



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

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

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
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 인디아나주 46268-1054 인디아나폴리스 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 데라웨아주 (우편번호 19898) 월밍تون시
 마아켓트 스트리아트 1007
 (72) 발명자
 바르부어, 에릭
 미국 50131 아이오와주 존스톤 엔.더블유. 97번
 스트리트6519
 빙, 제임스 더블유.
 미국 50021 아이오와주 앤캐니 엔.이. 118번 애
 비뉴 1565
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 56 항

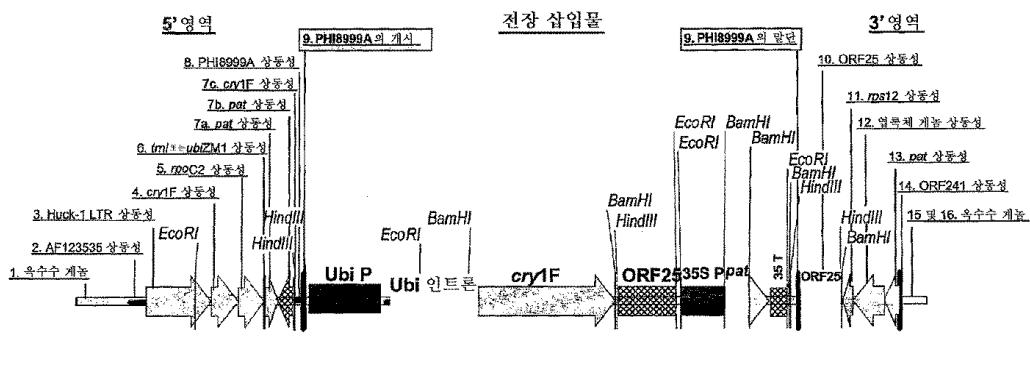
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 옥수수 이벤트 TC1507 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.

대 표 도



(72) 발명자

카르디뉴, 가이 에이.미국 85282 아리조나주 템페 웨스트 코티지 래인
18**크레스만, 로버트 에프. 주니어**미국 19805 멜라웨어주 월밍تون 턴스톤 드라이브
2502**굽타, 만주**미국 46032 인디아나주 카르멜 위나맥 코트 13463
하트트네트 택크, 메리 이.미국 08056 뉴저지주 미클레톤 밀우드 드라이브
31**혼드레드, 데이비드**미국 50021 아이오와주 엔캐니 엔.더블유. 72번
애비뉴1432**키살, 조셉 더블유.**미국 50325 아이오와주 클리브 서밋 드라이브
13563**코지엘, 마이클 지.**미국 27613 노쓰 캐롤라이나주 랠레이 리아트리스
래인1601**메이어, 테리 이.**미국 50322 아이오와주 어번데일 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 래인 1364
샌더스, 크레이그 디.미국 19701 멜라웨어주 베어 폐니 래인 15
샤오, 아이후아미국 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 인디아나주 지온스빌 헌츠맨 드라이브
4100**반 잔테, 월리암 엠.**미국 50322 아이오와주 어번데일 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 염격한 혼성화 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드 프로브를 옥수수 DNA를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시료 및 프로브에 염격한 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 뉴클레오티드들 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 뉴클레오티드들 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 뉴클레오티드 서열을 갖는 DNA가 식물 게놈의 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 뉴클레오티드 서열을 갖는 DNA가 식물 게놈의 일부를 형성하는 것인, 제45항의 내충성 옥수수 식물의 혈통(descent) 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 뉴클레오티드 서열을 분석하여 후손을 선택하는 단계

를 포함하는, 내충성 옥수수 식물의 생산 방법.

청구항 49

서열 26 또는 서열 27로부터 각각 10개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, DNA 증폭 절차에서 함께 사용시 이 벤트 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 뉴클레오티드를 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) 염격한 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 폴리뉴클레오티드 프로브와 옥수수 조직의 시료를 접촉시키는 단계;

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

(c) 프로브의 혼성화에 대해 분석하는 단계

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

청구항 53

염격한 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 폴리뉴클레오티드 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

[0001] 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

- [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(flanking) 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 투린기엔시스(*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 발견은, 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 전자 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 이를 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 이종 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

옴 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' 비 번역된 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, 포스피노트리신 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'-GTAGTACTATAGATTATATTACCGTAGAG-3' (서열 1);
 5'-GCCATACAGAACTCAAATCTTTCCGGAG-3' (서열 2);
 5'-CTTCAAACAAGTGTGACAAA-3' (서열 23);
 5'-TGTGGTGTGTTGTGGCTCTGCCTAA-3' (서열 3);
 5'-AGCACCTTCATTCTTCATATAC-3' (서열 4);
 5'-GACCTCCCCA 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 계놈 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 계놈의 충분한 길이의 폴리뉴클레오티드 및 트랜스유전자 삽입 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오티드를 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 계놈의 충분한 길이의 폴리뉴클레오티드 및 트랜스유전자 삽입 서열의 충분한 길이의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 서열이 포함된다.

[0016]

본 발명의 다른 측면에 따라, 서열 26 또는 그의 상보체의 DNA 서열의 트랜스유전자 부분의 적어도 11개 이상의 뉴클레오티드 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'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 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 염격한 혼성화 조건하에 혼성화되고, 대조 옥수수 식물 DNA와는 염격한 혼성화 조건하에 혼성화되지 않는 문자인 DNA 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 시료 및 프로브에 염격한 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 염격한 혼성화 조건하에 혼성화되고, 대조 옥수수 식물 DNA와는 염격한 혼성화 조건하에 혼성화되지 않는 DNA 프로브 문자와 접촉시키는 단계, (b) 시료 및 프로브에 염격한 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 플랭킹하는 옥수수 세포로부터의 DNA, 즉, 플랭킹 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'플랭킹 영역을 특이적으로 인식하는 제1 프라이머, 및 TC1507의 외래 DNA 내의 또는 플랭킹 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' 플랭킹 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 필요한 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 문자가 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. 문자 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 TC1507을 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 죽이내는 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 중간의 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 계놈 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 DNA뿐 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 형질전화시키는데 사용되는 발현 카세트 내의 이종 DNA를 지칭하는 한편, "플랭킹 DNA"는 유기체 예컨대 식물에서 천연적으로 존재하는 계놈성 DNA 또는 원래의 삽입 DNA 문자, 예를 들면 형질전환 이벤트과 연관된 단편들에 대해 외인성인, 형질전환 과정을 통하여 도입된 외래(이종) DNA로서 존재할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "플랭킹 영역" 또는 "플랭킹 서열"은 원래의 외래 삽입 DNA 문자와 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 플랭킹 영역을 함유하는 형질전환주를 얻을 수 있다. 재조합 DNA가 전통적인 교배를 통하여 식물에 도입되는 경우, 그 플랭킹 영역은 일반적으로 변화되지 않는다. 형질전환주는 또한 이종 삽입 DNA 조각과 계놈성 DNA의 조각, 2 조각의 계놈성 DNA, 또는 2 조각의 이종 DNA 사이의 고유한 접합을 함유할 것이다. "접합"은 2개의 특이적 DNA 단편이 연결되는 지점이다. 예를 들면, 접합은 삽입 DNA가 플랭킹 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, 이종 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터는 그 뉴클레오티드 서열이 유래된 것과 상이한 종으로부터 유래할 수도 있고, 만일 동일한 종으로부터 유래하는 경우, 그 프로모터는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 것으로 천연적으로 발견되지 아니한다. 이종 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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 서열이고, 프로모터의 고유 요소일 수도 있고 프로모터의 수준 또는 조직-특이성을 향상시키기 위해 삽입된 이종 요소일 수도 있다. 프로모터는 그 전체가 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 천연 상태에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성되거나 또는 심지어 합성 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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[Engelbrecht 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 쇄이다.

[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 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 이종일 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, 이종 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 계놈(염색체 또는 염색체 외)의 변경을 포함하지 않는다.

[0049] 트랜스제닉 "이벤트"은, 관심 있는 형질전환 유전자를 포함하는 핵산 발현 카세트를 포함하는 이종 DNA 구조물(들)을 사용한 식물 세포의 형질 전환, 트랜스 유전자를 식물의 계놈 내로 삽입하는 것에서 야기되는 식물 집단의 재생, 및 특정 계놈 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 이종 DNA를 포함하는 다른 변종과의 유성 이종 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, 혼탁액 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 계놈 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 흔입될 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 [Fleavin 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 짹지워져 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 이종 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*, Wilcox 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.), 베데스다, 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, 메사추세스주) 내의 PCR 프라이머 분석 툴과 같은 그 목적을 위해 의도된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 공지된 서열으로부터 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 염격 조건하에서 표적 DNA 서열에 혼성화한다. 임의의 통상적인 핵산 혼성화 또는 증폭 방법이 시료 내의 트랜스제닉 이벤트으로부터 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-염격" 조건하에서 서로에게 어닐링된 채로 유지되는 것이 허용되기에 충분한 안정성으로 서로에게 혼성화할 수 있는 경우, "최소한으로 상보적"이라고 언급된다. 유사하게, 분자들은, 그들이 통상적인 "높은-염격" 조건하에서 서로에게 어닐링된 채로 유지되는 것이 허용되기에 충분한 안정성으로 서로에게 혼성화할 수 있는 경우, "상보적"이라고 언급된다. 통상적인 염격 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 융점(T_m)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, M은 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°C씩 감소한다; 따라서, T_m , 혼성화, 및(또는) 세척 조건은 원하는 동일성의 서열에 혼성화하도록 조절될 수 있다. 예를 들면, 90% 초과의 동일성을 갖는 서열을 원하는 경우, T_m 은 10°C 감소될 수 있다. 일반적으로, 염격 조건은 한정된 이온 강도 및 pH 하에서의 특정 서열 및 그 상보체에 대해 T_m 보다 약 5°C 낮도록 선택된다. 그러나, 심한 염격 조건은 혼성화 및(또는) 세척을 T_m 보다 1, 2, 3 또는 4°C 낮은 온도에서 사용할 수 있고; 중간 염격 조건은 혼성 및(또는) 세척을 T_m 보다 6, 7, 8, 9 또는 10°C 낮은 온도에서 사용할 수 있고; 낮은 염격 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 염격에 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 염격 조건하에서 비교되는 핵산 분자의 상보체에 특이적으로 혼성화할 핵산 분자이다. DNA 혼성화를 촉진하는 적당한 염격 조건은 예를 들면, 약 45°C에서 6X 염화나트륨/시트르산 나트륨(SSC) 및 후속하는 50°C에서의 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, 염격한 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. 염격한 조건은 또한 포름아미드 같은 불안정화제의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 낮은 염격 조건은 37°C에서의 30 내지 35% 포름아미드의 완충액, 1M NaCl, 1% SDS(소듐 도데실 술페이트)를 사용한 혼성화, 및 50 내지 55°C에서의 1X 내지 2X SSC(20X SSC=3.0M NaCl/0.3M 시트르산 삼나트륨)으로의 세척을 포함한다. 예시적인 중간 염격 조건은 37°C에서의 40 내지 45% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS으로의 혼성화, 및 55 내지 60°C에서의 0.5X 내지 1X SSC으로의 세척을 포함한다. 예시적인 높은 염격 조건은 37°C에서의 50% 포름 아미드, 1M NaCl, 1% SDS으로의 혼성화, 및 60 내지 65°C에서의 0.1X SSC으로의 세척을 포함한다. 바람직한 실시태양에 있어서, 본 발명의 핵산은 중간 염격 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(Intellicogenetics), 마운틴 뷔, 캘리포니아주로부터 입수가능); 열라인(ALIGN) 프로그램(버전2.0); 열라인 플러스(PLUS) 프로그램(버전 3.0, © 1997); 및 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package), 버전 10의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA(액설라이스(Accerlyns), 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 내정된 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 삭제를 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, "염격 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 염격 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 식물이 본 발명의 옥수수 식물로부터의 트랜스제닉 이벤트 게놈 DNA를 함유하는지를 측정하기 위해, 옥수수 식물 조직 시료로부터 추출한 DNA에 삽입된 이종 DNA의 삽입 자리에 인접한 플랭킹 서열로부터 유도된 제1 프라이머, 및 삽입된 이종 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 생성 가능한 임의의 앰플리콘 길이일 수 있

다. 별법적으로, 프라이머 쌍은 삽입된 DNA 양측의 플랭킹 서열로부터 유래되어 크기 약 6.2Kb인, PHI8999A 발현 구조물의 전체 삽입 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 염기쌍 내지 중폭 반응의 한계치까지 또는 약 2만 뉴클레오티드 염기쌍까지의 범위일 수 있다. 용어 "앰플리콘"의 사용은 DNA 열 중폭 반응에 의해 생성될 수 있는 프라이머 이량체를 특이적으로 제외한다.

[0076] 핵산 중폭은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 비롯한 업계에 공지된 임의의 다양한 핵산 중폭 방법에 의해 달성될 수 있다. 다양한 중폭 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 중폭 방법은 22 Kb 이하의 게놈 DNA 및 42 Kb 이하의 박테리오파지 DNA를 중폭 시키도록 개발되어 왔다 (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). 상기 방법들 및 업계에 공지된 다른 DNA 중폭 방법은 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 구체적 PCR 프로토콜의 다수의 변수들이 구체적 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 올리고뉴클레오티드를 고안하는 유전자 비트 분석 (Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994))을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 기술에 위해 검출될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 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 올리고뉴클레오티드에 혼성화되고, DNA 폴리머라제 및 예상되는 다음 염기에 대해 특이적인 표지된 ddNTP를 사용한 단일 염기 확장 반응에 대한 주형으로서 역할할 수 있다. 판독은 형광 또는 ELISA-기재일 수 있다. 신호는 성공적 중폭, 혼성화 및 단일 염기 확장으로 기인한 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

[0078] 또 다른 검출 방법은 원계 (Winge (Innov, Pharma, Tech. 00:18-24, 2000))에 의해 기술된 파이로씨퀀싱 (Pyrosequencing) 기술이다. 상기 방법에서, 올리고뉴클레오티드는 인접 DNA 및 삽입 DNA 접합부를 중첩하도록 고안된다. 올리고뉴클레오티드는 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, 술퍼릴라제, 루시피라제, 아파라제, 아데노신 5' 포스포슬레이트 및 루시페린의 존재하에 인큐베이션된다. dNTP는 개별적으로 첨가되고 그의 도입은 광 신호를 발생시켜 이를 측정한다. 광 신호는 성공적 중폭, 혼성화 및 단일 또는 다중-염기 확장으로 기인한 트랜스유전자 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

[0079] 천 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 올리고뉴클레오티드가 고안된다. 올리고뉴클레오티드는 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 중폭, 혼성화 및 단일 염기 확장으로 기인한 트랜스유전자 삽입/플랭킹 서열의 존재를 지시한다.

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 올리고뉴클레오티드 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 중폭 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 올리고뉴클레오티드 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 사이클링 된다. 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.

실 시 예

[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 써린기엔시스 (*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 포스피노쓰 리신 아세틸트랜스페라제 (PAT) 유전자 (Wohlbaben W. et al. (1988) Gene 70:25-37)를 코딩하는 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 콜리풀라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터 (Odell 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 헤클레스 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 배지상에서 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 써린기엔시스(B.t.) Cry1F 옥수수 계통 TC1507내의 트랜스제닉 삽입 DNA의 5'에 있는 플

랭킹 서열을 포함하는 뉴클레오티드의 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 젤상에서 크기분별하고, 정제하고, Cry1F 프로브와의 혼성화를 확인하기 위해 서던 분석으로 스크리닝했다. 혼성화 및 단편 크기의 확인 후, 관심 단편을 pBluescript II SK (+)™ 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 워킹 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 워킹을 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 어드벤티지 ⑧

-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. 어드벤티지 ⑨

-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 ACTAGTTCC TAGCCCGCGT CGTGCCCCTA CCCCACCGAC
 GTTTATGGAA
51 GGTGCCATT CACGGTTCTT CGTGGCCGCC CCTAAGGATG
 TAAATGGTCG
101 GTAAAATCCG GTAAATTCC GGTACCGTTT ACCAGATTTT
 TCCAGCCGTT
151 TTCGGATTTA TCGGGATATA CAGAAAACGA GACGGAAACG
 GAATAGGTTT
201 TTTTTGAAA ACGGTACGGT AAACGGTGAG ACAAACTTAC
 CGTCCGTTT
251 CGTATTCTC GGGAAACTCT GGTATATTCC CGTATTGTC
 CCGTATTTTC
301 CCGACCCACG GACCTGCCAA TCAACCATCA GCCAGTCAGC
 CCATCCCCAC
351 AGCTATGCC CATGGGGCCA TGTTGGCCAC ATGCCAACGC
 AACGCAAGGC
401 AGTAAGGCTG GCAGCCTGGC ACGCATTGAC GCATGTGGAC
 ACACACAGCC
451 GCGGCCCTGT CGTGTGTTCTG TGCCGTTGTG CGAGACTGTG
 ACTGCGAGTG
501 GCGGAGTCGG CGAACGGCGA GGCGTCTCCG GAGTCTGGAC
 TGCAGCTGTG
551 GACAGCGACG CTGTGACGGC GACTCGGCCA AGCCCCAAGC
 TACCAAGGCC
601 CCAAGTCCCC ATCCATCTCT GCTTCTCTGG TCATCTCCTT
 CCCCCTGGTCG
651 ATCTGCAGGC GCCAGACCG

[0095]

영역 2(서열 29) 미기재된 옥수수 게놈 서열(상보체)

670 G CCGAACATC ACGAAACGCA CTAAGACCTC
701 GAAGGAGTCA AACCACTCCT CCGAGGCCTC GGGGGCTACA
 CCCGGCCGGT
751 GCGCTCGCGC GCACCCACCG GAACAAAATG TAACCGAGAA
 AGGTCGGTCC
801 CCTTGCAAAA AAAGTGCAC AAAAGCCTCC AAGCGAGTAT
 TAACACTCAC
851 TTGAGGGCTC GGGGGCTAC

[0097]

영역 3(서열 30) 옥수수 Huck-1 레트로트랜스포손의 단편

870 T GTCGGGGACC ATAATTAGGG GTACCCCCAA
901 GACTCCTAAT CTCAGCTGGT AACCCCCATC AGCACAAAGC
 TGCAAAGGC
951 TGATGGGTGC GATTAAGTCA AGGCTCGGTC CACTCAAGGG
 ACACGATCTC
1001 GCCTCGCCCG AGCCCAGCCT CGGGCAAGGG CGGCCGACCC
 CGAGGATTCA
1051 CGTCTCGCCC GAGGGCCCCC TCAAGCGACG GGCACACCTT
 CGGCTCGCCC
1101 GAGGCCCATT 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
 AGTCCGGCT
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 GACCCCAGGG CTCGGACTCA GCCTCGGCTC CGGAAGACGA
 CGAACTCCGC
1601 CTCGCCCCGAC CCCAGGGCTC GGACTCAGCC TCGGCCTCAG
 ACGATGGTCT
1651 CCGCCTCGCC CGACCCGGGG CTCGGACTCG A

[0099]

[0100] 영역 4(서열 31) *cry1F* 유전자의 단편

```

1682 CCTTTCTAT CGGACCTTGT
1701 CAGATCCTGT CTTCGTCCGA GGAGGCTTG GCAATCCTCA
    CTATGTACTC
1751 GGTCTTAGGG GAGTGGCCTT TCAACAAACT GGTACGAATC
    ACACCCGCAC
1801 ATTCAAGAAC TCCGGGACCA TTGACTCTCT AGATGAGATA
    CCACCTCAAG
1851 ACAACAGCGG CGCACCTTGG AATGACTACT CCCATGTGCT
    GAATCATGTT
1901 ACCTTTGTGC GCTGCCAGG TGAGATCTCA GGTTCCGACT
    CATGGAGAGC
1951 ACCAATGTTTC TCTTGGACGC ATCGTAGCGC TACCCCCACA
    AACACCATTG
2001 ATCCAGAGAG AATCAC

```

[0101]

[0102] 영역 5(서열 32) 옥수수 염록체 *rpoC2* 유전자의 단편

```

2017 TCAT TCTCAAGAA CTGCATATCT TGCCGAGATC
2051 CTCATCCCTA AAGGTACTTG ACAATAGTAT TATTGGAGTC
    GATACACAAAC
2101 TCACAAAAAAA TACAAGAAGT CGACTAGGTG GATTGGTCCG
    AGTGAAGAGA
2151 AAAAAAAAGCC ATACAGAACT CAAAATCTT TCCGGAGATA
    TTCATTTC
2201 TGAAGAGGCG GATAAGATAT TAGGTGGCAG TTTGATACCA
    CCAGAAAGAG
2251 AAAAAAAAAGA TTCTAAGGAA TCAAAAAAAAAA GGAAAAATTG
    GGTTTATGTT
2301 CAACGGAAAA AATTCTCAA AAGCAAGGAA AAGTATT

```

[0103]

[0104] 영역 6(서열 33) 옥수수 염록체 또는 *ubizM1(2)* 프로모터의 단편

```

2338 GTG GCTATTATTC
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 TTTAGGACAG AGCCACAAAC
    ACCACAAAGAG
2451 TGGATTGATG ATCTAGAGAG GTTCAAGAGAT AGATACCCCTT
    GGTTGGTTGC
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
    TGTCTAAAG
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 GGCGGGGCC CATCGATATC CGCGGGCATG
2751 CCTGCAGTGC AGCGTGACCC GGTCGTGCC 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(InfoMax 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 초과의 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 계놈 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 계놈 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 <i>Huck-1</i> 레트로트랜스포손 5'LTR ² 의 단편
			86.6	AF050438	1-797	옥수수 <i>Huck-1</i> 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 업록체 <i>rpoC2</i> 유전자 (RNA 폴리머라제 베타-2 서브유닛) 의 단편
6	2338- 2354	17	100.0	X86563	97643-97659	옥수수 업록체 <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	폴리링커 영역 (염기 36-80) 및 <i>ubiZM1(2)</i> 프로모터 (염기 81-153) 단편
9	2830-	6186	100.0	PHI8999A	11-6196	PHI8999A의

표 1b

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

[0120]

[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 업록체 개놈의 단편
13	10088- 10275	188	99	PHI8999A	5333-5520 (상보체)	pat 유전자의 단편
14	10278- 10358	81	100	NC_0016 66	137122- 137202 (상보체)	옥수수 업록체 “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]

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

[0124]

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 개놈 DNA와 경계를 이루는지를 결정하기 위해 PCR 분석법을 사용했다. TC1507 및 비변형 대조 옥수수 계통 Hi-II로부터 제조된 개놈 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 스패닝된 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 스패닝된 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 스패닝될 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(<i>pat</i> 유전자에 대한 PHI8999A 35S 프로모터의 전장 삽입물중에서)	없음	있음
F TC1507에 고유하지 않음	PHI8999A에서의 4827-5308 bp	482	영역 9(<i>pat</i> 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 단편의 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(<i>rpoC2</i> 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(<i>rpoC2</i> 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	эмпл리콘 크기(bp)	프라이머 쌍	5'에서 3' 프라이머 서열
A	300	서열 10	CCCTACCCCACCGACGTTTAT
		서열 11	TTGATTGGCAGGTCCGTGGGTC
B	456	서열 10	CCCTACCCCACCGACGTTTAT
		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	GAGCTGGCAACTCAAATCCCTT
반응	эмпл리콘 크기(bp)	프라이머 쌍	5'에서 3' 프라이머 서열
F	482	서열 8	AAAATCTCGTCAACATGGTGGAGC
		서열 9	TAATCTCAACTGGTCTCCTCTCCGG
G	366	서열 19	GGCTCGGACTCGACCTTCTAT
		서열 20	GCAGTTCTGAAGAATGAGTGA
H	912	서열 1	GTAGTACTATAGATTATATTATCGT AGAG
		서열 2	GCCATACAGAACTCAAATTTCC GGAG
I	844	서열 2	GCCATACAGAACTCAAATTTCC 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 도시를 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 이벤트 TC1507에 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 결찰했다 (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 결찰된 어댑터 서열에 동종인 프라이머를 사용해 1차 PCR을 실시했다. 반응의 특이성을 증가시키기 위해, 또 다른 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 젤 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 니들맨-분쉬 정렬 알고리듬 (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 계통내에도 존재한다. TC1507 3' 플랭킹 서열은 실시 예 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.

영역 10(서열 38) ORF25 터미네이터의 단편(상보체)

```

9016 CTCAC TCCGCTTGAT CTTGGCAAAG ATATTGACG
9051 CATTATTAG TATGTGTAA TTTTCATTTG CAGTGCAGTA
         TTTTCTATT
9101 GATCTTATG TAATTCGTTA CAATTAATAA ATATTCAAAT
         CAGATTATTG
9151 ACTGTCATTT GTATCAAATC GTGTTTAATG GATATTTTA
         TTATAATATT
9201 GATGATATCT CAATCAAAAC GTAGATAATA ATAATATTAA
         TTTAATATT
9251 TTGCGTCGCA CAGTGAAAAT CTATATGAGA TTACAAAATA
         CCGACAAACAT
9301 TATTTAAGAA ACATAGACAT TAACCCTGAG ACTGTTGGAC
         ATCAACGGGT
9351 AGATTCCTTC ATGCATAGCA CCTCATTCTT GGGGACAAAAA
         GCACGGTTTG
9401 GCCGTTCCAT TGCTGCACGA ACGAGCTTG CTATATCCTC
         GGGTTGGATC
9451 ATCTCATCAG GTCCAATCAA ATTTGTCCAA GAACTCATGT
         TAGTCGCAAC
9501 GAAACCGGGG CATATGTCGG GTATCTCGAG CTCGCAGAAG
         CTTGGCTGCA
9551 GGTCGACGGA TCCTT

```

[0137] 영역 11(서열 39) 옥수수 엽록체 *rps12* rRNA 유전자의 단편(상보체)

```

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

```

[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 GTATGGATTG CGGTAAAATA
         CCGGTACTG
9751 ATTTCATAAG AGTCGAATAG GAAGTTAAGA TGAGGGTGGT
         ATCATCATAA
9801 AAATGGAGTA GTATCCTAAA TTATACTAAT CCACGTATGA
         TATGTATGCC
9851 TTTCCCTATC AACCGGAAGT AGTGCAAAAA AAATTCTATA
         CTGCACTGCT
9901 CTCTTTTAC TGAGAAAATGC AAAAAAATAA AAGTGAAGTA
         AGGGTGCCCC
9951 ATAGATATTT GATCTTGCGCT CCTGTCCCCC CCCCCCTTTT
         TTCATCAAAA
10001 ATTTCCATGA AAAAAGAAAA GATGAATTG TCCATTCAATT
         GAACCTAGT
10051 TCGGGACTGA CGGGGCTCGA ACCCGCAGCT TCCGCCT

```

[0142]

[0143] 영역 13(서열 41) *pat* 유전자의 단편(상보체)

10088 GTT CCTAGCCTTC
 10101 CAGGGCCCAG CGTAAGCAAT ACCAGCCACA GCACCCCTCAA
 CCTCAGCAAC
 10151 CAACCAAGGG TATCTATCTT GCAACCTCTC TAGATCATCA
 ATCCACTCTT
 10201 GTGGGTITTG TGGCTCTGTC CTAAAGTTCA 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 ATTCTTTCAT ATACTAGGGG TTTTACTTG GAAAAGACAA
 TGTTCCATAC
 10351 TAAAGGAT

[0147]

[0148] 영역 15(서열 43) 옥수수 게놈(의미있는 상동성 없음)

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

[0149]

[0150] 영역 16(서열 44) 옥수수 게놈

10613 GGGCGCCC GAGGCACCCG GGGGATGGAC TGCCCAGGCG
 10651 CAGCCACGAC GACCCAAGGA TCACCCCTCT GCGCAGTCGG
 CACGAGCAAT
 10701 AGITCTCGGG GAACAGGCAG CTTGGCCTGA CTCCCCGGGG
 TCACCTCAAC
 10751 TACCTCGGCC GAGGGGTCAA GTACCCCCCTC AGTCCGCC
 CGCTCTCGG
 10801 ACCGGGACCC CGACGTCCCG GCCCGGATA CCGACGGCAC
 CAGCCCGCTC
 10851 GGGGGCTGGC TTGACGACCC CTGGCCAGC CTCAGATCTG
 GGCTGAGGCC
 10901 GAGGCAGGCG GCCATGTCGT CGTCTTCATC ATCGTCTTCA
 TCATCGTCGT
 10951 CGTCATCAGG CGTCTCCGGC GACGGCTCCC TTGGGAGGCC
 CTCCCTCTCC
 11001 TGCCGACGAC GAAGCCTTTC CAAGGCATCC CGAGCCCACG
 TCCGCTCGTG
 11051 GGCCCGAGGC TTCTTGCGT CCTTCTTCTC CTTCTCTTC
 TCCGCGGTGA
 11101 CCCTCCGCGC AGCTCGGTCC ACCGCATCCT CCGGGACTGG
 TGGCAGGGAA
 11151 GGCTTGAT GCCCTACCTC CTGGAGACAG ACGAAAAGTC
 TCAGCTATGA
 11201 GAACCGAGGG CAATCTGACG CAAGAAGGAA GAAGGAGCGG
 ATACTCACCA
 11251 GAGACACGCA CCCCGATCG GGACGCATTA AGGGCTGGGA
 AAAAGTGCGG
 11301 GCCTCTAATT TCGCTACCGT GCCGTCCACC CACCTGTGGA
 GGTCATCGAT
 11351 GGGAAAGGGGA 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 게놈 DNA와 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 스패닝할 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 염록체 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 특이 적임을 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 TC1507에서 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 (pat 유전자 단편) 내지 영역 15	없음	있음
K	252	영역 14 (염록체 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 TC1507에서 PHI8999A 삽입물의 3' 서열에 대한 PCR 프라이머

반응	앰플리콘 크기 (bp)	프라이머 쌍	5'에서 3' 프라이머 서열
J	342	서열 3	TGTGGTGTTGTGGCTCTGTCTTAA
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
K	252	서열 4	AGCACCTTTCATTCATTCATATAC
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
L	175	서열 16	AAGCCGCCACCGTCTTGAGGACCTT
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
M	134	서열 17	GTCGAACCGTGCCTCCACTTGCATAA
		서열 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC
N	107	서열 18	AGAAAGGGAAAATCAGGGCCA GGAC
		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 게놈 DNA이거나 비-TC1507 트랜스제닉 식물로부터 제조된 게놈 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, 페킨-엘머 9700, 또는 에펜도르프 매스터사이클러 구배써모사이클러(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 엠플리타크 골드 키트
부피	성분
<u>5 μl</u>	주형 (10 ng/μl)
4 μl	2 μl 각각의 프라이머 (10 μM)
2 μl	10X PCR 골드 완충액
2 μl	25 mM MgCl ₂
2 μl	50X dNTP's (10 mM)
0.1 μl	엠플리타크 골드 폴리머라제
<u>4.9 μl</u>	H ₂ O
<u>20 μl</u>	총합

사이클링 파라미터
진앰프(등록상표) PCR 시스템 9700

9 분 92°C
30 사이클:
 94°C 30초
 60°C 30초
 72°C 1 분
 7분 72°C
 정지 4°C

[0161]

표 10

어드벤티지®-GC 2 폴리머라제 믹스와 함께 사용된 PCR 조건:

조건:	
사용된 키트:	어드벤티지®-GC 2 폴리머라제 믹스
부피	성분
<u>5 μl</u>	주형 (10 ng/μl)
5 μl	2.5 μl 각각의 프라이머 (10 μM)
10 μl	5x GC2 완충액
10 μl	GC 용융물(1.0 M 최종 농도)
1.5 μl	50X dNTP's (10 mM)
1.0 μl	어드벤티지 GC2 폴리머라제
<u>17.5 μl</u>	H ₂ O
<u>50 μl</u>	총합

사이클링 파라미터
진앰프(등록상표) PCR 시스템 9700

5 분 94°C
35 사이클:
 94°C 1분
 60°C 2분
 72°C 3분
 7 분 72°C
 정지 4°C

[0162]

[0163]

본 발명의 원리를 예시하고 설명하였지만, 본 발명이 이러한 원리로부터 벗어나지 않으면서 각색되고 상세하게 변형될 수 있음을 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 특허원이 구체적이고 개별

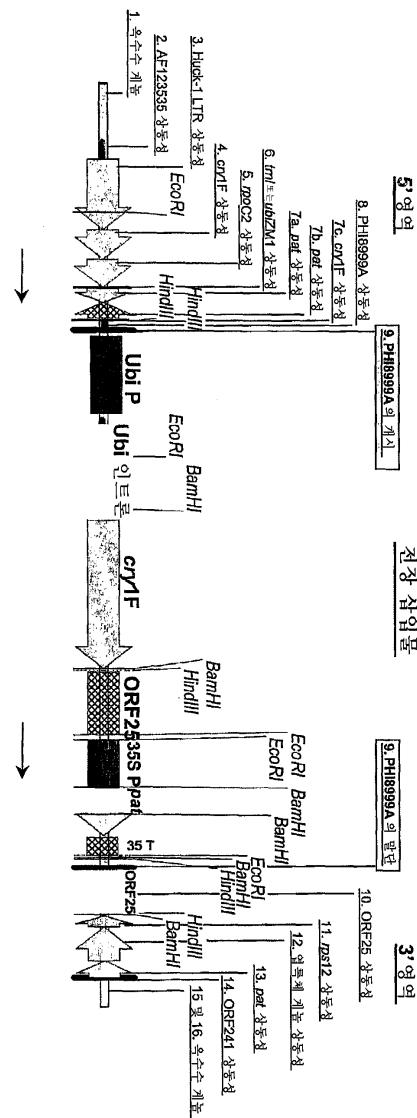
적으로 참고로 인용되도록 지시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다.

도면의 간단한 설명

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

도면

도면1



서열목록

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 attcgttagag

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 2

gccatacaga actcaaaatc tttccggag

30

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer designed for TC1507.

<400> 3
tgtgtgttt gtggctctgt cctaa 25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Event specific primer for TC1507.

<400> 4
agcacccctt cattttca tatac 25

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Genomic DNA primer sequence

<400> 5
gacctccccca caggcatgtat 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 ctc当地atcc 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 tcaacatggg ggaggc 25

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

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

<400> 9
taatctaac tggtctccctc tccggc 25

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

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

<400> 10
ccccctacccc accgacgtt at 22

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

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA

<400> 11

ttgattggca ggtccgtggg tc 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 12

cacaacggca cagaaacacg aa 22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 13

gcgcacccac cggaacaaaa tg 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 14

tcctcgatt aatgctct gc 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 15

cctggcacgc attgacgcat gt

22

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 16

aagccgccac cgtttgagg acctt

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 17

gtcgaaaccgt gcctccactt gctaa

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer - Zea mays genomic DNA.

<400> 18

agaaaggaa aatcagggcc aggac

25

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cry1F sequence primer

<400> 19

ggctcggact cgaccttct at

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cry1F sequence primer

<400> 20

gcagttcttg aagaatgagt ga

22

<210> 21

<211> 2829

<212> DNA

<213> 5' flanking sequence of event TC1507

<400> 21

actagttcc tagcccggt cgtgcccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacgttctt cgtggccgccc cctaaggatg taaaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
 ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttccgattta tcggatata cagaaaacga 180
 gacggaaacg gaatagggtt ttttcgaaa acggtaggtt aaacggtgag acaaacttac 240
 cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgc ccgtatttc 300
 ccgacccacg gacctgcca tcaaccatca gccagtacgc ccatccccac agctatggcc 360
 catggggcca ttttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagccgtgc 420

acgcatttgcac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgttctg tgccgttgt 480
 cgagactgtg actgcgagtg gcgagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540
 tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agcccaagc taccaagccc 600
 ccaagtcccc attcatctt ctttctctgg tcatctccctt cccctgtcg atctgcaggc 660
 gcccggccggccgacatc acgaaacgca ctaagaccc taaaggatca aaccactct 720
 ccgaggccctc gggggctaca cccggcggtt ggcgtcgccg gcacccacccg gaacaaaatg 780
 taaccgagaa aggtcggtcc ctttgcaaaa aaagtgcgc aaaaagctcc aagcgagttat 840
 taacactcac tttaggctc gggggctact gtcggggacc ataatttaggg gtaccccaa 900

gactcctaatttctcagctgtt aaccccccatttgcacaaaggc tgcaaggcc tggatgggtgc 960
 gattaagtca aggtcggtc cactcaaggc acacgatctc gctcgcccc agcccagccct 1020
 cgggcaaggcccgccgaccc cggaggatca cgtctcgcccc gaggcccccc tcaagcgacg 1080
 ggcacacccctt cggctcgcccc gaggccccattt cttcgccgag aagcaacccctt ggccagatcg 1140
 ccacacccgac cggccgtatc gcaaggagcat ttaatgcgcgat gatgcctgac caccttaccc 1200
 tgacgcgcgc ttttgcgtt acagagccga agtgcggca atcaatcgccg cgtccactg 1260
 accgacccatca caagaagaca ggcggccctg cgtcgccgtt actgcgtgtgc cactcgacag 1320
 agtggggctt acacgaccca agtccggccat aggaaggctt ccgtccggcc 1380

accctaggc tcggactcg cctcggtcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccggacc 1440
 ccagggctt gactcagct cggtccggaa agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
 gggctcgac tcggcctcg ctcagaaga cgacgaactc cgctcgccc gacccagg 1560
 ctcggactca gcctcggtc cggaaagacga cgaactccgc ctgcggccac cccagggtc 1620
 ggactcagcc tcggcctcg acgtggctc cgccctcgcc cgacccgggg ctggactcg 1680
 accttctat cgacccctgt cagatcctgt ctgcgtccga ggaggcttg gcaatcctca 1740
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggccct tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
 attcaggaac tccgggacca ttgactctt agatgagata ccacctaag acaacagcg 1860

cgcaccttgg aatgactact cccatgtct gaatcatgtt acctttgtc gctggccagg 1920
 tgagatcta ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
 tacccccaca aacaccattt atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcataatct 2040
 tgccgagatc ctatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggatc gatacacaac 2100
 tcacaaaaaa tacaagaagt cgacttagtg gattggatcg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
 atacagaact caaaaatctt tccggagata ttcatatcc tgaagaggcg gataagat 2220
 tagtgttgcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaga ttcttaaggaa tcaaaaaaa 2280
 gggaaaattt ggttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgt 2340

gctattttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggttt tgatatcgaa aaccattaca 2400
 ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgtat 2460
 atctagagag gtgtcaagat agataccctt ggttggatcg tgaggttgat ggttggatgg 2520
 ctggatttc ttacgctggg cccttggaaagg ctaggaaccc tcaacctcg caaccaacca 2580
 atggatctt tcttgcacc tctctagatc atcaatccac tcttggatcg ttttggatc 2640
 tgtcttaaag ttcaactgtt acgtctcaat gtaatggta acgatatcac aaaccgag 2700
 aagagggatc tcaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcggccatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgaccc ggtcgatccc ctctctagatc ataatgagca ttgatgtt aagtataaa 2820

aaattacca 2829

<210> 22
 <211> 2346
 <212> DNA
 <213> 3' flanking sequence of event TC1507

<400> 22
 ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagatgt gttaatttc 60
 atttcgatgt cgtatatttc tattcgatct ttatgtattt cgttacaatt aataatattt 120
 caaatcagat tattgactgt catttgcattt taatgtttaat ttttattata 180
 atattgtatc tatctcaatc aaaacgtttaat aataatattt atttatttttattttgc 240
 tcgcacatgt aaaatctata tggatatttcaaaatccgac aacattatattt aagaaacata 300
 gacattaacc ctgagactgt tggatatttcaaaatccgac cggtagattt ctttgcatttca 360
 ttcttggggcaaaaacgacg gtttggccgt tccattgttgc cacgaacgatgatcata 420

tcctcggtt ggatcatctc atcaggatcca atcaaaatttgc tccaagaactt catgttagtc 480
 gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tcgagctgc gaaagcttgg ctgcaggatcg 540
 acggatctt caacaaaagg gtacatgtac ccggaaaccga cacaggtggg taggttagaga 600
 atacatggg ggcgcgatcacttgcata aggaacttgcg caaaatagcc ccgtacttc 660
 gggagaagggtt gtggcccccgtt ctaacaataaa acgaaatccggat tttatgtatg gattccggta 720
 aaataccgtt actcgatattc ataagatgtt aatggatgtt gttgtatcat 780
 cataaaaaatgtt ggtgtatc ctaaaattata ctaatccacg tttatgtatg atgcatttc 840
 ttatcaaccg gaatgtatgc aaaaaaaattt ctatctgcatc ctgtctt tttactgaga 900

aatgcaaaaa aataaaaatgtt aagtaagggtt gcccatttttgc ttttgcatttgc 960
 ccccccccccccttttcat ctttttcat ctttttcat ctttttcat ctttttcat 1020

tcattgaacc ctatcgaaa actgacgggg ctcgaaccgg cagttccgc ctgttcctag 1080
 ccttccaggccc ccaagcgtaa gcaataccag ccacagcacc ctcAACCTCA gcaaccaacc 1140
 aagggtatct atcttgaaac ctctcttagat catcaatcca ctcttggtt gtttggct 1200
 ctgtcctaaa gttcactgta gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatataca caaacccgg 1260
 aacacaagaa cggaaaggcacc ttttcatctt ttcatataact aggggtttt acttggaaaa 1320
 gacaatgttc catabaaag gatacgatcga gaagccgcga ccgtcttgag gacccctcg 1380

ggagccagac cggtcgaaacc gtgcctccac ttgctaagga gaaaggaaaa atcaggcc 1440
 ggacatcgaa aggaggagcc agaacgaaaga tatcctaaga tacttactcg ctccggcc 1500
 tgcataatca tgcctgtggg gaggtcttc gcacctcgat ccatgaaggt accaccgagg 1560
 tctggcccgcc cgccggcttc ggtaccgtcc tcgccttggg cgcccgaggc accgggggg 1620
 tggactgccc aggcgcagcc acgacgaccc aaggatcacc ctctgcgcgatcgc 1680
 gcaatagttc tcgggaaaca ggcagctgg cctgactccc cgggttccacc tcaactacct 1740
 cggccgaggg gtaagtacc ccctcagttcc gccccgcctt tcggaccgg gacccgcacg 1800
 tccggcccccc gatccggcacc ggcaccagcc cgctggggg ctggcttgac gacccctggc 1860

ccagcctcag atctgggctg aggccgaggc aggcggccat gtcgtcgct tcatacatcg 1920
 cttcatcatc gtcgtcgta tcaggcgctc cggcgacgg ctcccttggg agccctccc 1980
 tctctcgcc acgacgaagc cttccaagg catcccgagc ccacgtccgc tcgtggggcc 2040
 gagccttctt tgcgtccttc ttctctccg tcttctccg ggtgaccctc cgccgagctc 2100
 ggtccaccgc atccctccggg actgggtggca gggaaaggctt gtatggccct acctccgtt 2160
 gacagacgaa aagtctcagc tatgagaacc gaggcaatc tgacgcaaga aggaagaagg 2220
 agcggatact caccagagac acgcacccgc gatcgggacg cattaaggc tggaaaaaag 2280
 tgccggcctc taatttcgct accgtgccgtt ccacccaccc gtggaggtca tcgatggaa 2340

ggggaa 2346

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Event specific primer sequence designed for TC1507

<400> 23

cttcaaacaatgtgtacaaa 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

actagttcc tagcccgctt cgtgccctta ccccacggac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacggttctt cgtggccgc cctaaaggatg taaatggatcg gtaaaatccg gtaaattcc 120

ggtagccgtt accagattt tccagccgtt ttccgattta tcggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt ttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaactac 240
cgtccgttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgc ccgtatttc 300
ccgacccacg gacctgcca tcaaccatca gccagtgc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tggtggccac atgcccacgc aacgcgaaaggc agtaaggctg gcagccgtgc 420

acgcattgtac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtttctg tgccgttgt 480
cgagactgtg actgcgatgt gcggagtgg cgaacggcga ggctctccg gagtctggac 540
tgccgtgtg gacagcgacg ctgtacggc gactcgccgaa agccccaaagg taccaggccc 600
ccaagtcggcc atccatctt gtctcttgg tcatctcctt cccctggctg atctgcaggc 660
gccagacccgg ccgaagccatc acgaaacgcac taaagacccctt gaaggagtca aaccactct 720
ccggggcttc gggggctaca cccgggggtt gcgtcgccgc gcacccacccg gaacaaaatg 780
taaccggaaaa aggtcggtcc ctgtcaaaa aaagtgcgac aaaaggctcc aagcgagtat 840
taacactcac ttggggctc gggggctact gtccggggacc ataatttaggg gtaccccaa 900

gactccta at ctcagctggt aacccccc atc agcaca aaaggc tgcaaa ggcc tgat ggggtgc 960
gattaat gtc aaggctcggtc cactca agg gg acacgat ctc gcctcgcccg agcccc agcct 1020
cgggcaagg gg cggccgaccc cgaggattca cgctctcgcc gaggggcccc tcaagcgacg 1080
ggcacaccc tt cggctcgcc gaggcccatt cttcgccgag aagcaaccc tt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatgcctga cacctt atcc 1200
tgacgcgcgc tc tt ctagtgc acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacactga caagaagaca ggcgcgcctg cgtcgctcg actgctgtgc cactcgacag 1320
agt gaggcgtc acagcagcaca agtccggctc cggggccat aggaagctcc gctcgcccg 1380

acctcttagggc tcggacttcg cctccggctcc ggaagacgcac gaactacgct tgcggccgacc 1440
ccagggttgc gactcagcct cggctccggaa agacgacgaa ttccgcctcg cccgaccccc 1500
gggctcggaac tcggcctcggt ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccagg 1560
ctcggaactca gcctcggtc cggaaagacga cgaactccgc ctgcggccgac cccagggtc 1620
ggactcagcc tcggcctcgat acgtatgttccgcctcgcc cgaccgggg ctggactcg 1680
acctttctat cggacattgtt cagatctgtt ctgcgtccgaa ggaggctttg gcaatctca 1740
ctatgtactc ggttttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacaaatc acaccggcac 1800
attcaggaaatccgggacca ttgactcttcat agatgagata ccacactcaag acaacagcg 1860

cgcaccttgg aatgactact cccatgtgc gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca gggtccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgttagcgc 1980
tacccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcataatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtaacttg acaaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaaa tacaagaagt cgacttaggtg gatgttgtccg agtgaagaga aaaaaaaaaaggc 2160
atacagaact caaaaatctt tccggagata ttcatttcc tgaagaggcg gataagatata 2220
tagtgtggcag tttgatacc a ccagaaaagag aaaaaaaaaaga ttcttaaggaa taaaaaaaaaa 2280
ggaaaaaatig gggttaigt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340

gctatttac tatccgtaca gctgatatgg ccgcggttt tgatatcgta aaccattaca 2400
tttagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgtat 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggatttgc ttacgcgtgg cccgttggagg ctaggaaccc tcaaccttag caacccaacc 2580
atggtatcta tcttgcAACCT tctctagatc atcaatccac tcttgggttgg tttgtggctc 2640
tgtcctaaag ttcaactgttag acgtctcaat gtaatggta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaaggttc ggccggggcc catcgatatac cgccggcatg cctgcagtgc 2760
acgtgtaccc ggtcggtcccc ctctctagag ataatgagca ttgcgtgtct aagttataaa 2820

aaatttaccac aactggaaga gcgggtaccc ggaccgaagc ttcgccggg gccccatcgat 2880
atccgcggc atgcctgcag tgcaagtcgtga cccggctgtg cccctctcta gagataatgaa 2940
gcattgtcgat tctaaggat aaaaattac cacatattt ttttgtcaca ctgtttgaa 3000
gtgcagttt tctatctta tacatatat taaactttac tctacgata atataatctaa 3060
tagtactaca ataataatcg tggttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggc 3120
taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt ttatcttt tagtgtcgat 3180
gtgttctctt tttttttgc aaatagcttc accttatataa tacttcatcc attttattag 3240

tacatccatt tagggttag ggttaatgg ttttatagac taatttttt agtacatcta 3300

ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctattttag tttttttatt 3360
 taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaac aaataccct 3420
 taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttggtc gagtagataa tgccagcctg 3480
 ttaaacgcgg tcgacgagtc taacggcac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcg 3540
 ccaagcgaag cagacggcac ggcacccctc tcgctgc 3600
 cgctccaccc ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtg 3660
 acgtgagccg gcacggcagg cggcctcc tcctctcac ggcacggcag ctacggg 3720
 ttccttccc accgctcctt cgcttccctt tcccteccc ccgtaataaaa tagacacccc 3780

ctccacaccc ttttccccca acctcggtt gtccggagcg cacacacaca caaccagatc 3840
 tcccccaaat ccacccgtcg gcacccctcc ttcaaggatc gecgctcg tcctccccc 3900
 cccctctctt accttctcta gatcggtt ccggccatg gttaggccc ggtagttcta 3960
 ctctgttca ttttgggtt agatccgtt ttgtgtt 4020
 acacggatgc gacccgtacg ttagacacgt tctgattgt aacttgcag tgttctt 4080
 tgggaatcc tggatggct ctagccgtc cgcagacggg atcgattca tgattttt 4140
 tgttcggtt catagggtt ggtttgcctt ttcccttat ttcaatatat gccgtgact 4200
 tgttgtcg 4260

tggcggtcg ttcttagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctgggt gatttattaa 4320
 ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata ttcatagta cgaatttgaag atgtatggat 4380
 gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatcggtt tttactgtatg catatacaga 4440
 gatgtttttt ttgcgttgg ttgtgtatgt gtgggtgtt tggcggtcg ttcatcggtt 4500
 cttagatcgga gttagataact gtttcaaact acctgggtt tttattattt ttggaaactgt 4560
 atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatctag 4620
 gataggtata catgttgatg tgggtttac tgatgcata atcatgtggc atatgcagca 4680
 tctatttata tgcgttcaacc ttggatgtt atctattata ataaacaagt atgtttata 4740

attattttga ttcttgatata ctggatgtt ggcataatgca gcagctatata gtggatttt 4800
 ttagccctgc cttcatacgc tatttatttgc ctggatgtt tttctttgtt cgtatgttcaac 4860
 cctgttgggtt ggttactt ctgcagggtcg actcttagagg atccaacaat ggagaacaac 4920
 atacagaatc agtgcgtccc ctacaactgc ctcaacaatc ctgaagatgaa gatttcaac 4980
 gaagagaggt cgactggcag attgcgttca gacatctccc tggcccttac acgtttctg 5040
 ttgtctgagt ttgtccagg tggggatgtt gctttggcc tttcgacat catctgggc 5100
 ttcatcaactc catctgattt gggccctttt ctctccaga ttgaacagttt gattgaacaa 5160
 aggattgaga ctttggaaag gaatcggttca accatcttcc ttctggctt agcagacacg 5220

tatgagatct acattgaagc actaagagag tggaaagcca atcttacaa tggccaaactg 5280
 agagaagatg tgcgtatacg ctggatgtt acagatgtt cttgtatcac accatcaac 5340
 aacttcaccc ttaccatgtt cgagatccctt ctgtctcg tctatgttca agctgttcaac 5400
 ctgcacttgtt cactactgtcg cgacgtgttgc tgggtggc aagggtggg actggacata 5460
 gctactgtca acaatcaactt caacagactc atcaatctgtt ttcattgttca cacggaaat 5520
 tgggttggata ctttacatca gggattggg aacatgttacg gtactaacaat tggccaaatgg 5580
 ggcagggttca atcgttcaactt gggatggg aacatgttacg tgggttgggactt atgtgttca 5640
 ttccgttcaactt acgtatgttcaactt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5700

atctacacca gttcgttcat tgaagactct ccagtttgc cgaacatacc caatggttt 5760
 aacagggtcg agttggatgtt cagaccaccc catctcatgg acttcatgaa ctctttgttt 5820
 gtgactgtcg agactgttagt atcccaactt gtgtgggg gacactttagt tagctcacgc 5880
 aacacggctg gcaatgttcaacttcc agttacggg ttttcaatcc cggggggcc 5940
 atctggattt cagatgttcaacttcc ttttcaatcc ctttcaatcc ctttcaatcc 6000
 gtccggggatgtt gctttggcaat ttttcaatcc gtactgttcaacttcc ttttcaatcc 6060
 caaactggta cgaatcacac ccgcacatttcc aggttacggg ggaccatttcaacttcc 6120
 gagataccac ctcaagacaa cagcggcgtca ctttggatgttactactccat ttttcaatcc 6180

catgttaccc ttgtcgctg ggcagggttagt atctcgttactt ccgtactcatg gagagccacca 6240

```
atgttctttt ggacgcatacg tagcgctacc cccacaaaaca ccattgatcc agagagaatc 6300  
actcaggattt ccttggtaaa ggcacacaca cttcgtatcg gaactacagt tctaaggagg 6360  
ccggggttca cgggaggaga cattttcgta cgcaactatgt gaggaccatt cgcgtacacc 6420  
atgttcaaca tcaatggcca acttccccaa aggtatcgta cgaggatacg ctatgcct 6480  
actaccaatc taagaatcta cggtacgggt gcaggtgaac ggatcttgc tggtcagttc 6540  
aacaagacaa tggataccgg tgatccattt acattccaaat ttttcttca cgccactatc 6600  
aacacccgtt tcacccttcc aatgagccag agcagttca cagtaggtgc tgataccctt 6660
```

atggtcggca acgaagtgtt cattgacagg tttgagttga ttccagttac tgccacactc 6720
gagtaaggat ccgtcgacct gcagccaagg tttcgcgacc tcgagatccc cgacatatgc 6780
cccggtttcg ttgcgactaa catgagttct tggacaaatt tgatggacc tgatgagatg 6840
atccaaacccg aggatatacg aaagctcggt cgtgcageaa tggaacggcc aaaccgtgt 6900
tttgtccccca agaatgaggat gctatgcatt aaggaatcta cccgttgatg tccaacagt 6960
tcagggttaa tgtctatgtt tcttaataaa tggatcggtt atttgttat ctcatataga 7020
ttttcactgtt gcgacgcaaa aatattaaat aaatattattt attatctacg ttttgatgtt 7080
gatatcatca atattataat aaaaatatcc attaaacacg atttgatatac aatgacatgtc 7140

aataatctga ttgttaatttattaattgt aaccaattac ataaagatcg aatagaaaat 7200
actgcactgc aaatgaaaat taacacatac taataaatgc gtcaaataatc tttgccaaga 7260
tcaagcggag tgagggcctc atatccggtc tcagttacaa gcacggtac cccgaagcgc 7320
gctccaccaa tgccctcgac atagatgccc ggctcgacgc tgaggacatt gcctaccc 7380
agcatggctc cagcgcggc ttaaagctca atcccatccc aatctgataa tcctatcccc 7440
cgccccatcc ggtgtaaaga cgggtctgtc catccaccc tgggtggaaat tccggccgg 7500
gtcaccttgc tccaccaaga tggaaactcgcc gcccggacc gaattcccat ggagtcaag 7560
attcaaatag aggaccta aac agaactcgcc gttaaagactg gcgaaacagt t catacagagt 7620

```
ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttctgtcaaca tggtggagca cgacacgctt 7680  
gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggaat tgagacttt 7740  
caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat ctgtcactt 7800  
atttgtgaaga tagtgaaaaa ggaagggtggc tcctacaaat gccatcatgg cgataaagg 7860  
aaggccatcg ttgaagatgc ctctggccgac agtgttccca aagatggacc cccacccacg 7920  
aggagcatcg tggaaaaaaga agacgttcca accacgttca caaagcaagt ggattgtatg 7980  
gatatctcca ctgacgtaag ggtatgacgca caatcccact atccctcgca agacccttcc 8040  
tctatataaag gaagttcatt tcattttggag aggacagggt accgggggat ccaccatgtc 8100
```

tccggagagg agaccagtgt agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggttt 8160
tgatatcggtt aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaacaa 8220
accacaagag tggattgtat atctagagag gttgcaagat agataccctt gggtgggtgc 8280
tgtgggttggag ggtgttgtgg ctggattgc ttacgctggg ccctgaaagg ctaggaacgc 8340
ttacgattgg acagtgtaga gtactgtta cgtgtcacat aggcatcaaagg 8400
aggatccaca ttgtacacac attgtctta gtctatggag ggcgaagg 8460
gggtgtgtt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcgtgagg ctttgggata 8520
cacagccccgg ggtacattgc ggcgcgatgg atacaaggat gggtggatggc aatgtgttgtt 8580

ttttggcaa agggatttg agttgccagc tcctccaagg ccagtttaggc cagttaccca 8640
gatctgagtc gacctgcagg catgcccgt gaatatccca gtctctctt acaaatctat 8700
ctctcttat aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg aattagggtt cttataggg 8760
ttcgctcatg tggtgagcat ataagaacc cttagtatgt atttgtattt gtaaaatact 8820
tctatcaata aaatttctaa ttccctaaac caaatccag tggcggatctc gaattcgagc 8880
tcgagccccgg gtggatctc tagatgtcgc ctgcagaagc ttccgtccgg cgcgcctcta 8940
gttgaagaca cgttcatgtc ttcatcgtaa gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg 9000
gcctaaactca aggccctcac tccgcgttgat ctggcaag atatttgacg catttattag 9060

tatgtgttaa tttcatttg cagtgcgta tttcttattt gatctttatg taattcgta 9120
caattaataa atattcaaat cagattattt actgtcattt gtatcaaattc gtgtttaatg 9180
gatattttta ttataatattt gatgatatct caatcaaaaac gtagataata ataataatttta 9240
tttaatattt ttgcgtcgca cagtggaaat ctatatgaga ttacaaaata ccgacaacat 9300
tatftaaggaa acatagacat taaccctggactgttggac atcaacgggt agattcccttc 9360

atgcatacgca cctcattctt ggggacaaaa gcacggtttg gccgttccat tgctgcacga 9420
 acgagctttg ctatatcctc gggttggatc atctcatcgat gtccaatcaa atttgtccaa 9480
 gaactcatgt tagtcgcaac gaaaccgggg catatgtcgg gtatctcgag ctcgcgaaag 9540

cttggctgca ggtcgacgga tccttcaaca aaagggtacc tgtacccgaa accgacacag 9600
 gtggtaggt agagaataacc taggggcgcg agacaactct ctctaaggaa ctcgcgaaaa 9660
 tagccccgtta actcgggg aagggtgcgc ccccgtaac aataaacgaa tacgtttat 9720
 gtatggattc cggtaaaata ccggtaactcg atttcataag agtgcataag gaagttaaga 9780
 tgagggttgtt atcatcataa aatggatgtatccataat ccacgtatga 9840
 tatgtatgcc ttcccttatac aaccggaaatgtcaatccataat ctgcactgct 9900
 ctcttttac tgagaatgc aaaaaataaa aagtgaagta aggggtcccccc atagatattt 9960
 gatcttgcctt cctgtcccccc ccccccctt ttcatcaaaa atttccatga aaaaagaaaa 10020

gatgaatttg tccattcattt gaaccctagt tcgggactga cggggctcgaa acccgacgt 10080
 tccgcctgtt cctagccttc caggggccag cgtaagcaat accagccaca gcaccctcaa 10140
 cctcagcaac caaccaagggttatctt gcaaccccttc tagatcatca atccacttt 10200
 gtgggttttg tgctctgtc ctaaagtca ctgttagacgt ctcaatgtaa tggttaacga 10260
 tatcacaac cgcggaaacac aagaacgaaa gcaccccttc attcttcat atactagggg 10320
 ttttacttg gaaaagacaa tggccatatac taaaggatag ctgcagaagc cgccaccgtc 10380
 ttgaggaccttccgggagc cagaccgtc gaaccgtgcc tccacttgct aaggagaag 10440

gaaaaatcg gcccaggaca tacgaaggag gagccagaac gaagatatcc taagatactt 10500
 actcgctcg gcccatgatc aatcatgcct gtggggaggt ctctcgacc tcgatccatg 10560
 aagggtaccac cgaggctctgc cccggccgcg gcttcggta cgtcctcgcc ttggcgcggcc 10620
 gaggcaccgg gggatggac tgcccaggcg cagccacgac gacccaagga tcaccctct 10680
 ggcgcgtcg cacgacaaatgtctcgaa gaacaggcag ctggcctga ctcccccggg 10740
 tcacctaacc tacctcgcc gagggtcaa gtacccctc agtccggccc cgctctcg 10800
 accgggaccc cgacgtcccg gccccggata ccgcacgcac cagccgcctc gggggctggc 10860

ttgacgaccc ctggcccagc ctcagatctg ggctgaggcc gaggcaggcg gccatgtcgt 10920
 cgtcttcatc atcgcttca tcatcgatcgt cgtcatcagg cgtctccggc gacggctccc 10980
 ttgggagccc ctccctctcc tgccgacgac gaagcccttc caaggcatcc cgagcccaacg 11040
 tccgcctgtc gccccggagcc ttctttgcgt ctttcttc tccctcttc tccgcggta 11100
 ccctccgcgc agtcgggtcc accgcacatctt ccggactgg tggcaggaa ggctgtgtat 11160
 gcccctaccc ctggagacag acgaaaatgtc tcagctatga gaaccggagg caatctgacg 11220
 caagaaggaa gaaggagcgg atactcacca gagacacgcac cccgcgtatcg ggacgcattta 11280

aggcgtggaa aaaagtgcgc gcctctaatt tcgctaccgt gccgtccacc caccgtggaa 11340
 ggtcatcgat gggaaaggaa 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 ctccggccgg gcccacatcgat tatccgggg 60
 catgcctgca gtgcacgtgt acccggtcgat gcccctctt agagataatg agcattgcatt 120
 gtctaaatgttta taaaaatattt ccacatattt tttttgtcactt acttgcgttgcgtt 180

atctatctt atacataatat ttaaacttta cttcacaaat aatataatct atagtaactac 240
aataaatatca gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggc ctaaaggaca 300
attgagtttatttgc ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc 360
tttttttttg caaatagttt caccatata atacttcattt catttttattt gtacatccat 420

ttagggttta gggttaatgg ttttataga ctaattttt tagtacatct attttattc 480
attttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctattta gttttttat ttaataattt 540
agatataaaa tagaataaaa taaagtgact aaaataaa caaatccct ttaagaattt 600
aaaaaaaaacta aggaaacatt tttctgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc 660
gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcgcg gtgcgtcg gccaaagcgaa 720
gcagacggca cggcatctt gtgcgtgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc 780
gttggacttg ctccgcgtgc ggcatccaga aattgcgtgg cggagccgca gacgtgagcc 840
ggcacggcag gcggccctct cctccctca cggcacggca gctacggggg attcccttcc 900

caccgcgttcc ttccctcgccc ggcgtataaa atagacaccc cctccacacc 960
ctctttcccc aacctcggt tggtggagc gcacacacac acaaccagat ctcccccaaa 1020
tccaccgcgtc ggcaccccg cttaaggta cgccgctgt cttccccc cccccccttc 1080
tacccctctt agatcggtt ccgggtccat ggttagggcc cggttagttt acttctgttc 1140
atgtttgtgt tagatccgtg ttgtgttag atccgtgtg cttagcggtcg tacacggatg 1200
cgacccgtac gtcagacacg ttctgtattgc taacttgcca gtgtttctt ttgggaaatc 1260
ctgggatggtc tctagccgtt ccgcacacgg gatcgatttc atgattttt ttgtttcggt 1320
gcatagggtt tggtttgcctt ttcccttta ttcaatata tgccgtgcac ttgtttcggt 1380

```
ggcatcttt tcatgcttt ttgtcttg gttgtatga tgtggctgg ttggcggtc 1440  
gttctagatc ggagttagaat tctgttcaa actacctggt ggatttatta atttggatc 1500  
tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgtatggat ggaatatatcg 1560  
atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg tttactgtat gcatatacag agatgtcttt 1620  
tgttcgcttg gttgtatga tgtgggtgg ttggcggtc gttcattcgt tctagatcg 1680  
agtagaaatac tgtttcaaacc tacctggtgtt atttattaaat ttggaaactg tatgtgttg 1740  
tcatacatct tcataggtaa gagtttaaga tggatggaaa tatcgtatca ggataggta 1800  
acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgtatgg catatgcagc atctattcat 1860
```

atgctctaacc ttggatcc tatctattat aataaacaag tatgtttat aattattttg 1920
atcttgatat acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggattt tttagccctg 1980
ccttcatacg ctatttattt gcttggtaact gtttcttttgc tgatgctca ccctgttgtt 2040
tggtgttact tctgcaggc gactctagag gatccaacaa tggagaacaa catacagaat 2100
cagtcgtcc cctacaactg cctcaacaat cctgaagtag agattctaa cgaagagagg 2160
tcgactggca gattgccgtt agacatctcc ctgtcccttacacgttcttacgttctgag 2220
tttggttccag gtgtgggagt tgcgttggc ctcttcgacc tcattgggg cttcatcact 2280
ccatctgatt ggagccctt tcttccat attgaacagt tgattgaaca aaggatttag 2340

accttggaaa ggaatcggtt catcaactacc cttcggtggct tagcagacag ctatgagatc 2400
tacatttgaag cactaagaga gtggaaagcc aatcctaaca atgcctaact gagagaagat 2460
gtgcgtatac gctttgttaa cacagatgtat gctttgtatca cagccatcaa caacttcacc 2520
cttaccagct tcgagatccc tcttcctcg gtctatgttc aagctgtctaa cctgcacttg 2580
tcactactgc gcgacgcgtt gtctgttggg caagggttggg gactggacat agctactgtc 2640
aacaatcaact acaacagact catcaatctg attcatcgat acacgaaaca ttgtttggat 2700
acctacaatc agggatttggaa gaacctgaga ggtactaaca ctcgcctatg ggccagggtt 2760
aatcagttaa ggagagacact tacacttact gtgttagaca tagttgtctt ctttccgaac 2820

tacgatgttc gtacctatec gattcaaagc tcatccaaac ttacaaggga gatctacacc 2880
agttcagtca ttgaagactc tccagttct gcgaacatac ccaatggttt caacagggt 2940
gagtttgtag tcagaccacc ccatctcatg gacttcatga acttttgtt tgtgactgca 3000
gagactgtta gatccaaac tgtgtggga ggacacttag ttagctcacg caacacggc 3060
ggcaatcgta tcaacttcc tagttacggg gtcttcaatc ccgggggcgc catctggatt 3120
gcagatgaag atccacgtcc ttctatcggt accttgcag atcctgtctt cgccgaggaa 3180
ggcttggca atcctcaacta tgtactcggt cttagggag tggccttca acaaactggt 3240
acgaatcaca cccgcacatt caggaactcc gggaccattg actctctaga tgagataccaa 3300

cctcaagaca acagcggcgc accttggaat gactactccc atgtgctgaa tcatgttacc 3360
 tttgtgcgtt gcccaggta gatctcaggta tcggactcat ggagagcacc aatgttctct 3420
 tggacgcata gtatcgctac ccccacaaac accattgatc cagagagaat cactcagatt 3480
 cccttggta aggacacac acttcaggta ggaactacag ttgtaaaggagg gcccgggttc 3540
 acggaggagg acattctcg acgcactagt ggaggaccat tcgcgtacac cattgtcaac 3600
 atcaatgggc aacttccccaa aaggtatcgat gccaggatac gctatgcctc tactaccaat 3660
 ctaagaatct acgttacggt tgcaaggtaa cgatcttg ctggtagt caacaagaca 3720
 atggatccact gtatccact tacattccaa tcttctcct acgccactat caacaccgcg 3780

ttcaccttc caatgagcca gaggcaggta acagtaggtg ctgatacctt cagttcaggc 3840
 aacgaagtgt acattgacag gtttgagttt attccagta ctggccacact cgagtaagga 3900
 tccgtcgacc tgcaagccaa cttttgcgta gctcgagatc cccgacatata gccccgggtt 3960
 cgttgcgact aacatgagtt ctggacaaa ttgttggatc cctgtatgaga tgatccaacc 4020
 cgaggatata gcaaagctcg ttctgtgcgc aatggaaacgg ccaaaccgtg ctttgtccc 4080
 caagaatgag gtgtatgc tgaaggaaatc taccgttga tgtccaacag tctcagggtt 4140
 aatgtctatg tatcttaat aatgttgcgt gtatgttta atctcatata gattttcact 4200
 gtgcgacgca aaaatattaa ataataatata ttattatcta cgtttgatt gagatatcat 4260

caatattata ataaaaatata ccattaaaca cgatttgata caaatgacag tcaataatct 4320
 gatttgaata ttatataattt gtaacgaattt acataaaatgat cgaatagaaa atactgcact 4380
 gcaaatgaaa attaacacat actaataatgcgatcaataataa tctttggccaa gatcaaggcg 4440
 agtgaggccc tcatatccgg tctcaggtaa aagcacggta tccccgaagc gcgcctccacc 4500
 aatgccctcg acatagatgc cgggctcgac gctgaggaca ttgcctacat tgagcatggt 4560
 ctctcgcccg gcttaagactt caatccatc ccaatctgaa tattctatcc cgcgcctcg 4620
 ccgggttaag aacgggtctg tccatccacc tctgttggaa attccggcc gggcacctt 4680
 tgtccaccaaa gatggaaactg cggccgcggaa ccgaattccc atggagtc当地 agattcaat 4740

agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg 4800
 actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtgtag cacgacacgc ttgtctactc 4860
 caaaaatatac aaagatacag tctcagaaga ccaaaggca attgagactt ttcaacaag 4920
 ggttaatcc gggaaacctcc tcggattcca ttggccagct atctgtactt ttatgtgaa 4980
 gatagtggaa aaggaagggtt gctctacaa atgcatcat tgcatataaag gaaaggccat 5040
 cgttgaatgc gcccctgcg acatgttcc caaagatgga cccccaccca cgaggagcat 5100
 cgtggaaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaagcaaa gtggattgtatcgtatctc 5160
 cactgacgtt agggatgtacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata 5220

aggaagttca ttcatattgg agaggacagg gtacccgggg atccaccatg tctccggaga 5280
 ggagaccagt tgagatttgg ccagctacag cagctgat ggcggccgtt tggatatcg 5340
 ttaaccatta cattgagacg tctacagtta actttaggac agagccacaa acaccacaag 5400
 agtgatttgcgat tggatctatgat aggttgcacat agatatacc ttgttgggtt gctgagggtt 5460
 aggggtttgtt gcttacgtt ggcctggaa ggcttagaaac gcttacgtt 5520
 ggacagtgtt gactactgtt tacgtgtacat atagcatca aaggttggc ctagatcca 5580
 cattgtacac acatttgcctt aagtctatgg aggcgaagg ttttaatgtt gtgggttgc 5640
 ttataggcct tccaaacgtt ccatctgtt ggttgcata ggttggaa tacacagccc 5700

gggttacatt ggcgcgcgat ggatacaagc atggtgatg gcatgatgtt ggttttggc 5760
 aaagggttt tgatgttgcctt gctctccaa ggccaggtagt ggcaggatc cagatctgag 5820
 tcgcacccgtca ggcacccgc tggaaatccacc agtctctctc tacaatctt tctctctctt 5880
 taataatgtt tgatgttgcctt ccagataagg gaatttaggtt tctttaggg tttcgctcat 5940
 gtgttgatgc tataagaaac ctttagtgc tattttgtt tggaaatatac ttctatata 6000
 aaaatttctt atccctaaaa cccaaatcca gtggcgatc cgaatttcgat ctcgcgcctt 6060
 ggtggatccctt ctatgttgcgtt cctgcagaag cttcggtccg gcgcgcctt agttgaagac 6120
 acgttcatgtt ctatgttgcgtt agaagacact cagtagtctt cggccagaat ggcctaactc 6180

<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

```

actagttcc tagccgcgt cgtcccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgccc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcggatata cagaaaacgca 180
gacgaaaaacg gaataggttt ttttcgaaa acggtaggtt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgc ccgtatttc 300
ccgacccacg gacctgcca tcaaccatca gccagtca gcatccccac agctatggcc 360
catggggcca tggggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagccctggc 420

acgcatttgc gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgt 480
cgagactgtg actgcgagtg gcgaggatcg cgaacggcgaa ggcgtctccg gagtctggac 540
tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcgccgaa agccccaaagc taccatggcc 600
ccaagtcccc attcatctct gcttctctgg tcatctccctt cccctgtcg atctgcaggc 660
gccagacccgg ccgaagcatac acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtc aaccactct 720
ccgaggccctc gggggctaca cccggccggt ggcgtcgccg gcacccacccg gaacaaaatg 780
taaccggagaa aggtcggtcc ctttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtt 840
taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataatttaggg gtaccccaa 900

gactcctaatttctcagctgtt aaccccccatttgc acgacaaaggc tgcaaaaggcc tggatgggtgc 960
gattaagtca aggtcggttc cactcaagggg acacgatctc geetcggcccg agcccgaccc 1020
ccggcaagggg cgccgcaccc cgaggatca cgtctcgccc gagggcccccc tcaagcgacg 1080
ggcacaccc ttccgtcgcccc gaggccctt cttcgccgag aagcaacccctt ggccagatcg 1140
ccacacccggcc cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc ttttgcgttgc acagagccga agtgcggca atcaacttgcg ccgtccactg 1260
accgacccatca caagaagaca ggcggccctg cgtcgcccg actgtgtgc cactcgacag 1320
agtggggctt acagcagccca agtccggccctt cggggccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380

acccttagggc tcggactcggtt cctcggtcc ggaagacgac gaactacgct tcggccgacc 1440
ccagggtttt gactcagectt cggctccggaa agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcgaccc tccggctcggtt ctccagaaga cgacgaaactc cgcctcgccc gaccccgagg 1560
ctcgactca gcttcggctc cggaaagacgaa cgaactccgc ctcggccgac cccagggttc 1620
ggactcagcc tccggctcgatc acgatggctt cccgcctcgcc cgacccgggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggacccctgtt cttcggtccgaa ggaggcttgc gcaatctca 1740
ctatgtactc ggttttaggg ggtggccctt tcaacaaactt ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcagggaaatccgggatcca ttgactcttctt agatggatca cccatctcaag acaacagccg 1860

cgcaccttgg aatgactact cccatgtgtt gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagacgac accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccccacaa aacaccatttgc atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcataatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttgc acaatgtat tattggatgc gataacaaac 2100
tcacaaaaaaa tacaagaagt cgtactgtt gattggatgc agtgaagaga aaaaaaaagcc 2160
atacagaactt caaaatctttt tccggagata ttcatttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggccat tttgtatcca ccggaaagag aaaaaaaaaa ttctaaaggaa tcaaaaaaaaaa 2280
ggaaaaatttgc ggtttatgtt caacggaaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340

```

gctatttatac tatccgtgca gctgatcatgg ccgcggtttg tgatatcgaa aaccattaca 2400
 tttagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
 atctagagag gtgtcaagat agataccctt gggtgggtgc tgaggttgag ggtgttgtg 2520
 ctggatttc ttacgctggg cccttggaaagg ctaggaaccc tcaacccatc caaccaacca 2580
 atggatctta tcttgcacc tctctagatc atcaatccac tcttgggtg ttttggctc 2640
 tgtcttaaag ttactgttag acgtctcaat gtaatggta acgatatcac aaaccgag 2700
 aagaggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatac cgccggcatg cctgcagtgc 2760
 agcgtgacc ggtcgcccc ctctctagag ataatgagca ttgcgtgtc aagtataaa 2820

aaatttaccac aactggaaga gcgggttaccc ggaccgaagc ttccggccggg gcccattcatg 2880
 atccggggc atgcgtcgag tgcagctgtc cccgggtgtg cccctctta gagataatga 2940
 gcatgtcatc tctaagttt aaaaaattac cacatatttt ttttgcaca cttttttgaa 3000
 gtgcgttta tctatctta tacatatttt taaacttac tctacgata atataatcta 3060
 tagtactaca ataataatcag tggttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggc 3120
 taaaggacaa tttagtattt tgacaacagg actctacagt ttatcttt tagtgtcat 3180
 gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
 tacatccatt tagggtttag ggttaatgac taattttttt agtacatcta 3300

ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatttttag ttttttttatt 3360
 taataatata gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt 3420
 taagaaaattt aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgttgc gaggatataa tgccagccg 3480
 ttaaacgcgc tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgctcg 3540
 ccaagcgaag cagacggcac ggcattctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagatgc 3600
 cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggc 3660
 acgtgagccg gcacggcagg cggccctcctc ctccctcatac ggcacggcag ctacgggg 3720
 ttccttccaccgcttccctt ccgtttccctt tccctgcggcccg cgtaataaaa tagacaccccc 3780

ctccacaccc tctttcccca acctcggtt 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 ttgcgaagac ctttctcta tataaggaag ttcatatcat ttggagagga 60
 cagggtaccc gggatccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat tagccagct 120
 acagcagctg atatggccgc gggttgtat atcgtaacc attacattga gacgtctaca 180
 gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgg tttatgtatct agagagg 240
 caagatagat acccttggtt ggttgcttag gttgagggtt ttgtggctgg tattgttac 300
 gctggccctt ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagttac ttgttacgtg 360
 tcacatagggc atcaaaagggtt gggcttagga tccacattt acacacattt gcttaatgt 420

atggaggcgc aagggtttaa gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa cgatccatct 480
 gtttaggtgc ataggctttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc agctggatac 540
 aagcatggtg gatggcatga tgggggtttt tggcaaggat attttgatgtt gccagctct 600
 ccaaggccag ttagggccatgt taccctagatc tgatgtcgacc tgcaggcatg cccctgtaaa 660
 tcaccatgtctctt ctctataata atctatctctt ctctataata atgtgtgatgttccaga 720

taaggaaatt agggttctta tagggttcg ctcatgttt gaggatataa gaaacccta 780
gtatgtattt gtatttgtaa aatacttcta tcaataaaaat ttcttaattcc taaaaccaa 840
atccagtggc gagctcgaaat tcgagctcgaa gccgggtgg atcccttaga gtcgacactgc 900

agaagcttcg gtccggcgcc cctctagtt aagacacgtt catgtcttca tcgtaaagaag 960
acaactcgtat gtcttcggcc agaatggcct aactcaaggc cctcactccg ctgtatctt 1020
gcaaagatata ttgacgcatt tattatgtat tgtaatttt catttgcaat gcagtatttt 1080
ctatccgtat ttatgtat tgcgttacaat taataaatat tcaaatcaga ttatttgactt 1140
tcatcttgcata caaatcgtgt ttaatggata ttttttattat aatattgtat atatctcaat 1200
caaaaacgtat ataataataa tattttatata atattttgc gtcgcacagt gaaaatctat 1260
atggagattac aaaataccga caacatttt taagaaacat agacattaac cctgagactt 1320
ttggacatca acgggttagat tccttcatgc atagcacctc attcttgggg acaaaaaggcac 1380

ggtttggccg ttccattgtc gcacaaacga gctttgtat atcccggt tggatcatct 1440
catcaggccc aatcaaattt gtccaaagaac tcatagttagt cgcaacgaaa ccggggcata 1500
tgtcggtat ctcgagctcg cgaaagcttg gctgcaggcgc acggatcct tcaacaaaag 1560
ggtacactgt a cccgaaaccg acacagggtgg gtaggttagag aatacctagg ggcgcgagac 1620
aactctct aaggaactcg gcaaaatagc cccgttaactt cgggagaagg ggtgcccccc 1680
gctaacaata aacgaatacg gttatgtat ggattccggtaaaaataccgg tactcgatt 1740
cataagagtca gaataggaaat ttaagatgag ggtggatca tcataaaaaat ggagtagt 1800
ccttaattat actaatccac gtagatatg tatgccttc ttatcaacc ggaagtagt 1860

aaaaaaaaat tctatactgc actgcctct tttactgag aaatgaaaa aaataaaagt 1920
gaagtaaggg tgcccatag atattgatc ttgcctcctg tccccccccc ccttttca 1980
tcaaaaattt ccatgaaaaa agaaaagatg aatttgtcca ttcattgaac cctagttcg 2040
gactgacggg gctcgaacc gcagcttcg cctgttccctt gccttcagg gcccagcgtt 2100
agcaatacc ca gcccacagcac cctcaaccc tc agcaaccaac caagggtatc tatcttgcaa 2160
cctctctaga tc catcaatcc actcttgtgg tgggttgtggc tctgtcctaa agttcactgt 2220
agacgtctca atgtaatggt taacgatata acaaaaccgcg gaacacaaga acgaaagcac 2280
cttttcatttc ttccatatac taggggttt tacttgaaaa agacaatgtt ccatactaaa 2340

ggatagctgc agaaggccgcc accgttctga ggacacctcg gggagccaga ccggtcgaac 2400
cgtgcctcca cttgtctaagg agaaaggaa aatcaggggcc aggacatacg aaggaggagc 2460
cagaacgaag atatcctaag atactactc gctccgggcc atgatcaatc atgcctgtgg 2520
ggaggtctct cgcacctcga tccatgaagg taccaccgag gtctgccccg ccggccggct 2580
cggtaccgtc ctgccttgg gcgcggagg cacccggggg atggactgcc caggcgcagc 2640
cacgacgacc caaggatcac cctctgcgc agtccggcagc agcaatagt tctggggAAC 2700
aggcagcttg gcctgactcc ccggggtcac ctcaactacc tcggccgagg ggtcaagtac 2760
cccttcagtc cgcccccgct ctgggacccg ggaccccgac gtccggcccg ccggataccga 2820

cgggcaccaggc ccgctcgaaa gctggcttga cgacccctgg cccagcctca gatctgggt 2880
gaggcccggagg caggcgccca tgtcgctgc ttcatcatcg tttcatcat cgtcgctgc 2940
atcaggcgctc tccggcgacg gtccttgg gagccccctcc ctctctgtcc gacgacgaaag 3000
cctttccaag gcatacccgag cccacgtccg ctctgtggcc cgagcccttct ttgcgtcctt 3060
cttctcccttc ctcttctccg cggtgaccct ccgcgcagct cggccacccg catccctccgg 3120
gactgggtggc agggaaaggct tgtgtatgccc taccccttgg agacagacga aaagtcttag 3180
ctatgagaac cgaggccaat ctgacccaaag aagaagaag gagccggataac tcaccagaga 3240
cacgcaccccg cgatcgggac gcattaaaggg ctggggaaaaaa gtggccggct ctaatttcgc 3300

taccgtgccg tccacccacc tgtggaggc atcgatggaa aggggaa 3347

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

<400> 28

actagttcc tagccgcgt cgtccccata ccccacccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
 cacggttctt cgtggccgccc cctaaggatg taaaatggtcg gtaaaatccg gtaaattcc 120
 ggtaccgttt accagattt tccagccgtt tcggattata tcggatata cagaaaacga 180
 gacgaaacg gaatagggtt ttttcgaaa acggatcggt aaacggtgag acaaactac 240
 cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtattgtc ccgtatattc 300
 ccgaccacg gacctgcca tcaaccatca gccagtcage ccatccccac agctatggcc 360
 catggggcca tttggccac atgcccacgc aacgaaggc agtaaggctg gcagccctggc 420

acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtttctg tgccgttgt 480
 cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggctctccg gagctggac 540
 tgcgctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agcccaagc taccaggccc 600
 ccaagtcccc atccatctct gtttctgtt tcatctcctt cccctggctg atctgcaggc 660
 gccagaccc 669

<210> 29

<211> 200

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 29

gccgaaggcat caaaaaacgc actaagaccc cgaaggagtc aaaccactcc tccgaggcct 60
 cgggggetac accccggcggg tgcgctcgcc cgccacccacc ggaacaaaat gtaaccgaga 120
 aaggtcggtc cccttgccaa aaaagtgcga caaaaggctc caagcgatg ttaacactca 180
 ctttggggctac 200

<210> 30

<211> 812

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Fragment of maize Huck-1 retrotransposon

<400> 30

tgtcgccggac cataattagg ggtacccca agactctaa tctcagctgg taaccccat 60
 cagcacaagc ctgcaaggc ctgatgggtg cgattaagtc aaggctcggt ccactcaagg 120
 gacacgatct cgccctcgccc gagcccgacc tcggcaagg gcccggacc ccgaggattc 180
 acgtctcgcc cgaggccccctcaagcgac gggcacacct tcggctcgcc cgaggccat 240
 tcttcgcccga gaagcacct tggccagatc gccacaccga ccgaccgtat cgccaggagca 300
 tttaatgcga ggatcgctg acacccatc ctgacgcgctg ctcttcagtc gacagagccg 360
 aagtgcgcgca aatcaattcg ccgtccact gaccgacccg acaagaagac agcggccct 420

gcgtcgctcc gactgctgtg ccactcgaca gagtgaggct gacagcagcc aagtccggcc 480
 tcggcccca taggaagctc cgcctcgccc gacccttaggg ctggactcg gcctcggtc 540
 cggaaagacga cgaactacgc ttgcggcgc cccagggtt ggactcagcc tcggctccgg 600
 aagacgcgca atccgcctc gccccggcc agggctcgga ctggccctcg gctccagaag 660
 acgacgaaact ccgcctcgcc cgaccccgagg gctcgactc agcctcggt ccggaaagacg 720
 acgaactccg cctcgcccgaa ccccgaggct cggactcagc ctggccctca gacgatggtc 780
 tccgcctcgcc cggacccggg gctcgactc 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 ggaccttgtc agatcctgtc ttgcgtccgag gaggctttgg caatcctcac 60
tatgtactcg gtcttagggg agtggccctt caacaaactg gtacgaatca caccgcaca 120
ttcaggaact ccgggaccat tgactctcta gatgagatac cacctaaga caacagcggc 180
gcaccttgga atgactactc ccatgtgctg aatcatgtta cttttgtgctc ctggccaggt 240
gagatctcag gtccgactc atggagagca ccaatgttct cttggacgca tcgttagcgt 300
acccccacaa acaccattga tccagagaga atcac 335

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

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

<400> 32
tcattttca agaactgcat atcttgcga gatcctcatc cctaaaggta cttgacaata 60
gtattattgg agtcgatata caactcacaa aaaataacaag aagtgcacta ggtggattgg 120
tccgagtcaa gaaaaaaa agccatacag aactcaaaat ctttccgga gatattcatt 180
ttcctgaaga ggcggataag atatttagtg gcagttgtat accaccagaa agagaaaaaa 240
aagattctaa ggaatcaaaa aaaaggaaaa attgggtta tgttcaacgg aaaaaatttc 300
tcaaaagcaa gaaaaagtat t 321

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

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

<400> 33
gtggctatcc atctatac

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 tggcccgccgt ttgtatcgttaccatt acattgagac gtctacagt 60
aacttagga cagagccaca aacaccacaa gagtgattg atgatctaga gaggttcaa 120
gatagatacc ctgggttgt tgctgagtt gagggtgtg tggctgtat tgcttacgt 180
ggccctgga aggctaggaa c 201
```

<210> 35

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 35

```
cctcaacctc agcaaccaac caatggtac tatctgcaa cctctctaga tcatcaatcc 60
actctgtgg tgggtggc tctgtcctaa agttactgt agacgtctca atgtaatgg 120
taacgatatac acaaaccg 138
```

<210> 36

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 36

agagaagagg gatct

15

<210> 37

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Represents part of PHI8999A insert sequence -

fragment of polylinker

<400> 37

cgaagctcg gccggggccc atcgatatcc gcgggcatgc ctgcagtgca gcgtgacccg 60
gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta 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

ctcaactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaatttc 60
atttgcatgt cagtttttc tattcgatct ttatgttaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatcagat tattgactgt catttgcattt aaatcggtt taatggatat ttttattata 180
atattgtatc tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa tatttttgcg 240
tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacatttattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cggtagatt cttcatgca tagcacctca 360
ttcttgggaa caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420

tcctcggtt ggatcatctc atcaggcca atcaaatttgc tccaagaact cattttagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtgggtatc 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 cacaggtgg tagtagaga atacctagg 60
gcgcgagaca actctctcta aggaactcg 120
gtcccccc 128

<210> 40

<211> 392

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Fragment of maize chloroplast genome

<400> 40

ctaacaataa acgaataacgg tttatgtatg gattccggta aaataccggt actcgattc 60
 ataagagtgc aataggaagt taagatgagg gtggtatcat cataaaaaatg gagtagtac 120
 ctaaattata ctaatccacg tatgatatgt atgccttcc ttatcaaccg gaagtagtgc 180
 aaaaaaaatt ctatactgca ctgctctttt tttactgaga aatgcaaaaa aataaaagtg 240
 aagtaagggt gccccataga tatttgatct tgccctctgt cccccccccc ctttttcat 300
 caaaaatttc catgaaaaaaaaaaa gaaaagatga atttgcatt tcattgaacc ctatgtcggg 360
 actgacgggg ctgcgaaaccgg cagcttcgc 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

gttccttagcc ttccagggcc cagcgtaagc aataccagcc acagcacccct caacctcagc 60
 aaccaaccaa gggttatctat cttgcaacct ctctagatca tcaatccact cttgtggtgt 120
 ttgtggctt gtcctaaagt tcaactgtaga cgtctcaatg taatggtaa cgatatcaca 180
 aaccgcgg 188

<210> 42

<211> 81

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Fragment of maize chloroplast ORF241 (complement)

<400> 42

cacaagaacg aaagcacctt ttcattcttt catabactag gggttttac ttggaaaaga 60
 caatgttcca tactaaagga t 81

<210> 43

<211> 254

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 43

agctgcagaa gccgccacccg tcttgaggac cttccgggaa gccagacccg tcgaaccgtg 60
 cctccacttg ctaaggagaa agggaaaatc agggccagga catacgaagg aggagccaga 120
 acgaagatata ctaagatac ttactcgctc cggccatga tcaatcatgc ctgtggggag 180
 gtctctcgca cctcgatcca tgaaggtacc accgaggtct gccccccgc cggcttcgg 240

accgtcctcg cctt 254

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

<400> 44
ggcgccccga ggacccggg ggatggactg cccaggcgcga gccacgacga cccaaggatc 60
accctctgc gcagtggca cgagcaatag ttctcgggaa acaggcagct tggctgact 120
ccccgggtc acctcaacta cctcggccga gggtaagt acccccttag tccggccccc 180
ctcttcggac cgggaccccg acgtcccgcc 240
gggctggctt gacgacccct ggcccagccct cagatctggg ctgaggccga ggcaggccgc 300
catgtcgctcg tttcatcat cgtttcatc atcgctcg tcatcaggcg tctccggcga 360
cggctccctt gggagccctt cccttcctg ccgacgacga agcatttcca aggcatcccg 420

agcccacgtc cgctcggtggg cccgagccctt ctttgcgtcc ttcttcct tcctttctc 480
cgcggtgacc ctccgcgcag ctgggtccac cgcatctcc gggactgggt gcaggaaagg 540
cttgtatgc cttaccttcctt ggagacagac gaaaagtctc agtatgaga accgaggcga 600
atctgacgca agaaggaaga agggagccgt actcaccaga gacacgcacc cgcatcggtgg 660
acgcattaaag ggctggaaaa aagtggccgc ctctaatttc gctaccgtgc cgtccaccca 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 ctttctatc 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 tcattttca 20

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

<220>
<223> 5' event flanking sequence; junction between regions 5 and 6

<400> 47
gaaaagtatt gtggctattt 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
ggcttaggaac 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
agaggatct cgaagttcg 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
agctatgtt 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
gtgccccccg ctaacaataa 20

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

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

<400> 56
gcttccgcct gttcctagcc 20

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

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

<400> 57
aaaccgcgga acacaagaac 20
3