatt tttcttggtt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc 660
gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgcgtcgg gccaagcgaa 720
gcagacggca cggcatctct gtgcgtgcct ctggaccct ctcgagagt ccgctccacc 780
gttggacttg ctccgctgtc ggcattccaga aatgctgtgg cggagcggca gacgtgagcc 840
ggcacggcag gggcctcct cctcctctca cggcacggca gctacggggg attcctttcc 900

caccgctcct tcgttttccc ttctctgccc gccgtaataa atagacaccc cctccacacc 960
ctctttcccc aacctcgtgt gtgtcggagc gcacacacac acaaccagat ctccccaaa 1020
tccaccgctc ggcacctcgc cttcaaggta cgcgcctcgt cctcccccc cccctctctc 1080
tacctctctc agatcggtgt tccggtccat ggttagggcc cggtagttct acttctgttc 1140
atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgttag atccgtgctg ctacggttcg tacacggatg 1200
cgacctgtac gtcagacacg ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc 1260
ctgggatggc tctagccgtt ccgcagacgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt 1320
gcatagggtt tggtttgccc ttttcttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg 1380

ggtcactctt tcatgctttt ttttgtcttg gttgtgatga tgtggtctgg ttgggcggtc 1440
gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc 1500
tgtatgtgtg tgccatacat attcatagt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg 1560
atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt 1620
tgttcgcttg gttgtgatga tgtggtgtgg ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg 1680
agtagaatac tgtttcaaac tacctgggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg 1740
tcatacatct tcatagttac gagtttaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggat 1800
acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat 1860

atgctctaac cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg 1920
atcttgatat acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg 1980
ccttcatacg ctattttatt ctttggtagt gtttcttttg tcgatgtcga cctgttgtt 2040
tgggtgttact tctgcaggtc gactctagag gatccaacaa tggagaacaa catacagaat 2100
cagtgcgtcc cctacaactg cctcaacaat cctgaagtag agattctcaa cgaagagagg 2160
tcgactggca gattgccgtt agacatctcc ctgtccctta cacgtttcct gttgtctgag 2220
tttgttccag gtgtgggagt tgcgtttggc ctcttcgacc tcatctgggg cttcatcact 2280
ccatctgatt ggagcctctt tcttctccag attgaacagt tgattgaaca aaggattgag 2340

accttgaaa ggaatcgggc catcactacc cttcgtggct tagcagacag ctatgagatc 2400
tacattgaag cactaagaga gtgggaagcc aatcctaaca atgcccaact gagagaagat 2460
gtgcgtatag gctttgctaa cacagatgat gctttgatca cagccatcaa caacttcacc 2520
cttaccagct tcgagatccc tcttctctcg gtctatgttc aagctgctaa cctgcacttg 2580
tcactactgc gcgacgtgt gtgcgtttggg caaggttggg gactggacat agctactgtc 2640
aacaatcact acaacagact catcaatctg attcatcgat acacgaaaca ttgtttggat 2700
acctacaatc agggattgga gaacctgaga ggtactaaca ctgcaccaat ggccagggtc 2760
aatcagttca ggagagacct tacacttact gtgttagaca tagttgctct ctttccgaac 2820

tacgatgttc gtacctatcc gattcaaacg tcatccaac ttacaaggga gatctacacc 2880
agttcagtca ttgaagactc tccagtttct gcgaacatac ccaatggttt caacagggtc 2940
gagtttggag tcagaccacc ccatctcatg gacttcatga actctttgtt tgtactgca 3000
gagactgtta gatcccaaac tgtgtgggga ggacacttag ttagctcacg caacacggct 3060
ggcaatcgta tcaactttcc tagttacggg gtcttcaatc ccgggggcgc catctggatt 3120
gcagatgaag atccacgtcc tttctatcgg acctgtcag atcctgtctt cgtccgagga 3180
ggctttggca atcctcacta tgtactcggc cttaggggag tggcctttca acaaactggt 3240
acgaatcaca cccgcacatt caggaaactcc gggaccattg actctctaga tgagatacca 3300

cctcaagaca acagcggcgc accttggaat gactactccc atgtgctgaa tcatgttacc 3360
 tttgtgcgct ggccaggatga gatctcaggt tccgactcat ggagagcacc aatgtttctt 3420
 tggacgcctc gtagcgctac cccacaaaac accattgata cagagagaat cactcagatt 3480
 cccttggatga aggcacacac acttcagtcg ggaactacag ttgtaagagg gccgggggttc 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 caacaccgcg 3780

ttcacctttc caatgagcca gagcagtttc acagtaggtg ctgatacctt cagttcaggc 3840
 aacgaagtgt acattgacag gtttgagttg attccagtta ctgccacact cgagtaagga 3900
 tccgtcgacc tgcagccaag cttttcgca gctcgagatc cccgacatat gccccggttt 3960
 cgttgcgact aacatgagtt cttggacaaa ttgattgga cctgatgaga tgatccaacc 4020
 cgaggatata gcaaagctcg ttctgtcagc aatggaacgg ccaaaccgtg cttttgtccc 4080
 caagaatgag gtgctatgca tgaaggaatc taccgttga tgtccaacag tctcagggtt 4140
 aatgtctatg tatcttaaat aatgttgtcg gtattttgta atctcatata gattttcact 4200
 gtgcgacgca aaaatatata ataaatatta ttattatcta cgttttgatt gagatatcat 4260

caatattata ataaaaatat ccattaaaca cgatttgata caaatgacag tcaataatct 4320
 gatttgaata tttattaatt gtaacgaatt acataaagat cgaatagaaa atactgcact 4380
 gcaaatgaaa attaacacat actaataaat gcgtcaaata tctttgcaa gatcaagcgg 4440
 agtgagggcc tcatatccgg tctcagttac aagcacggta tccccgaagc gcgctccacc 4500
 aatgcctcgc acatagatgc cgggctcgac gctgaggaca ttgctacat tgagcatggt 4560
 ctccagcgccg gctttaagct caatccatc ccaatctgaa tatctatcc cgcgcccagt 4620
 ccggtgtaag aacgggtctg tccatccacc tctgttggga attccggtcc gggtcacctt 4680
 tgtccacca gatggaactg cggccgcgga ccgaattccc atggagtcaa agattcaaat 4740

agaggaccta acagaactcg ccgtaaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg 4800
 actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cacgacacgc ttgtctactc 4860
 caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaaggcca attgagactt ttcaacaaag 4920
 ggtaatatcc ggaacacctc tccgattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa 4980
 gatagtggaa aaggaagggt gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat 5040
 cgttgaagat gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat 5100
 cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc 5160
 cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata 5220

aggaagtcca tttcatttgg agaggacagg gtacccgggg atccaccatg tctccggaga 5280
 ggagaccagt tgagattagg ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatctcg 5340
 ttaaccatta cattgagacg tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag 5400
 agtggtattga tgatctagag aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg 5460
 aggggtgtgt ggctggtatt gcttacgtg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt 5520
 ggacagtga gactactgtt tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcca 5580
 cattgtacac acatttgcct aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg 5640
 ttataggcct tccaaacgat ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga tacacagccc 5700

ggggtacatt gcgcgcagct ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc 5760
 aaagggattt tgagttgcca gctcctccaa ggccagttag gccagttacc cagatctgag 5820
 tcgacctgca ggcatgccgc tgaaatcacc agtctctctc tacaatatc tctctctc 5880
 taataatgtg tgagtagtgc ccagataagg gaattagggt tcttataggg tttcgtctcat 5940
 gtgttgagca tataaagaac ccttagtatg tatgtgtatt tgtaaaatac ttctatcaat 6000
 aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtggcgagct cgaattcgag ctcgagcccc 6060
 ggtggatcct ctagagtcca cctgcagaag ctccggtccg gcgcgcctct agttgaagac 6120
 acgttcatgt cttcatcgta agaagacact cagtagtctt cggccagaat ggccctaactc 6180

aaggcc 6186

<210> 26
 <211> 3830
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequence that represents part of the PHI8999A
 insert as well as flanking sequence 5' to the
 insert.

<400> 26
 actagtttcc tagccccgct cgtgccccta cccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaatccg gtaaatcttc 120
 ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
 gacggaacg gaataggttt ttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaaattac 240
 cgtccgtttt cgtattttctc gggaactct ggtatatcc cgtatttgc ccgtattttc 300
 ccgaccacg gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccc agctatggcc 360
 catggggcca tgttggccac atgccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

 acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
 cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggctctccg gactctggac 540
 tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agcccaagc taccaagccc 600
 ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctctt cccctggtcg atctgcagcg 660
 gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
 ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgtctcgcg gccaccacc gaacaaaatg 780
 taaccgagaa aggtcggctc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
 taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtaccccaa 900

 gactccta atctcagctgtt aacccccatc agcacaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
 gattaagtca aggtcggctc cactcaaggg acacgatctc gcctcgccc agcccagcct 1020
 cgggcaaggg cgcccgacc cgaggattca cgtctcgccc gagggcccc tcaagcgacg 1080
 ggacacactt cggtcgccc gagggccatt ctctcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
 ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgccga cacttatec 1200
 tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgtccactg 1260
 accgacctga caagaagaca gcgcgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
 agtgaggctg acagcagcca agtcggcctc cgggcgcat aggaagctcc gcctcgccc 1380

 accctagggc tcggactcgg cctcggtctc ggaagacgac gaactacgt tcgcccgacc 1440
 ccagggttg gactcagcct cggtccgga agacgacgaa ttccgctcg cccgaccca 1500
 gggtcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgctcgccc gacccaggg 1560
 ctggactca gctcggctc cggaagacga cgaactcgc ctgcccgcg cccagggtc 1620
 ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgctcgcc cgaccgggg ctggactcg 1680
 acctttctat cggaccttgt cagatcctgt ctctgctcga ggaggcttt gcaatcctca 1740
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 1800
 attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860

 cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
 tgagatctca ggttcgact catggagagc accaatgttc tcttgacgc atcgtagcgc 1980
 tacccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttaagaa ctgcatact 2040
 tgccgagatc ctcatccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
 tcacaaaaaa tacaagaagt cgactagggt gatttggtccg agtgaagaga aaaaaagcc 2160
 atacagaact caaatcttt tccggagata ttcatcttc tgaaggcg gataagatat 2220
 taggtggcag ttgatacca ccagaaagag aaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaa 2280
 ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340

gctatttate tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatategtt aaccattaca 2400
 ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
 atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttgggtgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
 ctggtattgc ttacgtctgg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580
 atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
 tgtctaaag ttcaactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatcac aaaccgagag 2700
 aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatc cgccggcatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgaccc ggtcgtgcc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820

aaattaccac aactggaaga gcggttacc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
 atccgcgggc atgcctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
 gcattgcatg tctaagtta aaaaaattac cacatatctt tttgttcaca ctgttttgaa 3000
 gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
 tagtactaca ataatacag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggctc 3120
 taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat 3180
 gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
 tacatccatt tagggtttag ggttaatggt ttttatagac taattttttt agtacatcta 3300

ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatttttag tttttttatt 3360
 taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgaata aaaattaaac aaataccctt 3420
 taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg 3480
 ttaaacgccg tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
 ccaagcgaag cagacggcac ggcattctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagtgc 3600
 cgctccaccg ttggacttgc tccgtgtcgc gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
 acgtgagccg gcacggcagg cggcctctc ctctctcac ggcacggcag ctacggggga 3720
 ttctttccc accgtctctt cgctttccct tctctgccc cgttaataaa tagacacccc 3780

ctccacacc tctttccca acctcgtgtt gttcggagcg cacacacaca 3830

<210> 27

<211> 3347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence that represents part of the PHI8999A

insert as well as flanking sequence 3' to the
 insert.

<400> 27

cccactatcc ttgcaagac ctttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga 60
 cagggtacc ggggatccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat taggccagct 120
 acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgtttaacc attacattga gacgtctaca 180
 gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtga ttgatgatct agagaggttg 240
 caagatagat acccttgggt ggttctgtgag gttgagggtg tttggctgg tattgcttac 300
 gctgggccct ggaaggctag gaacgtttac gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg 360
 tcacatagcg atcaaaggtt gggcctagga tccacattgt acacacattt gcttaagtct 420

atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa cgatccatct 480
 gttaggttgc atgaggtttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc agctggatac 540
 aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct 600
 ccaagggcag ttaggccagt taccagatc tgagtcgacc tgcaggcatg cccgtgaaa 660
 tcaccagtct ctctctacaa atctatctct ctctataata atgtgtgagt agttccaga 720

taagggaatt aggggttctta tagggtttcg ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta 780
 gtatgtatgtt gtattttgtaa aatacttcta tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaa 840
 atccagtggc gagctcgaat tcgagctcga gcccggtggg atcctctaga gtcgacctgc 900

 agaagcttcg gtccggcgcg cctctagtgt aagacacgtt catgtcttca tcgtaagaag 960
 acactcagta gtcttcggcc agaattggcct aactcaaggc cctcactccg ctigatcttg 1020
 gcaaagatat ttgacgcatt tattagtatg tgttaatttt catttgacgt gcagtatttt 1080
 ctattcgatc tttatgtaat tcgttacaat taataaatat tcaaatcaga ttattgactg 1140
 tcatttgtat caaatctgtt ttaattggata tttttattat aatattgatg atatctcaat 1200
 caaaacgtag ataataataa tattttattt atatttttgc gtcgcacagt gaaaatctat 1260
 atgagattac aaaaatacca caacattatt taagaaacat agacattaac cctgagactg 1320
 ttggacatca acgggtagat tcttcatgc atagcacctc attcttgggg acaaaagcac 1380

 ggtttggcgg ttccattgct gcacgaacga gctttgctat atcctcgggt tggatcatct 1440
 catcaggctc aatcaaatgt ttccaagaac tcatgttagt cgcaacgaaa ccggggcata 1500
 tgtcgggtat ctgagctcg cgaaagcttg gctgcaggtc gacggatcct tcaacaaaag 1560
 ggtacctgta cccgaaacgg acacagggtg gtaggtagag aatacctagg ggcgcgagac 1620
 aactctctct aaggaaactg gcaaaatagc cccgtaactt cgggagaagg ggtgcccc 1680
 gctaacaata aacgaatcgg gtttatgtat ggattccggt aaaataccgg tactcgattt 1740
 cataagagtc gaataggag ttaagatgag ggtggtatca tcataaaaat ggagtagtat 1800
 cctaaattat actaatccac gtatgatatg tatgccttc cttatcaacc ggaagtagtg 1860

 caaaaaaat tctatactgc actgctctct ttttactgag aaatgcaaaa aaataaaagt 1920
 gaagtaaggg tgccccatag atatttgatc ttgcctcctg tcccccccc cttttttca 1980
 tcaaaaattt ccatgaaaa agaaaagatg aatttgtcca ttcatgtaac ctagttcgg 2040
 gactgacggg gctcgaaccc gcagcttccg cctgttctta gccttccagg gccagcgta 2100
 agcaatacca gccacagcac cctcaacctc agcaaccaac caagggtatc tatcttgcaa 2160
 cctctctaga tcatcaatcc actcttgtgg tgtttgtggc tctgtcctaa agttcactgt 2220
 agacgtctca atgtaatggt taacgatatc acaaacggcg gaacacaaga acgaaagcac 2280
 cttttcattc tttcatafac taggggtttt tacttggaaa agacaatgtt ccatactaaa 2340

 ggatagctgc agaagccgcc accgtcttga ggaccttccg gggagccaga ccggtcgaac 2400
 cgtgcctcca ctgtctaagg agaaagggaa aatcagggcc aggacatacg aaggaggagc 2460
 cagaacgaag atatcctaag atacttactc gctccgggcc atgatcaatc atgcctgtgg 2520
 ggaggtctct cgcacctcga tccatgaagg taccaccgag gtctgccccg ccgccggctt 2580
 cggtagcgtc ctgccttgg gcgcccaggg caccgggggg atggactgcc caggcgagc 2640
 cagcagacc caaggatcac cctcctgccc agtcggcacg agcaatagt tctggggaac 2700
 aggcagcttg gctgactcc ccggggteac ctcaactacc tcggccgagg ggtcaagtac 2760
 cccctcagtc cgccccgct ctccggaccg ggaccccgac gtcccgcccc cggataccga 2820

 cggcaccagc ccgtcggggg gctggttga cgacccttgg cccagcctca gatctgggct 2880
 gaggccgagg caggcgcca gtctgtctc ttcatcatcg tttcatcat cgtcgtcgtc 2940
 atcaggcgtc tccggcgacg gctcccttgg gagccctcc ctctcctgcc gacgacgaag 3000
 cttttccaag gcatcccgag cccacgtccg ctctgtgggc cgagccttct ttgctcctt 3060
 ctctccttc ctcttctccg cggtagacct ccgagcagct cggtagcccg catctccgg 3120
 gactggtggc aggggaaggct tgtgatgcc tacctcctgg agacagacga aaagtctcag 3180
 ctatgagaac cgagggaat ctgacgcaag aaggagaag gagcggtac tcaccagaga 3240
 cacgcacccg cgatcgggac gcattaaagg ctgggaaaaa gtgccggcct ctaatttcgc 3300

 taccgtgccg tccaccacc tgtggaggtc atcgatggga aggggaa 3347

<210> 28
 <211> 669
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 28

```
actagtttcc tagccccgct cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaaaga 180
gacggaacg gaataggttt ttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatatcc cgtatttgc cgtatttcc 300
ccgaccacg gacctgcaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccc agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420

acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gactctggac 540
tcgggtgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcagc 660
gccagaccg                                     669
```

<210> 29

<211> 200

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 29

```
gccgaagcat cagaaaacgc actaagacct cgaaggagtc aaaccactcc tccgaggcct 60
cgggggctac acccggcggg tgcgtcgcg cgcacccacc ggaacaaaat gtaaccgaga 120
aaggctcggt cctttgcaa aaaagtgcga caaaagcctc caagcgagta ttaaacactca 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 ctgcaaagc ctgatgggtg cgattaagtc aaggctcgtt cactcaagg 120
gacacgatct cgctcgccc gagccagcc tcgggcaagg gcggccgacc ccgaggattc 180
acgtctcgcc cgaggggccc ctcaagcgac gggcacacct tcggctcgcc cgaggcccat 240
tcttcgccga gaagcaacct tggccagatc gccacaccga ccgaccgtat cgcaggagca 300
tttaatgcga ggatcgctg acacettatc ctgacgcgcg ctcttcagtc gacagagccg 360
aagtgaccgc aatcacttcg ccgctccact gaccgacctg acaagaagac agcggccgct 420

gcgtcgtctc gactgctgtg ccactcgaca gactgaggct gacagcagcc aagtccggcc 480
tcgggcgcca taggaagctc cgcctcgccc gaccctaggg ctgggactcg gcctcggctc 540
cggaagacga cgaactacg ttcgcccgac ccagggctt ggactcagcc tcggctccgg 600
aagacgacga attccgctc gcccagcccc agggctcgga ctggcctcg gctccagaag 660
acgacgaact ccgctcgcc cgacccaggg gctcggactc agcctcggct ccggaagacg 720
acgaactccg cctcgccga cccagggtc cggactcagc ctgggctca gacgatggtc 780
tccgctcgcc 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
 cctttctatc ggaccttgct agatcctgtc ttctgtccgag gaggtcttgg caatcctcac 60
 tatgtactcg gtcttagggg agtggccttt caacaaactg gtacgaatca caccgcaca 120
 ttcaggaact cgggacat tgactctcta gatgagatac cactcaaga caacagcggc 180
 gcaccttgga atgactactc ccatgtgctg aatcatgtta ctttgtgctg ctggccaggt 240
 gagatctcag gttccgactc atggagagca ccaatgttct cttggacgca tcgtagcgt 300
 accccacaa 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 cttgacaata 60
 gtattattgg agtcgataca caatcaca aaaatacaag aagtcgacta ggtggattgg 120
 tccgagtga gagaaaaaaa agccatacag aactcaaat ctttccgga gatattcatt 180
 ttctgaaga ggcggataag atattaggtg gcagtttgat accaccagaa agagaaaaaa 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 trnI gene

<400> 33
 gtggctatct 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 ttgtgatac gttaaccatt acattgagac gtctacagtg 60
 aacttttagga cagagccaca aacaccacaa gattggattg atgatctaga gaggttgcaa 120
 gatagatacc cttggttggt tgctgaggtt gaggggtgtg tggctggtat tgcttacgt 180
 gggccctgga agctaggaa 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 caatggtatc tatcttgcaa cctctctaga tcatcaatcc 60
 actcttgtagg tttttgtggc tctgtcctaa agttcactgt agacgtctca atgtaatggt 120
 taacgatac 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 -
 - 54 -

fragment of polylinker

<400> 37

cgaagcttcg gccggggccc atcgatatcc gcgggcatgc ctgcagtga gcgtgaccgc 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 caaagatatg tgacgcattt attagtatgt gttaattttc 60
atttgacgtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatacagat tattgactgt catttgcata aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180
atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa ttttttgcg 240
tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ctttcattgca tagcacctca 360
ttcttgggga caaaagcagc gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420

tcctcgggtt ggatcatctc atcagggtcca atcaaatttg tccaagaact catgttagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggtcg 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 cacaggtggg 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 gtggtatcat cataaaaatg gagtagtata 120
ctaaattata ctaateccag tatgatatgt atgcctttcc ttatcaaccg gaagtagtgc 180
aaaaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt ttactgaga aatgcaaaaa aataaaagt 240
aagtaagggt gccccataga tatttgatct tgcctcctgt ccccccccc ctttttcat 300
caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat tcattgaacc ctagtccggg 360
actgacgggg ctcgaaccg 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 cagcgtaac aataccagcc acagcaccct caacctcagc 60
aaccaacaa ggtatctat cttgcaacct ctctagatca tcaatccact cttgtggtgt 120
ttgtggtct gtctaaagt tcaactgtaga cgtctcaatg taatgggtta cgatatac 180
aaccgcgg 188
```

<210> 42

<211> 81

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Fragment of maize chloroplast ORF241 (complement)

<400> 42

```
cacaagaacg aaagcacctt ttattcttt 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 cctaagatag ttactcgctc cgggcatga tcaatcatgc ctgtggggag 180
gtctctcgca cctgatcca tgaaggtaacc accgaggtct gcccgcgcgc 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 gcccgcctcg 240
gggctggctt gacgacccct ggcccagcct cagatctggg ctgaggccga ggcaggcggc 300
catgtcgtcg tcttcatcat cgtcttcata atcgtcgtcg tcatcaggcg tctccggcga 360
cggctccctt gggagccctt cctctcctg ccgacgacga agcctttcca aggcattccg 420

agcccacgtc cgctcgtggg cccgagcctt ctttgcgtcc ttcttctcct tctcttctc 480
cgcggtgacc ctccgcgcag ctcggtccac cgcattcctc gggactggtg gcagggaagg 540
cttgtgatgc cctacctctt ggagacagac gaaaagtctc agctatgaga accgagggca 600
atctgacgca agaaggaaga aggagcggat atcaccaga gacacgcacc cgcgatcggg 660
acgcattaag ggctgggaaa aagtgccggc ctctaatttc gctaccgtgc cgtccacca 720
cctgtggagg tcatcgatgg 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 gtggctatatt 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
gcttcgcct 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
3