

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 320 527**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.1999 E 01129274 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **07.10.2015 EP 1197567**

54

Título: **Caracterización de la función génica usando inhibición por ARN bicatenario**

30

Prioridad:

03.07.1998 GB 9814536

09.12.1998 GB 9827152

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:

16.11.2015

73

Titular/es:

**DEVGEN NV (100.0%)
TECHNOLOGIEPARK 30
9052 GENT-ZWIJNAARDE, BE**

72

Inventor/es:

**PLAETINCK, GEERT;
PLATTEEUW, CHRIST;
MORTIER, KATHERINE y
BOGAERT, THIERRY**

74

Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 320 527 T5

DESCRIPCIÓN

Caracterización de la función génica usando inhibición por ARN bicatenario

5 La presente invención se refiere a la caracterización o identificación de la función de genes usando la inhibición por ARN bicatenario (ARN_{bc}) y métodos de identificación del ADN responsable de la inducción de un fenotipo específico en una célula y un método de asignación de la función a secuencias de genes conocidas.

10 Se ha descrito recientemente en Nature Vol 391, págs. 806-811, Febrero 1998, que la introducción de ARN bicatenario en una célula da como resultado una interferencia potente y específica con la expresión de genes endógenos en la célula y siendo la interferencia sustancialmente más eficaz que proporcionar individualmente cualquier cadena de ARN como se propone en la tecnología antisentido. Se descubrió que esta reducción específica de la actividad del gen también sucedía en el helminto nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) cuando se introducía el ARN en el genoma o en la

15 cavidad corporal del helminto. Los presentes inventores han utilizado esta técnica y la han aplicado adicionalmente para encontrar nuevos e ingeniosos métodos de asignación de funciones a genes o fragmentos de ADN que se han secuenciado en diversos proyectos, tales como, por ejemplo, el proyecto genoma humano, y a los que todavía hay que dar una función particular, y para usar en la identificación del ADN responsable de conferir un fenotipo particular.

20 El documento WO 90/14090 describe un método para producir ARN bicatenario in vitro por transcripción de cadenas molde clonadas en vectores pGEM. Se preparan dos cadenas sencillas de ARN separadas en reacciones de transcripción in vitro separadas y posteriormente se hibridaron para producir un ARN bicatenario.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona un método de introducción de ARN_{bc} o ADN capaz de producir ARN_{bc} en un animal no humano, comprendiendo el método suministrar a dicho animal una célula bacteriana o de levadura adecuada que comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN situada entre dos promotores de manera que son capaces de iniciar la transcripción de dicha secuencia de ADN en ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a

30 promotores. Un método de identificación del ADN responsable de conferir un fenotipo en una célula puede comprender a) construir una genoteca de ADN_c o genómico del ADN de dicha célula en una orientación en relación con el promotor (o promotores) capaz de promover la transcripción de dicho ADN_c o ADN en ARN bicatenario (bc) tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dicho promotor (o promotores), b) introducir dicha genoteca en una o más de dichas células que comprenden dicho factor de

35 transcripción y c) identificar y aislar un fenotipo deseado de dicha célula que comprende dicha genoteca e identificar el fragmento de ADN o ADN_c de dicha genoteca responsable de conferir dicho fenotipo.

La genoteca puede organizarse en combinaciones jerárquicas como se describe con más detalle en los ejemplos proporcionados, antes de la etapa b) tal como para incluir, por ejemplo, familias de genes.

40 Un método de asignación de función a una secuencia de ADN conocida puede comprender a) identificar un homólogo (u homólogos) de dicho ADN en una célula, b) aislar el ADN homólogo (u homólogos) pertinente o un fragmento del mismo de dicha célula, c) clonar dicho homólogo o fragmento en un vector apropiado en una orientación con relación a un promotor (o promotores) capaz de promover la transcripción de ARN_{bc} tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores, d) introducir dicho vector en dicha célula de la etapa a) que comprende dicho factor de transcripción, y e)

45 identificar el fenotipo de dicha célula en comparación con el tipo silvestre.

En la invención, la secuencia de nucleótidos o de ADN puede proporcionarse entre dos promotores idénticos. En ambos métodos descritos anteriormente el ARN_{bc} se proporciona a partir de la transcripción iniciada a partir del promotor tras la unión de su factor de transcripción apropiado.

50 La célula de acuerdo con dicho método puede proceder de o estar contenida en un organismo. Cuando la célula está contenida en un organismo, el organismo puede adaptarse para expresar el factor de transcripción apropiado. El organismo puede ser cualquiera no-humano, animal, pero preferiblemente puede ser el helminto nematodo *C. elegans*, que puede ser cualquiera de un tipo silvestre, un mutante nuc-1 o pha-ts de *C. elegans* o una combinación de dichas mutaciones. En una realización alternativa, la genoteca de ADN o ADN_c o el ADN homólogo o fragmento del mismo puede transfectarse o transformarse ventajosamente en un microorganismo, tal como una célula bacteriana o de levadura, que puede suministrarse al organismo, que es preferiblemente el helminto nematodo *C. elegans*. En esta realización de la invención, el microorganismo puede adaptarse para expresar el factor de transcripción apropiado. Preferiblemente, el microorganismo es *E. coli*.

60 En cada aspecto de los métodos descritos, la genoteca de ADN, homólogo de ADN o fragmento de ADN puede construirse en un vector de ADN adecuado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho factor de transcripción. Como alternativa, dicho factor de transcripción está codificado por un vector adicional. En una alternativa adicional más, la célula u organismo puede expresarse o adaptarse para expresar dicho factor de transcripción. Preferiblemente, cualquiera de los vectores usados en el método de acuerdo con la invención comprende un marcador de selección que puede ser, por

65 ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica sup-35 o un fragmento del mismo. La secuencia de nucleótidos puede orientarse en relación con un promotor de manera que la unión de un factor de

transcripción al promotor inicia la transcripción del ADN en ARN bicatenario. La Figura 10 ilustra los vectores y la orientación de la secuencia de ADN que permite la producción de ARN bicatenario en *C. elegans*. De esta manera, en una realización el ADN se localiza entre dos promotores en un vector capaz de expresar ARNbc después de la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores. Como alternativa, el vector comprende dos copias de la secuencia de ADN organizada en una orientación sentido y antisentido con relación al promotor y cuyo marcador es de selección cuando está contenido en un *C. elegans* mutante pha-1. Preferiblemente, los promotores son cualquiera de los promotores T7, T3 o SP6 y el factor de transcripción comprende la polimerasa apropiada.

Preferiblemente el marcador de selección comprende una secuencia de nucleótidos capaz de inhibir o impedir la expresión de un gen en dicha célula y siendo dicho gen responsable de conferir un fenotipo conocido. Esta secuencia de nucleótidos puede ser parte de o idéntica a dicho gen que confiere dicho fenotipo, y estando dicha propia secuencia de nucleótidos orientada en relación con un promotor (o promotores) adecuado capaz de iniciar la transcripción de ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dicho promotor (o promotores). Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede ser una parte de o idéntica a dicha secuencia génica que confiere dicho fenotipo, y siendo dicha secuencia de nucleótidos tal que permite la integración de dicho vector adecuado o adicional por recombinación homóloga en el genoma de dicha célula y a continuación dicha integración de dicha secuencia de nucleótidos es capaz de inhibir la expresión de dicha secuencia génica que confiere dicho fenotipo. En esta realización, dicha secuencia de nucleótidos comprende codones de terminación suficientes para impedir la traducción de dicha secuencia de nucleótidos después de su integración en dicho genoma.

En dicho método, ventajosamente, pueden añadirse compuestos a dicha célula u organismo con el propósito de exploración para fenotipos deseados, tales como por ejemplo, resistencia o sensibilidad al compuesto cuando se compara con el tipo silvestre. Los promotores son preferiblemente inducibles. En algunas realizaciones el factor de transcripción puede proceder de fagos, tal como por ejemplo, una polimerasa T7 dirigida por un promotor de fago. Sin embargo, cuando se utiliza *C. elegans* puede usarse un promotor específico de helmintos o específico de tejido, tal como let858, SERCA, UL6, myo-2 o myo-3. Preferiblemente, la cepa de *E. coli* es una cepa ARNasa III, e incluso más preferiblemente, ARNasa negativa.

Un método de generación de un organismo transgénico no humano que comprende un factor de transcripción exógeno y un transgén que comprende un promotor unido operativamente a un fragmento de ADN que se expresa tras la unión de dicho factor de transcripción al mismo, puede comprender a) proporcionar un primer organismo transgénico que comprende una primera construcción que incorpora ADN que codifica un factor de transcripción exógeno y un segundo organismo transgénico que comprende una segunda construcción que incluye al menos un promotor unido operativamente a una secuencia de ADN deseada que se expresa tras la unión del factor de transcripción de dicho primer organismo transgénico al mismo b) cruzar dichos primer y segundo organismos transgénicos y seleccionar los descendientes que expresan dicha secuencia de ADN deseada. En una realización, dichos primer y segundo organismos transgénicos se generan mediante la transformación de dichas primera y segunda construcciones en los microorganismos respectivos para el posterior suministro al organismo respectivo. Preferiblemente, dicha segunda construcción comprende dicha secuencia de ADN deseada en una orientación en relación con dicho promotor de manera que es capaz de iniciar la transcripción de dicho ADN en ARNbc tras la unión de dicho factor de transcripción al mismo. En esta realización, dicha segunda construcción comprende dos promotores que flanquean dicha secuencia de ADN deseada, pudiendo dichos promotores iniciar la transcripción de dicha secuencia de ADN en ARNbc tras la unión de dicho factor de transcripción a dichos promotores.

En cada una de estas realizaciones, la primera y/o segunda construcciones pueden proporcionarse preferiblemente con un gen indicador unido operativamente a un promotor que es capaz de iniciar la transcripción de dicho indicador tras la unión de dicho factor de transcripción al mismo. Preferiblemente, el gen indicador codifica cualquiera de luciferasa, proteína verde fluorescente, β -galactosidasa o β -lactamasa.

Un método de validación de clones identificados en experimentos de vectores de doble híbrido en levadura, siendo dichos experimentos bien conocidos por los especialistas en la técnica y siendo dichos experimentos propuestos por primera vez por Chien et al. (1991) para detectar interacciones proteína-proteína, puede comprender proporcionar una construcción que incluye el ADN que codifica una proteína identificada en un experimento de vectores de doble híbrido, siendo su construcción tal que dicho ADN se proporciona en una orientación en relación con uno o más promotores capaz de promover la transcripción de dicho ADN en ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores, transformando una célula, tal como una célula bacteriana o, como alternativa, transformando un organismo que comprende dicho factor de transcripción con dichas construcciones e identificando un cambio fenotípico en dicha célula u organismo, que puede ser *C. elegans* o similar, comparado con el tipo silvestre. Preferiblemente, el factor de transcripción es inducible en la célula u organismo. Una vez más la secuencia de ADN puede localizarse entre dos promotores, como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el promotor es un promotor de polimerasa de fago y dicho factor de transcripción es una ARN polimerasa, y preferiblemente polimerasas T7. También están divulgados los vectores usados para transformar dichas células u organismos y las propias células u organismos.

Un método de mitigación de infestación por plaga de plantas, puede comprender a) identificar una secuencia de ADN de dicha plaga que es fundamental tanto para su supervivencia, desarrollo, proliferación o reproducción, b) clonar dicha secuencia de la etapa a) o un fragmento de la misma en un vector adecuado en relación con uno o más promotores capaces de transcribir dicha secuencia en ARN o ARNbc tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores y c) introducir dicho vector en la planta.

Por lo tanto, ventajosamente, el método proporciona un mecanismo particularmente selectivo para mitigar una infestación por plaga, y en algunos casos la infestación parasitaria de plantas, de manera que cuando la plaga se introduce en la planta digerirá el ARNbc expresado en la planta inhibiendo de esta manera la expresión del ADN dentro de la plaga, que es fundamental para su desarrollo, supervivencia, proliferación o reproducción. En una realización preferida, la plaga puede ser cualquiera de *Tylenchulus* ssp., *Radopholus* ssp., *Rhadinaphelenchus* ssp., *Heterodera* ssp., *Rotylenchulus* ssp., *Pratylenchus* ssp., *Belonolaimus* ssp., *Canjanus* ssp., *Meloidogyne* ssp., *Globodera* ssp., *Nacobbus* ssp., *Ditylenchus* ssp., *Aphelenchoides* ssp., *Hirschmenniella* ssp., *Anguina* ssp., *Hoplolaimus* ssp., *Heliotylenchus* ssp., *Criconemella* ssp., *Xiphinema* ssp., *Longidorus* ssp., *Trichodorus* ssp., *Paratrichodorus* ssp., *Aphelenchus* ssp. La secuencia de ADN o fragmento de la misma de acuerdo con este aspecto de la invención puede clonarse entre dos promotores específicos de tejido, tales como dos promotores específicos de raíz.

El vector usado en cada uno de los métodos descritos en este documento para la construcción de dicha genoteca, comprende dos promotores idénticos orientados de manera que son capaces de iniciar la transcripción de una secuencia de ADN localizada entre dichos promotores en ARNbc tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores. La secuencia de ADN puede, por ejemplo, incluir un sitio de clonación múltiple. Preferiblemente, el vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica dicho marcador de selección se localiza entre dos promotores idénticos orientados de manera que son capaces de iniciar la transcripción del ADN localizado entre dichos promotores en ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores. Preferiblemente, el marcador de selección comprende una secuencia de nucleótidos que codifica sup-35, para la introducción en *C. elegans* que tiene una mutación pha-1.

Preferiblemente, el factor de transcripción comprende una polimerasa de fago que se une a su correspondiente promotor o un promotor específico de *C. elegans* e incluso más preferiblemente una polimerasa T7. Preferiblemente, el vector incluye un sitio de clonación múltiple entre dichos promotores idénticos.

Un vector de expresión para expresar un factor de transcripción apropiado puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica dicho factor de transcripción unido operativamente a secuencias de control de la expresión adecuadas. Preferiblemente, las secuencias del control de la expresión incluyen promotores que son promotores inducibles, constitutivos, generales o específicos de tejido, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el factor de transcripción comprende una polimerasa de fago, y preferiblemente ARN polimerasa T7, T3 o SP6.

En este documento se describe un sistema de selección para identificar la transformación de una célula u organismo con un vector, comprendiendo dicho sistema un vector que se describe en este documento en el que dicho marcador de selección comprende una secuencia de nucleótidos capaz de inhibir o impedir la expresión de un gen en dicha célula u organismo, siendo dicho gen responsable de conferir un fenotipo conocido. Preferiblemente, dicha secuencia de nucleótidos corresponde a una parte de o es idéntica a dicho gen que confiere dicho fenotipo conocido, y estando dicha propia secuencia de nucleótidos localizada entre dos promotores idénticos capaces de iniciar la transcripción de ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a los mismos. De manera alternativa, la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que es una parte de o idéntica a dicha secuencia génica que confiere un fenotipo conocido en dicha célula u organismo, y que es tal que tras la integración de dicho vector por recombinación homóloga en el cromosoma de dicha célula u organismo dicha secuencia inhibe la expresión de dicha secuencia génica que confiere dicho fenotipo conocido. Preferiblemente, de acuerdo con esta realización, la secuencia de nucleótidos comprende codones de terminación suficientes para impedir la traducción de la secuencia de nucleótidos tras la integración en dicho cromosoma.

Preferiblemente, la secuencia génica conocida comprende un gen sup-35 o un fragmento del mismo que puede seleccionarse por identificación de descendientes que crecen a una temperatura superior a 25°C tras la introducción en un helminto *C. elegans* mutante pha-1 et123ts.

Un método de asignación de función a una secuencia de ADN de un organismo multicelular puede comprender a) proporcionar i) una construcción que comprende dicho fragmento de ADN clonado entre dos promotores capaces de promover la transcripción en dicho organismo multicelular, en un organismo multicelular capaz de iniciar la transcripción a partir de dicho promotor; b) identificar el fenotipo de dicho organismo multicelular en comparación con el tipo silvestre.

La presente invención puede entenderse más claramente mediante los siguientes ejemplos que son puramente ejemplares con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 es una secuencia de nucleótidos del plásmido PGN1 de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 es una secuencia de nucleótidos del plásmido PGN100 de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 es una representación esquemática de los vectores usados y del régimen de transformación

usado en los métodos descritos en este documento.

La Figura 4 es una ilustración de un vector de expresión usado de acuerdo con la invención.

La Figura 5 es una ilustración esquemática de los vectores de expresión de ARN polimerasa T7 usados para la transformación de *C. elegans*.

5 La Figura 6 es una ilustración del plásmido pGN1.

La Figura 7 es una representación esquemática de un vector mejorado para la inhibición por ARNbc que codifica el ARNbc de sup-35.

La Figura 8 es una ilustración de un vector para la integración en el genoma de *C. elegans*.

10 La Figura 9 es una ilustración de la posición de una secuencia (o secuencias) de ADN en relación con un promotor adecuado para iniciar la expresión de ARNbc a partir de la secuencia (o secuencias) de ADN.

La Figura 10 es una representación del plásmido pGN108.

La Figura 11 es una representación del plásmido pGN105.

La Figura 12 es una representación del plásmido pGN400.

La Figura 13 es una representación del plásmido pGN401.

15 La Figura 14 es una representación del plásmido pGN110.

La Figura 15 es una representación del plásmido pAS2 con promotores T7/T3/SP6 directos e inversos.

La Figura 16 es una representación del plásmido pGAD424 con promotores T7/T3/SP6 directos e inversos.

La Figura 17 es una representación del plásmido pAS2 -cyHA+, both T7-final.

20 La Figura 18 es una representación del plásmido pGAD424-without-FULL-ICE-BOTH-T7.

La Figura 19 (a) es una representación del plásmido pGN205 y (b) es una representación del plásmido pGN207.

Ejemplo A: Construcción de una genoteca de ADNc ordenada y combinada jerárquicamente y aplicaciones de la misma.

25 Genoteca ordenada y combinada aleatoria

El vector es un vector de *E. coli* que contiene dos promotores T7, con un sitio de clonación múltiple (MCS) entre medias. Los dos promotores están orientados uno hacia el otro, y hacia el MCS. En presencia de ARN polimerasa T7, expresada en *E. coli*, *C. elegans* o cualquier otro organismo, se producirá ARN, comenzando a partir de los dos promotores T7. Como estos están orientados en sentido opuesto, se producirán ambas cadenas de ARN a partir del ADN insertado (clonado) en el MCS entre los dos promotores, dando como resultado la generación de ARN bicatenario (ARNbc) tras la unión de la ARN polimerasa T7 a los mismos.

En el MSC se construye una genoteca de ADNc de *C. elegans* usando técnicas de biología molecular convencionales. La genoteca se transforma dentro de *E. coli*, y las *E. coli* resultantes se cultivan y almacenan en placas multipocillo de 96. En esta fase, el ADN plásmido puede aislarse y almacenarse en placas multipocillo de 96 que se corresponden con los de las colonias de *E. coli*. Se puntúan aproximadamente 100.000 colonias. De este modo, la genoteca alojará aproximadamente 5 veces las variaciones totales de ADNc expresado de *C. elegans*, lo que proporciona la oportunidad de que las secuencias poco expresadas estén presentes en la genoteca. Esto dará como resultado aproximadamente 1041 placas de 96 pocillos. Las placas se combinan jerárquicamente según sea necesario. Por ahora la combinación de clones se dispone en un intervalo de 10 a 100. Si la combinación jerárquica es por 8 o 12 (son números más convenientes ya que las placas de 96 pocillos tienen una rejilla de 8 por 12), esto dará como resultado aproximadamente 87 placas multipocillo y aproximadamente 8352 pocillos. Si la combinación jerárquica es por 96 pocillos, que es una placa completa, dará como resultado aproximadamente 11 placas y aproximadamente 1041 pocillos. El ADN plásmido puede aislarse en cualquier fase de la combinación jerárquica, que sería menos complicado cuantas menos placas se usasen, pero daría como resultado una pérdida de complejidad aunque este no debería ser el caso en la combinación por 12. La combinación del ADN también puede llevarse a cabo con el ADN original.

Los siguientes experimentos describen cómo debe realizarse la combinación jerárquica, tanto para el ADN como para la genoteca de *E. coli*.

Una genoteca ordenada para la tecnología de ARNi que contiene todos los genes del genoma de *C. elegans*, con aplicaciones de la misma

Como el proyecto de secuenciación del genoma está llegando a su fin, puede usarse esta información en la aplicación de la tecnología de inhibición por ARN de T7. Todos los genes del genoma de *C. elegans* pueden clonarse usando la tecnología de PCR. Se clonarán, con preferencia, los exones con una longitud mínima de 500 pb. Si los exones son demasiado pequeños, los fragmentos más pequeños se aislarán con PCR, o incluso partes de intrones y exones vecinos se aislarán con la tecnología de PCR de manera que se clone al menos una parte suficiente de la región traducida del gen. Para esto, es necesario realizar al menos 17000 reacciones de PCR. Esta colección de productos de PCR se clonará en un vector T7 como se ha descrito (dos promotores T7 orientados uno hacia el otro con un sitio de clonación múltiple entre medias). Cada producto PCR se clona independientemente, o puede usarse para generar una genoteca aleatoria, análoga a la genoteca de ADNc descrita. Si cada producto PCR se clona individualmente, la bacteria resultante y el ADN plásmido pueden combinarse de diversas maneras. En primer lugar, esta colección de productos PCR clonados individualmente en el vector de ARNi T7 puede combinarse aleatoriamente, como se ha descrito en la genoteca aleatoria. Esta combinación también puede hacerse de una manera más racional. Por ejemplo, pueden analizarse los

genes del genoma de *C. elegans* usando herramientas bioinformáticas (biología in silico). Diversos genes del genoma pertenecerán a una familia de genes, o tendrán homólogos en el genoma. Estos miembros de la familia de genes se combinarán, o se combinarán los miembros que sean homólogos. De esta manera el número total de aproximadamente 1700 clones se reduce a una cantidad más manejable. Esta genoteca puede usarse para explorar fenotipos en los métodos de acuerdo con la invención. El fenotipo resultante proporciona una descripción funcional para el gen o familia de genes u homólogos de genes del genoma de *C. elegans*. Como la genoteca consta de una parte de todos los genes en el genoma, este método permite la descripción del genoma completo en términos fenotípico-funcionales. Para esto es necesario introducir el ARN bicatenario (ARNbc) en el helminto. Esta introducción de clones solos o clones combinados, siendo una combinación aleatoria o combinación racional, puede conseguirse de varias formas como se describe.

Ejemplo de un vector para la expresión de ARNi bicatenario

Puede usarse cualquier vector que contenga un promotor T7, y que contenga un sitio de clonación múltiple (hay muchos disponibles en el mercado). Se diseñan cebadores que contienen el promotor T7 y un cebador con la cadena complementaria inversa, ambos con los extremos apropiados. Estos cebadores pueden hibridarse, y si están bien diseñados, clonarse en el vector de elección. La secuencia mínima para un promotor T7 es TAATACGACTCACTATAGGGCGA. Aunque puede usarse cualquier vector para la construcción de un vector de expresión T7, a continuación hay un ejemplo de cómo conseguir esto con el vector pGEM-3zf(-).

- Se digirió el vector pGEM-3zf(+) (PROMEGA) con HindIII y Sall
- Se mezclaron juntos los cebadores oGN1 y oGN2 a una concentración final de 1 µg/30 µl llevados a ebullición y enfriados lentamente a temperatura ambiente.
- El cebador se ligó en el vector usando procedimientos de ligamiento convencionales. El vector resultante es pGN1 (se muestra en la Figura 1) y contiene dos promotores T7 orientados uno hacia el otro, y contiene un sitio de clonación múltiple entre medias.

Las secuencias de oGN1 y oGN2 son:

- oGN1: AGC TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AGA AGC TT
- oGN2: TCG AAA GCT TCT CGC ATA ATA GTG AGT CGT ATT AC

Ejemplo de la construcción de una genoteca

Puede aislarse ARN de todo organismo que sea sensible a ARNi. En general, el ARN aislado se copia después en ADNc bicatenario y posteriormente se prepara en vectores adecuados para la clonación. Existen varios procedimientos y pueden adquirirse kits de biología molecular de diversas firmas incluyendo promega, clontech, boehringer Mannheim, BRL, etc. que permiten:

- aislamiento de ARN,
- finalmente, puede aislarse ARN poliA (disponibles varias técnicas y kits)
- sintetizar la primera cadena con transcriptasa inversa de AMV, cebadores hexaméricos aleatorios y/o cebador oligo (dT)
- sintetizar la segunda cadena con ARNasa H, ADN Polimerasa I,
- nivelar los extremos con ADN Polimerasa T4
- adición de un adaptador con ADN ligasa T4
- finalmente, tratamiento con polinucleótido quinasa T4
- clonación del ADNc en el vector.

Puede considerarse la mezcla de ligamiento resultante como la genoteca de ADNc. El ligamiento contiene todo el ADNc del procedimiento ligado en el vector de interés.

Para ordenar la genoteca, el ligamiento debe transformarse en cepas de *E. coli*.

Aplicación de esta *E. coli* o genoteca de ADN

Cepa de producción de ARN T7:

- BL21 (DE3) es una cepa patrón: F-ompT[lon]hsds(r-m-; y cepa B de *E. coli* λ (DE3). Finalmente pueden usarse variantes de BL21 (DE3), aunque se usa BL21 (DE3)pLysS.
- es necesario construir cualquier otra cepa de *E. coli* que produzca la ARN polimerasa T7, que puede estar disponible. Esto puede generarse fácilmente usando un fago que esté disponible en el mercado, en este caso, se usa el vector λCE6 (proporcionado por Promega). Con este fago pueden transfectarse casi todas las cepas de *E. coli* y producirá ARN polimerasa T7.
- un mutante ARNasa III de *E. coli*:

En principio están disponibles diversas cepas, se elige usar en un primer experimento la cepa AB301-105: rna-19, suc-11, bio-3, gdhA2, his95, rnc-105, relA1, spoT1, metB1. (Kinder et al. 1973 Mol Gen. Genet 126: 53), pero pueden adaptarse mejor otras cepas. Esta cepa se infecta con λCE6 y de esta manera se construirá una variante que produzca T7. Pueden crecer helmintos *C. elegans* de tipo silvestre sobre las combinaciones de bacterias. La bacteria está expresando la ARN polimerasa T7. Esto da como resultado grandes cantidades de ARNbc en el intestino del *C. elegans*, que se difundirán en el organismo y darán como resultado la inhibición de la expresión. Esta genoteca puede usarse ahora para la exploración de varios fenotipos. Esta técnica tiene la ventaja de que es mucho más rápida para detectar genes pertinentes en determinadas rutas que la tecnología de *C. elegans* conocida. Además, si se encuentra un fenotipo interesante, el gen responsable puede clonarse fácilmente. Usando la combinación jerárquica se puede encontrar fácilmente en una segunda exploración el clon pertinente de la combinación. El ADN insertado de este clon puede secuenciarse después.

Este experimento da como resultado DATOS genéticos y bioquímicos en una etapa.

Las cepas de *C. elegans* de tipo silvestre pueden combinarse con compuestos para explorar para determinar el fenotipo, resistencia a fármacos y/o sensibilidad a fármacos. La cepa de *C. elegans* puede ser una cepa mutante, explorando para un fenotipo aumentado, un fenotipo reducido o un nuevo fenotipo. La cepa de *C. elegans* puede ser una cepa mutante, y la exploración de genoteca puede combinarse con compuestos. Por tanto puede explorarse para resistencia a fármacos, sensibilidad a fármacos, un fenotipo aumentado, un fenotipo reducido o un nuevo fenotipo. La cepa de *E. coli* puede ser cualquier cepa que exprese ARN polimerasa T7, como BL21 (DE3), por ejemplo, pero la formación del ARN bicatenario puede potenciarse usando una cepa de *E. coli* especial que sea ARNasaIII negativa. La ARNasaIII reconoce bucles específicos en el ARNbc. Finalmente, puede usarse una cepa de *E. coli* que tenga delecionadas otras ARNasas distintas de ARNasaIII o puede usarse una *E. coli* que tenga delecionada una o más ARNasas. La expresión de la ARN polimerasa T7 en la mayoría de las cepas y construcciones de *E. coli* conocidas que están disponibles para generar cepas de *E. coli* que producen ARN polimerasa T7, comprenden generalmente un promotor inducible. De esta manera la producción de ARN polimerasa T7 está regulada, y por tanto la producción de ARNbc. Ventajosamente, puede usarse esta característica para “estimular” el suministro a los helmintos *C. elegans* en fases específicas del desarrollo. Los helmintos se desarrollan sobre las cepas de *E. coli* no inducidas. Cuando el helminto ha alcanzado la fase de interés, se induce la producción de ARN T7 en la bacteria. Esto permite el estudio de la función de cualquier gen en cualquier punto del ciclo biológico del animal.

20 **Exploración de la genoteca para homólogos de genes humanos supuestamente interesantes y asignación de función a estos genes.**

Se han aislado cientos de genes en diversos proyectos, siendo proyectos genómicos, matrices de expresión diferencial, estudios de hibridación, etc. La genoteca de ADNc descrita puede proporcionar un modo para validar o asignar la función a estos genes de una manera más rápida y eficaz. En primer lugar es necesario identificar el homólogo u homólogos o los genes del helminto mediante herramientas informáticas (biología in silico). Se desarrollan cebadores de PCR y el fragmento de ADNc se aísla usando tecnología de PCR. Puede realizarse PCR sobre las combinaciones jerárquicas. Los pocillos de combinación o individuales positivos que contienen la bacteria que tiene el ADNc apropiado se suministra a *C. elegans* y se puntúa el fenotipo.

30 Puede realizarse PCR sobre ADNc aislado de *C. elegans*. El ADN resultante puede clonarse en el vector T7 y transformarse en la *E. coli* que produce ARNbc de la que se alimentan después los helmintos *C. elegans*. Dependiendo del modo más rápido y más fiable es necesario hacer una elección.

Si el gen pertenece a una familia de genes, puede ser necesario suministrar al helminto una mezcla de bacterias. Conteniendo cada una de ellas una parte del miembro de la familia de genes. Pueden realizarse cepas de *E. coli*, condiciones de cultivo, combinaciones con compuestos, como las descritas anteriormente.

Si se usa la genoteca racional, en la que todos los genes de *C. elegans* se clonan de manera organizada y estructurada, puede rastrearse fácilmente el homólogo de *C. elegans* y finalmente los otros homólogos, ortólogos y miembros de la familia de genes en la genoteca usando biología in silico. En esta etapa no está implicada una PCR y puede aislarse la bacteria y/o el ADN sobre el que crecerá el helminto. Ejemplos

La idea de la serie de experimentos era ensayar tanto el vector de ARNi como las diversas cepas de *E. coli* que se construyeron.

45 1) Construcción de un plásmido de ensayo

Puede usarse cualquier ADNc que proporcione un fenotipo claro en el helminto cuando se anula o usado en un experimento de ARNi. Se sabe que unc-22 es un buen candidato, pero son posibles otros genes. Se optó por un sistema sensible que puede usarse en una fase posterior. El sistema se ensayó con sup-35 en un fondo pha-1. Mediante PCR se aisló el exón 5 del sup-35 y se clonó en el vector de promotor T7 pGN1. El vector resultante se denominó pGN2. Los helmintos mutantes pha-1 (e2123) no pueden producir descendientes a temperaturas superiores de 25°C. Esto es debido a un problema del desarrollo en la embriogénesis. Cuando sup-35 está anulado, o inhibido en esta cepa, los descendientes pueden crecer a esta temperatura. La combinación de helmintos mutantes pha-1 y ARNi de sup-35 es un buen sistema para validar las diversas opciones.

55 2) Ensayo del ARNi usando una cepa de *E. coli* que produce ARNbc.

- Se introdujo pGN2 en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se indujo la ARN polimerasa T7 con IPTG. Los helmintos *C. elegans* (pha-1 (e2123)) se inocularon sobre esta bacteria, y se desarrollaron a la temperatura limitada de 25°C. Como este mutante es un mutante embrionario a esta temperatura, no se observará descendencia. Si el gen sup-35 se inhibe de manera eficaz mediante el ARNbc presente en *E. coli*, se observará descendencia.

60 - Se introdujo pGN2 en la cepa de *E. coli* AB301-105 (DE3) y se indujo la ARN polimerasa T7 con IPTG. Los helmintos *C. elegans* (pha-1 (e2123)) se inocularon sobre esta bacteria, y se cultivaron a la temperatura limitada de 25°C. Como este mutante es un mutante embrionario a esta temperatura, no se observará descendencia. Si el gen sup-35 se inhibe de manera eficaz mediante el ARNbc presente en *E. coli*, se observará descendencia.

65 3) Mejora de la cepa de helminto para una mejor captación de ARNbc.

Antes de desarrollar en placas *C. elegans* pha-1 sobre la cepa *E. coli* que produce el ARN

bicatenario de sup-35. Se modificó por mutagénesis con EMS (etilico del ácido metanosulfónico) el helminto. La descendencia de este helminto mutado se desarrolló después en placas sobre la bacteria. El helminto que se alimenta de esta bacteria produce mayor descendencia que tiene una mutación que da como resultado una mejora de la captación de ARNbc y puede usarse para experimentos adicionales.

5 Integración estable del vector que produce ARNbc en el genoma del helminto que produce ARN polimerasa T7.

Puede construirse un vector de *E. coli* que contiene las siguientes características; dos promotores T7 dirigidos uno hacia el otro, con un sitio de restricción o un sitio de clonación múltiple entre medias. Además, el vector puede contener el ADN genómico de sup35 de *C. elegans*, modificado por ingeniería genética de manera que contiene varios codones de terminación a diversos intervalos, para que no pueda expresarse ninguna proteína de longitud completa a partir del fragmento de ADN genómico de sup35 como se ilustra en la Figura 8. Cualquier ADNc o fragmento de ADNc puede clonarse en el sitio de clonación múltiple entre los dos promotores T7. Cuando este vector se introduce en una cepa de *C. elegans* que expresa ARN polimerasa T7, el ADNc o fragmento de ADNc clonado entre los dos promotores T7 se transcribirá, generando ARNbc a partir del fragmento clonado.

10 El vector está diseñado para usarse en helmintos mutantes pha-1 (e2123) que expresan ARN polimerasa T7. La expresión de la ARN polimerasa T7 puede ser constitutiva o regulada, general o específica de tejido. Estos helmintos pha-1 (e2123) no pueden producir descendencia a temperaturas superiores a 25°C, debido a un problema del desarrollo en la embriogénesis. Cuando se inhibe o se anula sup-35 en esta cepa, la descendencia puede crecer a esta temperatura.

20 Cuando el vector se introduce en el helminto, el vector puede integrarse mediante recombinación homóloga (integración de tipo Campbell). Se ha demostrado que la recombinación homóloga se produce en *C. elegans*, aunque a bajas frecuencias (Plasterk y Groenen, EMBO J. 11: 287-290, 1992). La recombinación homóloga en el gen sup-35 dará como resultado una anulación del gen ya que los dos genes sup-35 resultantes alojarán los codones de terminación. Si se produce esta recombinación en los huevos, el helminto resultante y su descendencia tendrán una copia del vector integrado en el genoma. Esto puede seleccionarse ya que únicamente los helmintos cuyo sup-35 se haya anulado tendrán descendencia a temperaturas superiores a 25°C. Además, el helminto resultante producirá de manera estable ARN bicatenario a partir del fragmento de ADN clonado entre los dos promotores T7. Este helminto puede considerarse ahora como una cepa estable de helminto transgénico con una reducción de la función del gen, del que se ha clonado un fragmento entre los dos promotores T7.

25 Se puede proporcionar ADN al helminto mediante varias técnicas incluyendo inyección, transformación biolística, impregnación en la solución de ADN, alimentación con bacterias. Pueden considerarse métodos nuevos y otros que aumenten las eficacias de transformación.

30 La cepa diana de *C. elegans* puede tener además otras mutaciones distintas de la mutación pha-1 (e2123) y puede expresar otros genes distintos de ARN polimerasa T7.

EJEMPLO B: Vector de ARNi de doble híbrido en levadura

Puede construirse un vector de doble híbrido en levadura que aloje los dos promotores T7. Los vectores pueden diseñarse para replicarse tanto en levaduras como en *E. coli*. En general se preparan genotecas de ADNc para el sistema de doble híbrido en levadura en los vectores Ga14 o LexA. La genoteca se construye en vectores que tienen el dominio de activación de uno de estos genes. Puede construirse un vector que aún pueda funcionar en la exploración de doble híbrido en levadura pero que además contenga dos promotores T7 orientados uno hacia el otro con un sitio de clonación en el mismo entre medias. El orden de la secuencia en el plásmido será por tanto "estructura del plásmido, (GAL4-T7), MCS, T7, estructura". Puede usarse una genoteca de ADNc de *C. elegans* construida en este vector como una genoteca de doble híbrido en levadura patrón en un experimento para aislar proteínas que interaccionen con una proteína dada. Una vez aislado un clon, puede introducirse el plásmido en una cepa de *E. coli* que exprese la ARN polimerasa T7 y, por lo tanto, producirá ARNbc a partir del fragmento clonado. La bacteria que produce esta ARNbc puede suministrarse al helminto y pueden puntuarse los fenotipos. Como en el ejemplo anterior, este procedimiento de validación para un clon de doble híbrido en levadura recién aislado es notablemente más corto que el procedimiento convencional, que requiere etapas de clonación y/o PCR, experimentos de ARN y/o experimentos de anulación. En la mayoría de los casos los clones aislados se secuencian primero, y en base a la secuencia, se toma una decisión para continuar con experimentos adicionales. En la presente invención cada clon aislado puede introducirse fácilmente en la *E. coli* apropiada y suministrarse al helminto. Después se realiza la validación mediante el análisis del fenotipo.

55 Para aplicar este procedimiento se realizó un doble híbrido en levadura usando un gen conocido como cebo y la genoteca recién construida como diana. Las proteínas codificadas por los clones en la diana que interaccionan con la proteína cebo, darán como resultado clones de levadura positivos que expresan la molécula indicadora de modo que puede observarse mediante tinción de LacZ con X-gal. El plásmido que codifica la proteína diana se aísla directamente a partir de la cepa de levadura y se introduce en *E. coli*. La *E. coli* es *E. coli* productora de ARN polimerasa T7. En este caso, se produce un ARN bicatenario a partir del ADN clonado en el sitio de clonación múltiple del vector. Cuando este ARNbc se suministra al helminto usando los métodos descritos anteriormente, el gen se ha inhibido en el helminto, dando como resultado un fenotipo particular.

65 - Este vector de doble híbrido en levadura puede usarse ventajosamente para construir una

genoteca ordenada y combinada jerárquicamente como se ha descrito en el ejemplo anterior.

- También puede construirse una cepa de levadura que produce de forma condicionada ARN polimerasa T7. Después de los experimentos de doble híbrido en levadura, podría inducirse la expresión de la polimerasa T7, dando como resultado la producción de ARNbc en la célula de la levadura. Por consiguiente, la levadura podría suministrarse al helminto. Se dispone de pruebas que demuestran que los helmintos de *C. elegans* pueden alimentarse de levaduras.

Construcción de una cepa productora de ARN polimerasa T7 y aplicaciones de la misma

Puede construirse una cepa de *C. elegans* que exprese ARN polimerasa T7. La expresión puede ser general y constitutiva, pero también podría estar regulada bajo un promotor específico de tejido, un promotor inducible, o un promotor temporal o un promotor que incluya una de estas características o una combinación de características. Puede introducirse ADN en esta cepa de *C. elegans*. Esto se hace por inyección, por bombardeo con partículas, por electroporación o como se ha mencionado anteriormente por alimentación. Si el ADN es un plásmido como se ha descrito en los ejemplos anteriores, es decir un plásmido que aloja un fragmento de ADNc clonado o un fragmento de PCR entre dos promotores T7 flanqueantes, entonces el ARNbc de este ADNc o fragmento de PCR se forma en la célula u organismo completo dando como resultado la regulación negativa del gen correspondiente. El ADN introducido puede tener una regulación negativa transitoria eficaz. El ADN introducido puede formar una matriz extracromosómica, pudiendo dicha matriz dar como resultado una anulación o reducción más catalítica de fenotipo funcional. El plásmido también podría integrarse en el genoma del organismo, dando como resultado la misma anulación o reducción catalítica de fenotipo funcional, pero transmitiéndose de forma estable.

- Mediante técnicas convencionales puede introducirse en el helminto con ARN polimerasa T7 un ADN plasmídico que aloja un ADNc o una parte de un ADNc o una EST o un fragmento de PCR de *C. elegans* clonado entre dos promotores T7 como se ha descrito en los ejemplos A) y B). Pueden analizarse los fenotipos. ADN de una genoteca ordenada y combinada como en el ejemplo A) puede introducirse en el helminto con ARN polimerasa T7, mediante técnicas convencionales (inyección, bombardeo). Pueden analizarse los fenotipos. Con la combinación jerárquica, el clon original puede encontrarse fácilmente.

- Puede realizarse el mismo procedimiento con un helminto mutante que expresa la ARN polimerasa T7. Explorando para fenotipos aumentados, reducidos o nuevos.

- Puede usarse el procedimiento para permitir la exploración de compuestos. Explorar con cualquier cepa de tipo silvestre o una cepa mutante para fenotipos aumentados o nuevos.

- El ADN podría introducirse en el helminto mediante nuevos métodos. Siendo uno de ellos el suministro de ADN mediante *E. coli*. En este caso la genoteca combinada jerárquicamente se suministra al animal. Para impedir la digestión del ADN de *E. coli* en el intestino del nematodo, se usará preferentemente un *C. elegans* deficiente en ADNasa, tal como nuc-1 (e1392). Este procedimiento sería uno de los más interesantes ya que sería independiente de las eficacias de transformación de otras técnicas, y generalmente más rápido y menos laborioso.

2) Supuestas mejoras del método.

- Se diseña un vector para que contenga el ADNc de sup-35 o una parte de este ADNc, clonado entre dos promotores T7. El resto del vector es como se ha descrito en los ejemplos A) y B). Este vector puede introducirse en un *C. elegans* mutante pha-1ts. En este caso existe un sistema de selección por temperatura y únicamente aquellos helmintos que hayan captado el ADN y expresen el ARN bicatenario de sup-35 sobrevivirán a temperaturas limitadas. La genoteca combinada jerárquicamente puede suministrarse mediante cualquier método descrito anteriormente.

- El vector puede usarse para construir una genoteca que se introduce en una *E. coli* que expresa ARN polimerasa T7. En este caso se tiene una exploración análoga a la de la parte A) con una exploración adicional para helmintos en los que sea activo el ARNbc de sup-35.

- El ADN y/o ARNbc de sup-35 podría suministrarse en un plásmido diferente. Para el suministro, tanto suministro de ADN (Ejemplo C) como suministro de ARNbc, Ejemplos A) y B), esto significa que los dos plásmidos podrían estar presentes en una bacteria, o que al helminto se le suministra una mezcla de bacterias, conteniendo una de ellas la construcción de sup-35.

Ejemplo de la construcción de un *C. elegans* productor de ARN T7

Para producir ARN polimerasa T7 en el helminto, son posibles varias posibilidades. La polimerasa T7 puede expresarse bajo diversos promotores, siendo promotores inducibles, promotores constitutivos, promotores generales y promotores específicos (de célula) de tejido, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de estos promotores son el promotor de choque térmico hsp-16, el promotor intestinal ges 1, el promotor de cet858, pero también el promotor de dpy7 y el elemento promotor GATA1. En este ejemplo la ARN polimerasa T7 se expresa bajo el control del promotor hsp-16 que está disponible en el vector pPD49.78. La ARN polimerasa T7 se aísla como un producto de PCR usando los cebadores GN3 y GN4.

El producto de PCR resultante se digiere con NheI y NcoI, al igual que el vector en el que se quiere clonar, siendo el vector Fire pPD49.78. El vector resultante es pGN100 ilustrado en la Figura 2. Se incluyen oGN3: CAT GGC AGG ATG AAC ACG ATT AAC ATC GC y oGN4: ATG GCC CCA TGG TTA CGG GAA CGC GAA GTC CG de pGN100.

El vector se introduce en el helminto usando técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, microinyección.

Después se construyeron las siguientes cepas:

- Tipo silvestre (pGN100)
- nuc-1 (e1392) (pGN100)
- pha-1 (e2123) (pGN100)
- pha-1; nuc-1 (pGN100)

Todas estas cepas son capaces de producir ARN polimerasa T7 cuando se inducen por temperatura o de manera alternativa mediante metales tal como aplicación de cadmio o mercurio pesado. El procedimiento para inducción por temperatura es cambiar al animal a una temperatura de 30-33°C durante al menos una hora, después el animal puede cambiarse de nuevo a temperaturas convencionales (15-25°C).

La cepa de tipo silvestre que produce ARN polimerasa T7 puede usarse para la producción de cualquier ARN en el helminto. Más específicamente, los plásmidos de las genotecas descritas pueden introducirse en estos helmintos y pueden puntuarse los fenotipos.

El helminto mutante nuc-1 se usará para introducir el ADN a través de la bacteria de la que se alimenta el helminto. Como el helminto nuc-1 no digiere el ADN, el ADN plasmídico puede atravesar la pared intestinal. Si se capta por las células que producen la ARN polimerasa T7, se producirá ARNbc, inhibiendo de esta manera el gen a partir del que se transcribió el ARN.

Puede usarse la cepa mutante pha-1 que producía ARN polimerasa T7 para mejorar los procedimientos que se han descrito anteriormente. Puede introducirse ADN mediante bombardeo, microinyección o alimentación. Más específicamente, puede usarse esta cepa para los vectores que producen ARNbc a partir de sup-35 y a partir del gen de interés, pudiendo ser este último un producto de PCR, un ADNc o una genoteca como se ha descrito.

Para el suministro bacteriano del ADN puede usarse el mutante pha-1; nuc-1 que produce ARN polimerasa T7. Preferentemente el ADN será el plásmido que produce ARNbc tanto a partir de sup-35 como del gen de interés. Preferentemente la cepa de helminto producirá la ARN polimerasa T7 en el intestino. Preferentemente, el suministro se producirá por alimentación del helminto sobre la bacteria que aloja el plásmido.

Construcción de un *C. elegans* productor de ARN polimerasa T7

Para producir una ARN polimerasa T7 u otras ARN polimerasas en animales, y más particularmente en nematodos y más particularmente en *C. elegans*, pueden considerarse varias posibilidades. La ARN polimerasa T7 puede expresarse bajo diversos promotores. Estos promotores pueden ser promotores inducibles, promotores constitutivos, promotores generales, promotores específicos de tejido, o combinaciones de estos.

Ejemplo 1:

Construcción de un vector básico para la expresión de polimerasa T7 en *C. elegans*

A partir de λ CE6 (Novagen, Madison, Estados Unidos) se amplificó por PCR la secuencia codificante de la polimerasa T7 usando los cebadores oGN26 (ATGGAATTCTTACGCGAACGCGAAGTCCG) y oGN46 (CTCACCGGTAATGAACACGATTAACATCGC), usando procedimientos convencionales (PCR, A practical approach, 1993, Ed. J. McPherson, et al, IRL Press). El fragmento de ADN resultante que codifica la ARN polimerasa T7 se digirió con Agel y EcoRI y se insertó en el vector Fire pPD97.82 digerido con Agel y EcoRI. La construcción resultante codifica una fase de lectura abierta de la ARN polimerasa T7 en fusión con la señal de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande de SV40 con la secuencia de aminoácidos MTAPKKRKVPV. Esta secuencia señal de localización nuclear es necesaria para translocar la ARN polimerasa T7 del citoplasma al núcleo, donde es capaz de unirse a sus promotores específicos, denominados promotores de T7. Cadena arriba de la secuencia codificante de la proteína de fusión de polimerasa T7 hay un promotor mínimo (myo-2) precedido por un sitio de clonación múltiple (MCS) en el que pueden insertarse varios promotores de *C. elegans*. Este plásmido (pGN105 que se muestra en la Figura 11) es un plásmido de ARN polimerasa T7 básico que permite la expresión de la polimerasa T7 en *C. elegans*. Los derivados de este plásmido en los que se clonan promotores en el sitio de clonación múltiple permiten la expresión inducible, constitutiva, general y específica de tejido de la ARN polimerasa T7 en *C. elegans*, ya que la expresión estará regulada por el promotor clonado en el sitio de clonación múltiple.

Aunque no se limita a estos ejemplos, se sabe que los siguientes promotores inducen la expresión en los siguientes tejidos.

let-858 (expresión ubicua), myo-2 (expresión en faringe), myo-3 (músculos de la pared corporal), egl-15 (músculos vulvares), unc-119 (pan-neuronal).

Ejemplo 2:

Construcción de un vector para la expresión de ARN polimerasa T7 en el tejido muscular de *C. elegans*

La secuencia codificante de la ARN polimerasa T7 se amplificó por PCR a partir de λ CE6 usando los cebadores oGN43 (GCCACCGGTGCGAGCTCATGAACACGATTAACATCGC) y oGN44 (CACTCAGTGGGCCCTTACGCGAACGCGAAGTCCG) digeridos con Agel/Spel e insertados en el vector pGK13 digerido con Agel/Spel. (Este vector contiene el promotor fuerte SERCA que dirige la expresión en la faringe, el músculo vulvar, músculo de la cola y de la pared corporal). Se insertó una señal de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande de SV40 en frente de la secuencia codificante de la polimerasa T7 por inserción de dos oligonucleótidos solapantes oGN45

(CCGGATGACTGCTCCAAAGAAGAAGCGTAAGCT) y oGN46
(CTCACCGGTAATGAACACGATTAACATCGC) en los sitios de restricción SacI/Agel. La construcción resultante se denominó pGN108, como se muestra en la Figura 10. La introducción de este plásmido en *C. elegans* da como resultado la expresión de la ARN polimerasa T7 en la faringe, músculo vulvar, músculos de la cola y de la pared corporal.

Para ensayar la expresión y la funcionalidad de la ARN polimerasa T7 en *C. elegans* bajo la regulación del promotor SERCA, se inyectó pGN108, que codifica la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor SERCA, en *C. elegans*. Se coinyectó un vector de ensayo. Este vector de ensayo codifica GFP bajo el control de un promotor T7 (pGN401 en la Figura 13). Se construyó el plásmido pGN401 insertando dos oligonucleótidos solapantes oGN41 (CCCGGGATTAATACGACTCACTATA) y oGN42 (CCGGTATAGTGAGTCGTATTAATCCCGGGAGCT) en el vector Fire pPD97.82 abierto con SacI/Agel, generando un promotor T7. Además se coinyectó un marcador de selección para seleccionar los transformantes (rol6, pRF4). El último vector de selección pRF4 es bien conocido para el especialista en la técnica. La F1 transgénica podía aislarse fácilmente ya que muestran el fenotipo rol 6. Estos *C. elegans* transgénicos expresaban todos GFP en la faringe, el músculo vulvar, el músculo de la cola y de la pared corporal. Estos datos muestran claramente que la ARN polimerasa T7 se expresa funcionalmente bajo la regulación del promotor SERCA, y que la ARN polimerasa T7 expresada se une al promotor T7 presente en pGN401 e inicia la transcripción del gen GFP, que después se expresa funcionalmente, dando como resultado fluorescencia en los tejidos musculares donde SERCA está induciendo la expresión de la ARN polimerasa T7.

Ejemplo 3:

Construcción de un vector para la expresión ubicua de polimerasa T7 en *C. elegans*

El gen de fusión de NLS-ARN polimerasa T7 se aisló a partir de pGN108 con XmaI/Bsp1201 y se clonó en el vector Fire pPD103.05 digerido con XmaI/Bsp1201. Esto da como resultado un vector en el que la ARN polimerasa T7 se clona bajo la regulación del promotor let858. Este promotor específico permite la expresión de ARN polimerasa T7 en todos los tejidos. El plásmido resultante se denominó pGN110 (Figura 14).

Ejemplo 4:

Construcción de un vector para la expresión mediada por ARN polimerasa T7 de fragmentos de ADN, genes y ADNc bajo el control de un promotor T7

Se digirió el vector Fire pPD97.82 con SacI/Agel y se generó una secuencia de promotor T7 por inserción de dos oligonucleótidos solapantes oGN41 (CCCGGGATTAATACGACTCACTATA) y oGN42 (CCGGTATAGTGAGTCGTATTAATCCCGGGAGCT) en los sitios de endonucleasas de restricción SacI/Agel. Esta construcción (pGN400 Figura 12) contiene una fase de lectura abierta de GFP clonada entre los sitios de endonucleasas de restricción SacI y EcoRI bajo la regulación del promotor T7. En este vector puede clonarse cualquier gen, ADNc o fragmento de ADN por delección del gen de GFP como un fragmento Agel/SacI y clonando el fragmento de ADN de interés dentro del vector. Preferentemente el fragmento de ADN de interés puede obtenerse por amplificación por PCR, insertando los sitios SacI/Agel en los cebadores. El fragmento de ADN resultante después de la amplificación por PCR el digerido y el gen de GFP en pGN400 se reemplaza por el fragmento de ADN amplificado. Todos los vectores que contengan un promotor T7 pueden usarse para el propósito de la expresión inducida por ARN polimerasa T7 en *C. elegans*, tales como los vectores pGEM y los vectores pBluescript disponibles en el mercado. Esto se demuestra claramente por el vector pGN401 que expresa GFP bajo la regulación del promotor T7 en un *C. elegans* transgénico que expresa ARN polimerasa T7.

El uso de pGN400 tiene la ventaja de que el vector incluye un fragmento 3' UTR de unc-54 que potencia la transcripción o la estabilidad del ARN.

Generación de líneas permanentes de *C. elegans* con ARNi "pseudo knock-out" específico de tejido.

En la actualidad, se obtienen *C. elegans* con genes anulados (knock out) después de mutagénesis aleatoria a gran escala y selección sib (selección de individuos morfológicamente iguales y genéticamente diferentes) basada en PCR. Este método es engorroso, consume mucho tiempo y es tedioso. Se ha descrito que introduciendo ARN bicatenario en una célula da como resultado una interferencia potente y específica de la expresión de genes endógenos. En *C. elegans* la expresión génica puede regularse negativamente inyectando ARN en la cavidad corporal del helminto, impregnando el helminto en una solución que contiene ARNbc o suministrándole *E. coli* que expresa el ARNbc correspondiente al gen de interés. Las células de *C. elegans* tienen la capacidad de captar ARNbc de su medio extracelular. Se ha descrito que el ARNm es la diana de esta interferencia genética mediada por ARNbc (Montgomery y Fire 1998). También se ha sugerido que el ARN diana se degrada en el núcleo antes de que pueda ocurrir la traducción. Aunque la reducción mediada por ARNi de la expresión génica puede pasarse a las siguientes generaciones, la heredabilidad es escasa y el efecto se pierde rápidamente en descendientes posteriores. Esto es probablemente debido a una disminución continua de la combinación de ARNbc. Se propone en este documento un método para construir líneas de *C. elegans* con un fenotipo ARNi permanente heredable. El método incluye la generación de líneas de *C. elegans* transgénicas introduciendo plásmidos que contienen fragmentos de ADNc del gen diana en orientación sentido y antisentido bajo el control de un promotor de helminto o mediante la transcripción de una repetición invertida del ADNc a partir de una sola construcción. Como alternativa, puede transcribirse ARNbc de un vector que aloja un ADNc flanqueado por dos promotores T7 en una cepa de *C. elegans*

que expresa polimerasa T7. El resultado es un helminto transgénico con un fenotipo “pseudo-knock-out” estable heredable. La expresión del ADNc o de la polimerasa T7 puede ser general y constitutiva pero también podría regularse bajo un promotor específico de tejido. Al contrario que el ARNi inducido por ARN_{bc} externo (inyectado, impregnado o suministrado) este método permitiría obtener la inhibición condicional específica de tejido de la expresión de genes.

La inhibición de la expresión de unc-22 por interferencia con ARN da como resultado un fenotipo “inestable”

Se clonó ADNc de unc 22 (exón 22) en orientación sentido y antisentido en pPD103.05 (A. Fire N° L2865) que contenía el promotor let 858 que es capaz de expresar secuencias de ARN en todos los tejidos. Los plásmidos resultantes se denominaron pGN205 (Figura 19a) y pGN207 (Figura 19b). Estas construcciones se introdujeron en *C. elegans* junto con un marcador de selección (rol-6; GFP). Los individuos transgénicos de la F1 (que expresan rol-6 o GFP) mostraron un fenotipo “inestable” indicando que el ARNi podría estar mediado por la transcripción endógena de ARN a partir de ADN transgénico. El fenotipo ARNi cosegregaba con el marcador de selección en descendientes posteriores. Esto dio como resultado la generación de líneas de *C. elegans* con fenotipo ARNi permanente.

Generación de líneas estables con líneas de ARN polimerasa T7 y generación de helmintos dobles transgénicos

Un sistema de expresión en *C. elegans* basado en una ARN polimerasa exógena demanda dos plásmidos. Uno está codificado por la ARN polimerasa bajo el control de un promotor específico, mientras que el otro plásmido codifica el fragmento de ADN a expresar, bajo la regulación del promotor T7. En el caso de ARNi semiestable, también denominados knock out pseudoestables, el ADN de interés se clona entre dos promotores T7 para que pueda producirse ARN_{bc}.

Como se sabe que el sistema de expresión de ARN polimerasa T7 es un sistema de alta expresión esto dará como resultado problemas para generar animales doblemente transgénicos. Si el gen a expresar en el nematodo *C. elegans* es tóxico, esto dará como resultado efectos letales y, por lo tanto, la construcción de un *C. elegans* sin expresión estable altamente regulada del gen de interés. Si el gen de interés es esencial para la supervivencia del organismo, el ARNi con un fragmento de ADN de este gen también dará como resultado efectos letales, de manera que no son posibles knock out pseudoestables.

Para solucionar este problema los presentes inventores han diseñado un sistema que consiste en dos animales transgénicos. El primer animal es transgénico para la ARN polimerasa T7. Esta ARN polimerasa T7 puede expresarse en todas las células o en células o tejidos específicos como se ha demostrado en ejemplos anteriores. El segundo animal transgénico es transgénico para el fragmento de ADN de interés. Este puede ser un gen o ADNc unido a un promotor T7, o si se quiere realizar ARNi, un fragmento de ADN de dicho gen clonado entre dos promotores T7.

Ambos animales transgénicos son viables y no muestran fenotipo anormal. Esto es porque la ARN polimerasa T7 expresada en el primer organismo transgénico no es tóxica para el organismo, incluso si se expresa a niveles relativamente altos. En el segundo organismo transgénico, el gen de interés no se expresa o el ARN_{bc} no se produce ya que estos animales transgénicos no contienen la ARN polimerasa T7.

La expresión del gen o ADNc de interés o ARNi con un fragmento de ADN puede obtenerse ahora por apareamiento de los dos animales transgénicos. La descendencia de estos es doblemente transgénica y expresan el gen de interés o expresan ARN_{bc} o el fragmento de ADN de interés. Para generar suficientes machos en dicho apareamiento, uno de los animales transgénicos machos puede ser un mutante de *C. elegans* con un fenotipo que favorezca la generación de machos. Un Ejemplo de dicho mutante es him-5. Preferentemente, dicho mutante se usará para generar un *C. elegans* transgénico para ARN polimerasa T7, mientras que el hermafrodita contiene el fragmento de ADN bajo la regulación del promotor T7.

Para seleccionar de manera eficaz la descendencia doble transgénica puede introducirse un segundo transgén en el segundo animal transgénico. Este transgén contiene un gen indicador bajo la regulación del promotor T7. El gen indicador puede ser GFP, luciferasa, beta-galactosidasa o beta-lactamasa, siendo un ejemplo de dicho transgén los vectores pGN400 y pGN401.

Para obtener la expresión inducible específica de tejido de un transgén en *C. elegans* se puede generar una reserva de machos (es decir, him-5) que lleven la construcción de polimerasa T7 bajo el control de diferentes promotores de *C. elegans* que permiten la expresión específica de tejido como tal. Estos machos pueden cruzarse con hermafroditas que lleven el gen de interés bajo el control del promotor T7.

Además, los transgenes pueden integrarse en el genoma del animal. Se han descrito métodos para generar la integración estable de un plásmido en el genoma del animal (Methods in cell biology, Vol. 48, 1995, ed. por Epstein y Shakes, Academic Press) e implica la radiación del animal.

Esto puede hacerse para ambos animales, pero preferentemente, los animales que expresan la ARN polimerasa T7 se someten a dicho tratamiento. Esto da como resultado una colección de nematodos *C. elegans* que expresan de forma estable la ARN polimerasa T7 bajo el control de diversos promotores, siendo ejemplos de dichos promotores el myo-2 (expresión en faringe), myo-3 (músculos de la pared corporal), egl-15 (músculos vulvares), unc-119 (pan-neuronal), SERCA (músculos), let858 (todas las células), ges-1 (intestino).

Construcción de vectores de doble híbrido en levadura del promotor T7 de ARNi

pGAD424 con T7/T3 y/ o Sp6 directo e indirecto

En la mayoría de los experimentos de doble híbrido se clona una genoteca de ADNc en el plásmido pGAD424 (Figura 16) que se ha modificado por ingeniería genética con sitios de restricción adicionales en el polienlazador tal como un sitio NcoI (Clontech). Esta genoteca permite la exploración de proteínas de unión en un experimento de doble híbrido en levadura. Se construyó un nuevo vector de doble híbrido en levadura con las mismas posibilidades para realizar doble híbrido en levadura, pero que contienen dos promotores T7 adicionales, de manera que el vector puede usarse para knock out pseudo estables inducidos por ARN polimerasa T7. Para esto se insertó un T7 directo usando un enlazador de T7 (que consiste en los siguientes cebadores aattcttaacgactcactataggcc y catgggccctatagtgagtattaag) en el sitio EcoRI-NcoI de pGAD424. El vector resultante se denominó pGAD424-without-FULL-ICE-both-T7. Se tuvo cuidado de eliminar los codones de terminación y usar aminoácidos de máxima compatibilidad con el polienlazador. Se adoptó la misma estrategia para el T7 inverso (que consistía en ambos cebadores gatccgtcgacagatctccctatagtgagtcgtattactgca y gtaatagcactcactatagggagatctgtcgacg) con BamH1 y Pst1. Para evitar la pérdida de Sall, se incluyó este sitio en el cebador.

El sitio Sall es importante ya que la mayoría de las genotecas se clonan en este sitio, se dispone de adaptadores. Esto hace al vector recién construido compatible con vectores existentes.

pAS2 con T7/T3 y/ o Sp6 directo e inverso

Se construyó un vector de doble híbrido en levadura análogo basado en pAS2 (Clontech). Mediante digestión parcial con EcoRV se fue capaz de eliminar una parte significativa del gen cyh2. La construcción correcta puede aislarse y revisarse mediante una digestión de restricción con BglII. Este sitio de restricción está presente en el fragmento EcoRV de PAS2 a eliminar. Esto elimina el gen cyh2 que es un gen ligeramente tóxico y que está implicado en el retraso del crecimiento. Este gen no es esencial para la realización del ARNi y los experimentos de doble híbrido en levadura. Después de la eliminación del fragmento EcoRV, el sitio de restricción EcoRI que se localiza entre la secuencia de ADN que codifica GAL4BD y HA (epítipo) se vuelve única para el plásmido, y puede usarse para sustituir HA con un enlazador que contiene el promotor T7. Esto asegura la persistencia de todos los sitios de restricción, permitiendo tanto la clonación en fase de lectura como la compatibilidad con vectores previos y pGAD424. Se usaron los siguientes enlazadores (cebadores: aattcttaacgactcactataggcca y tatgccctatagtgagtcgtattaag) usando sitios de clonación EcoRI y Nde1. Se adoptó la misma estrategia para el T7 inverso (cebadores: gatccgtcgacagatctccctatagtgagtcgtattactgcacatgggccctatagtgagtcgtattaag y gtaatagcactcactatagggagatctgtcgacg) con BamH1 y Pst1. Para evitar la pérdida de SalI se incluyó en el cebador. El vector resultante se denominó pAS1-cyh2-HA+both T7-final.

Tener el promotor T7 (o de manera alternativa el promotor T3 o SP6) en pGAD424 permite ir rápidamente de la proteína que interacciona al ARNi y asignar una función al fragmento de ADN aislado. Una ventaja adicional es la capacidad de generar mediante transcripción in vitro acoplada a traducción in vitro (hay un ATG en fase de lectura con GAL4DB o GAL4AD) una proteína marcada que puede usarse para controles in vitro (por ejemplo ensayos de inmunoprecipitación) de la interacción proteína-proteína real.

Las secuencias de los plásmidos producidos y la polimerasa SP6 y T3 se identifican en la Lista de Secuencias proporcionada a continuación:

ARN polimerasa dependiente de ADN de SP6: SECUENCIA ID N°: 1
número de acceso swissprot P06221
secuencia de proteína:

```

1  mqdlhaiqlq leeemfnggi rrfeadqqrq iaagsesdta wnrrllseli apmaegiqay
61 keeyegkkgr apralaflqc venevaayit mkvmdmlnt datlqaiams vaeriedqvr
121 fskleghaak yfekvkkslk asrtksyrha hnvavvaeaks vaekdadfdr weawpketql
181 qigttlleil egsvfynggep vfmramrtiy gktiyyqlts esvgqwisaf kehvaqlspa
241 yapcvipprp wrtpfnggfh tekvasrirl vkgnrehvrk ltqkqmpkvy kainalqntq
301 wqinkdvlav ieevirldlg ygvpsfkpli dkenkpanpv pvefqhlrg elkemlspeq
361 wqqfinwkge carlytaetk rgksaavvr mvqqarkysa fesiyfvyam dsrsrvyvs
421 stlspqsndl gkallrftg rpvngvealk wfcinganlw gwdkktfdvr vsnvideefq
481 dmcrdiaadp ltftqwakad apyeflawcf eyaqyldlvd egradevrth lpvhqdgscs
541 giqhysamlr devgakavnl kpsdapqdiy gavaqvikk nalymdadda ttftsgsvtl
601 sgtelramas awdsigitr ltkkpvmtdp ygstrltcre svidyivdle ekeaqkavae
661 grtankvhpf eddrqdytgp gaaynymtal iwpsisevvk apivamkmir qlarfaakrn
721 eglmytlptg fileqkimat emlrvtclm gdikmslqve tdivdeaamm gaaapnfvhg
781 hdashliltv celvdkgvts iavihdsfgt hadntltlr alkgqmvamy idgnalqkll
841 eehevrwmvd tgievpeqge fdlneimdse yvfa

```

ARN polimerasa dependiente de ADN de T3: SECUENCIA ID N°: 2
número de acceso swissprot P07659
secuencia de proteína:

1 mniieniekn dfseielaai pfntladhyg salakeqlal ehesyelger rflkmlerqa
 61 kageiadnaa akp1latllp kltrrivewl eeyaskkgrk psayaplql1 kpeasafitl
 121 kvilasltst nm1tiqaaa1 mlgkaiedea rfgrirdlea khfkkhveeq lnkrhgqvyk
 181 kafmqvvead migrgllgge awsswdkett mhvgirliem liestglvel qrhagnags
 241 dhealqlaqe yvdvlakrag alagispmfq pcvvppkpww aitgggywan grrplalvrt
 301 hskkg1mrye dvympevyka vnlaqntawk inkkvlavvn eivnwkn1pv adipslerqe
 361 lppkpddidt neaalkewkk aaagiyrldk arvsrrisle fmleqankfa skkaiwfpyn
 421 mdwrgrvyav pmfnppgndm tkgl1tlakg kpigeegfyw lkih1gancag vdkvpfperi
 481 afiekhvddi lacakdpinn twwaeqdspf cflafcfeya gvthhg1syn cslplafdgs
 541 csgiqhfsam lrdevggrav nllpsetvqd iygivaqkvn eilkqdaing tpnemitvtd
 601 kdtgeisekl klgtstlaqq wlaygvtrsv tkrsvmtlay gskefgfrqq vlddtiqpai
 661 dsgkg1mftq pnqaagymak liwdavsvtv vaaveamnw1 ksaakllaee vkdkktkeil
 721 rhrcavhwt1 pdgfpvwqey rkplqkrldm iflgqf1rlqp tintlkds1 dahkqesgia
 781 pnfvh1sqdgs hlrm1tvvyah ekygiesfal ihdsfg1tipa dagklfkavr etmvityenn
 841 dvladfysqf adqlhetqld kmpp1pkkg1n ln1qdilksd fafa

pGN108

SECUENCIA ID N°: 3

[illegible]

ttctcttttgactctctcttctccgccaanaagcctagcatittttatgataatttgattacacacactcagagttcttcgacatgataaaggtttcatigggcac
tcgccctaacagtcacatgacaaggcggtgattattatcgatcgatattgaagacaacatccaaatgtgtgtctcatttggagccccgtgtggggcagctg
ctctcaatatattactaggggagacgaggagggggacattatcgacgtcgcatgagccattcttctctttatgcactctcttctcactctctcacacattaat
cgattcatagactcccatcttcttgatgaagggtgtgtgggttttttagcttttttcccgattgttaaagggaagggtgtgacgtgttaaggaaaaagagaacg
gagccgaaaaaacatccgtagttaagcttctcttttaagccgacacatttttagacagcatttcgccgtagttttgaagttaaatttaaaaaataaaaatag
tttcaatttttttaattactaataatggcnaaagtttttcaagaacctctagaaaaactgcttaattcatgggtactagaanaattctgttttaatttaatattta
tcttaagatgtaattcagagaagctttttgaaaaatttcaattaaagaatttggcgaattagaataaaagcttcagaaaatgagtaaaagctcaaaataga
agttgttttttaaaggaaaaacgaaaaagaacataattatcttttctccccgcgtaaaaatagtgtgtgtaataatgtgacccgtctgtctatttgcact
cggtctttcacaccgtgtcttctctacttgcacccaaggaaaaaaaacatcacgtctgagacggttgtaagtcctttacaaagagcgtctcttcttca
ccccgtacaaaaaaaattgtgttctttactttatcttttagttagtgcacaaaaaaaagtgtagtcagttttgttggtctgtctccacaccctctccgc
ctccagcagcacacaatcatcttctgtgtgtctgcagcattcttgtatgctcgcggtctgtgaattgcaccactctgacgcgcgaactcacaccaccactc
acttctgggtgtattactacacgtcactgtgtgtctgtatctccccgtcttctgtcccaactcactctctcattatccccctgtgtgtattgttttttaaatgtga
caccactctgcagcttttctaccttctgttttctgtccatttagaatttatcttggaaatttttttaaaatttttagccagagagttctagtcttctgtctaaaaagctca
ggctgacacatacttttctatttctatcaaaaaaaaagtgtgataaagaaaactgtgttatcagaaaagagtgctgtctgttgaattgattcaaaaaaaat
cccacccctctgttcttctcaaaaatagatataacggatttttcttctgtattcaatttttctgtcgtctgtctgtccaaagtgtgtgtgtccgagcaaa
agatgagagaatttcaaacagaaatgaaaaaaagtgtggccaataatgaagttttatccgagattgatgggaagatataatgttctttacggttggga
ggggagagagagatagatttgcatacaactcgcgccttttatagtcttttagaactcaaaaatagatttttctatcatttttaataagaaaatcgagaaaat
cagtaatttcgaattttctgccaaaaatacacgaaaattgtgggtctcggccacgatctcgggtctagtgttcattttggtttaaaagtgttaaaaaattcaaa
ttctagtgttaatttcgcaataattggacctaaaaatgggttttgcatacttttcaacaagaaatcgtgaaaatcctgtgttttcgcaattttctttcaaaaata
cacgaaataatgttaatttccgaaatatgtagggtctcggccagatttcagtcacagtgggccaggatttatcacgaaaaaagttcgcctagtctcacat
ttccggaaaaacgaatcaaaatagtttttgtcatatttgaacaaaaaatcagacataaccttatatttgcgaattttctgtcgttttctctcaaaaatga
cagctctagaattaaataacgtctgagactgtggaccatgatacttttctccccgttttcatattttttatttattacactgtgattgactaaaggctaccaccaccg
ccagttgtgtccatattcacacacacacacacacgaatctgagattttatgtgtttatccctgtttgtatttctgtctctctctctctctctctctctctct
agccgagaagctccagagaatggagcacacaggaatccggcgcgcgatgtctgtcgggagatggcgccgcctgggaagccgcggagagatata
gggaagatcgtctgatttctctcggatgccacctcatctctcagtttctcgcctgttactccttccggaacctgtatattcc

pGN105:

SECUENCIA ID N°: 4

aagcttgcacgtcgcaggccttggctgactctagacactttttagctacatgataatccccgcctcccaatccaccaccaggga
 gaagggtcctccgcaaaatcaaaagttaattccaggctcgcgcacccaccgagcgggtgacttctctccaccacttttcaatccctggggtacg
 ggattggccaaaggaccacaaggatgtttcgaatgataacataacataagacattttcaggaggacccttgccttggagggtaccgagctcagaa
 aaaaatgactcctccaaagaaagcgttaaggtaaccggttaagtaaacacgattaacatcgttaagacgacttctctgacatcgaactggctgctatccc
 gttaacacacttggctgaccattacggtgagcgtttagctcgcgaacagttggcccttggagcatgactttacgagatgggtgaagcacgctccgcaa
 gatgttggagcgtcaacttaaaagctgggtgaggttgcggaataacgtccgccaagcctctcaactaccctactccctaaagatgattgcacgcatcaa
 cgactgttggaggaagtgaagcgaagcggcgaagcggcagcagccttcaggttctcgaagaaatcaagcgggaagccgtagcgtacatca
 ccataaagaccactctggtgcttgcctaaccagtgctgacaatacaaccgttcaggctgttagcaagcgaatcggctgggccaatgaggacgaggctcgt
 ctctggctgatacgtgacttgaagcgaagcacttcaagaaaaacgttggaggaacaactcaacagcgcgtaggggcacgtctacaagaagcaitfa
 tgcgaagtgtcgaaggctgacatgctcttaagggtctactcgggtggcgaaggcgtgtcttctgtggcataaggaagactctattcatgtagggtacgct
 gcatcgtagatgctcattgagtaacccggaatggttagcttacaccgcaaaatctggcgttaggttagcaagactctgagactatcgaactcgcacct
 gaatacgttgggtatcgaacccgtgaggtgctggtgctggtgcatctctcagatgttccaaacttgcgttagttcctcctaagccgtggacttgcatt
 actgttgggtgcttatgtgggtaacggctgctgctctctggtgctggtgctgactacagtaagaagcactgagtcgctacgaagacgtttacatgcct
 gagggtgtacaagcgaattaacatgctgcaaaacccgcatggaatacaacaagaaagtccttagcgtgctccaagtaatacaccgaagtggaagcat
 tgtccggtcgaaggacacccctgcatgagcgtgaagaactcccgatgaacccggaagacatcgaatgaatcctgaggctctcaccgctgggaaa
 cgtgctgctggctgctgttaccgaaggacagggtctcgaagctcgcgtatcagccttgagttcatgtctgagcaagccaataagttgttaacat
 aaggccatctggttcccttacaacatggactggcgcggtcgtgttaccgctgtcaatgttcaacccgcaaggttaacgatatgaccaaggactgctt
 acgctggcgaaggttaacacatcggtaagggaagggttacttggctgaaatccacgggtgcaactgtgctgggtgtcgaatagggttccctctg
 agcgcacatcaagttcattgaggaaaaccacgagaacatcatggtcgtgctaagtctccatggagaacacttgggtggtgagcaagatctccgttct
 gcttctgtgcttctgttggatgacgttgggtacagcaccagcctgagctataactgctccttccgctggcgttggacgggtctgtcctggcatc
 cagcacttctccggtatgctcctcagatgaggttaggtgtgtcgcggttaactgttctcctagtgagaccgttcagagacatctacgggattgtgtataag
 aaagtcacagagattctacaagcagcgaatcaatgggaccgataaagcaagtagttaccgtgaccgatgagaacactgtgtaaatcttctgagaaa
 gtcgaagctgggcactaaggcactggctgtcaatggcgtgctcaggtgttactcgcagtgtagtaagcgttcagtcagcgttgcgttaccgggtc
 caaagagttggcttccgtcaacaggtgctggaagataccattcagccagctattgattccggcgaagggtccgatgttcaactcagccgaatcagcgtg
 ctggtatcatgtgctaagctgattggaatctgtgagcgtgacggtgtgtagctgctggttgaagcaatgaactgcttaagctgtgtgtaagctgtggtg
 ctgctgaggtcaagataaagactgagagagattctcgaagcgttgcgtgtgctgattggtaactcctgtatgttccctgtgtggcagggaataca
 agaagcctattcagacgcttgaacctgatttctcgtgctagcttccgttaccgcttaccattaaacccaacaaagatacgagattgacacaca
 aacaggagctgtgtatcgtctcctaacttctacacagccaagacggtgagcacttctgaagactgtatgtgtggcacacgagaagatcggaaatcga
 atcttctgactgttctacgactccttccgttaccattccgctgacgctcgaacctgttcaaaagcagtgctggaactatgtgtacacatagtgagttt
 gtagtacttggctgtatttctacgaccagttcgtgaccagttgcacgagctcaatggacaaaatgccagcacttccggctaaaggtaacttgaacct
 ccgtgacatcttagagtcggacttccgtgctgctgaagaaatccacagcggcgtgcttaccattacaaacttctgtgtgttcaaaaataatagggtg
 gccgctgtcatcagagtaagttaactgagttctactaactaacgagtaataatattttcagcactcgcgcccgtgcttgcacttcaagttcaact
 acttcaacatcccatcatgctcttctcctgtgctccacccttattttgttattcaaaaaacttctttaaatttcttgggtttttatgcttcttaagica
 cctctaaacaaatgaattgtgtagattcaaaaatagaatttctgtaataaaagtcgaaaaaaattgtctccctcccccaattaaataattctatccca
 aaatctacacaattgtctgtgtaacttcttatttttttacttctgataaaattttttgaaacatcatagaaaaaacccgacacaaaatacttctatcatgtt
 acgttctagttatgacgcgaattttttttctgcacgtctggcctctcatgacgtcaaatcatgctcatcgtgaaaaagttttggagiatttttgaaatttt
 caatcaagtgaagttatgaattttttcttctgttcttgggttcccttattgttgaagagtttcgaagacggcgtttttctgtcaaaatca
 caagtattgtgagcagcagtgcaagaaagatcgggaaggttgggttggaggtcagtggaaggtgagtagaagttgataatttgaagtgagga
 gtgtctatgggttttgccttaaatgacagaatatacccaataacataactgttctctactagtcggccgtacgggccccttctgtctcgcgcg
 ttccgtgtgagcgggtgaaaacctctgacacatgcagctccggagacgggtcacagcttctgttaagcggatcggggagcagacaagcccgtca
 gggtcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggttcaactatgctggtcagcagagattgactgagagtgacatagcgggtgtgtgaata
 ccgcacagatgctgaaggagaaaaatccgcacagcggcgttaagggtcctgtgatacgcctattttataggttaattgtcatgataaataatggtttctt
 agacgtcaggtggcacttttggggaattgtgcgcgggaacccctattgttatttttcaataacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccc
 gataaattgttcaataatattgaaaagggaagatgaggtattcaacattccgtgtcgtcccttattcccttttttggcgaattttgcttcttctgttctca
 ccagaaaacgtgtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcagagttgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccctgag
 agttttgccccgaagaacgttttccaatgagcacttttaagttctgtatgttggcgggtattatccgtattgacccgggcaaggaacactg
 gtcggcgcatacactattctagaatgacttgggtgagttactcaccagtcacagaagaacatcttaccgagtgacatgacagtaagaagaattatgagtg
 ctgccataacatgagtgataacactgcgccaaacttacttctgacaacgafcggaagaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggat
 catgttaactcgcctgtatcgttgggaacggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgagtcctgtagcaatggcaacaacg
 ttgcgcaaatatttactggcgaacttacttctagcttcccgcaacaataatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgctgct
 cggcccttccgctgctgtgtttatngctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccc
 tccgtatcgtagttatctacacgagcgggagtcaggaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgalttaagcattg
 gtaactgtcagaccaagtttactatatacttttagattgatttaaaacttcaatttaataaaaggatcaggtgaagatcctttttgataatctcatgacca
 aaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaaggatcttcttggagatccttcttcttctgctgctgctt
 gcaacaaaacacccagctaccagcgggtgttgggttgggtgagtcaggaactccttcttccgaaggtaactggtcctcagcagagcgcagaga
 taccataactgtcttctagctgtagcgttagtgccaccacttcaagaactctgtgacccgctacatcctcgtctgtcttaactctgttaaccagt
 gctgtgcccagtggtgataagctgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccgataaggcgcagcgggtggtgctgaacgggggttgcg

tgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcgccacgcttccgaaggagaa
 aggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtc
 gggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtc
 ctggccttttgcctgttctcacatgttcttctgcttaccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgcgtgataccgctcgcg
 cagccgaacgaccgagcgcagcgcagtcagtgagcgaaggagcgaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattca
 ttaatgcagctggcacgacaggttccgactggaaagcggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacagcctt
 tacactttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacccaagcgttaagitt
 aaacatgatcttactaactaactatttcatttaaatttcagagcttaaaaatggctgaaatcactcacaacgatggatacgctaacaacttgaaatgaa
 at

pGN400:

SECUENCIA ID N°: 5

aagcttgcatgcctgcagcgcttgctgactctagacacttttcagctacatgatacatgatatcccgctcccaatccaccaccagggaaaa
gaagggtcgcgcaaaatcaagttatctccaggtcgcgcacccaccgagcgggtgacttctccaccacttttcaatccctcgggtacg
ggattggccaaaggaccacaaagggtatgttcgaatgatactaacatacatagaaacatttcaggaggacccttgcttgagggtaccgagctcccg
gattaatcagactcactataccggtagaaaaatgagtaaggagaagaactttcactggagttgtcccaattctgtgaattagatgggatgtaatg
ggcacaatattctgctagtgagagggtgaagggtatgcaacatacggaaaacttacccttaaaattatttgcactactggaactacgttccatgg
gtaagttaaacatataatactaaacccgtatattaaatttcagccaacactgtcactacttctgttatgggtgttcaatgcttctcgagataccag
atcatatgaacggcatgacttttcaagagtgccatgcccgaagggtatgtacaggaaagaactatatttcaagatgacgggaactacaagacac
gtaagttaaacagttcgggtactaactaaccatacatatttaaatttcagggtgctgaagcaagttgaagggtgacccctgttaatagaatcaggttaaa
aggtattgatttaagaagatggaaacattctggacacaaattggaatacaactaatactacacaaatgtatcatcatgagcagacaaacaaagaat
ggaaatcaagttgtaagtttaaacatgatttactaactaactaattctgatttaaaatttcagaacttcaaaattagacacaaatggaagtggaagcgtca
actagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtcctttaccagacaacattacctgtccacacaaatcgtcccttcgaagatc
ccaacgaaaagagagaccacatggtccttctgagttgttaacagctgctgggtacacatggtcatggaatacaaatagcaticgtagaattc
caactgagcgcgggtcgtaccattaccaactgtctggtgtcaaaaataataggggcgtgtctacagagtaagtttaaacatgagttctactaactaa
cgagtaaatatttaaattttcagcatctcgcgcggcgtcctctgacttcaagtcacattcttcaacatccctacatgctcttctccctgtgctccaccc
cctattttgttattatcaaaaaaaccttcttcaattctgttttttagcttcttttaagtcacacttcaacaaatgaaattgtgtagatcaaaaaatagaattatctg
taataaaaagtcgaaaaaaattgtgctcctcccccattataataattctatcccaaaatctacacaaatgttctgtgtacacttctattgttttttactctg
ataaaattttttgaaacatcatagaaaaaccgcacacaaaatccttatacatgttactgttctgagttatgaccgcaatttttcttctgcagctctgggc
ctctcatgacgcaaaatcagctatcgtgaaaaagtttggagtatttttgaatttttcaaaatgaagttatgaaattatcttctgcttctgttctgt
ggggttccctattgttctgaaggttctgaggaacggcgttttctgtcaaaatcaaatgattatgacacgatgcaagaaagatcggaagaagg
tttgggttggaggtcagtggaaggtgagtagaagttgataattgaaagtgagtagtctatgggttttgccttaaatgacagaataatctccaat
ataccaaacataactgttcttactagtgccgtacgggccccttctgctcgcgcttctgggtgatgacgggtgaaaaccttgcacatgagcgtcccg
gagacggtcacagcttctgtgaagcggatgcccgggagcagacaagcccgacgggcgtgacgggtgtggcgggtgtcgggctgctgcttga
actatgcggtacagagcagattgtactgagagtgaccatagtcgggtgaaatccgcacagatgctgaaggagaaaaatccgcacagggc
cttaaggccctgtgatacgcctattttatagggttaagtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcactttcgggaaatgtgctggaacc
cctattttgtttttttaaatacattcaaaatgtatccgtcatgagacaataaccctgataaatgttcaataatattgaaaaaggagatgagatt
caacatttccgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgcttctgttttgcacccagaaacgctggtgaagtaaaagatgctgaagatcagtt
cagggtcagcagtggtgttacatcgaactgcatcacaagcggtaagatccttgagaggttttgcggccgaagaagcttttcaatgagcacttttaa
gttctgtatgttggcgggtattatccgtatgtacggcgaagagcaactggtcggcgcatacactatctcagaatgactgtgttgggtgacttac
cagtcacagaaaaacatcttaccggtgcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacatgagtgataacactgcggccaaacttacttctga
caacgatcggagggaccgaaggagcgaacgcctttttgcacacatgggggacatgtaactgccttgatgttgggaaccggagctgaatgaagc
cataccaaacgacgagcgtgacacacgatgctgttagcaatggcaacaacgttgcgaactatgaactggcgaactacttacttactgttccggc
aacaattatagactggtgagggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctgctgttattgtgataaatctggagccg
gtgagcgttgggtctcgggtatcatgacgactggggccagatggtgaagccctccgtatctgtatctacacgacggggagtcaggcaactat
ggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcttactgattaaagcattgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaa
acttcattttaatttaaaaggatcgtggaagatccttttgataatctatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccg
tagaaaaatcaaaaggatcttctgtgagatccttttttgcgcgttaactgtcgttgcacaaaaaaacacccgctaccagcgggtgtgttggccgg
atcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggttcagcagagcgcagatacacaatactgtcttcttctgttagcgttagtgccaccactt
caagaactctgtagcaccgcctacatactcgtctgtctaatctgttaccagtgtgctgtcagtgccgataagctgttcttaccgggttggactca
agacgatagttaccggtatagggcgcagcggctgggctgaacgggggttctgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacacggaactga
gatactacagcgtgagcattgagaaagcggcagcgttcccgaaaggagaaagcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaaacagagag
agcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggtatcttatagtctgtcgggttccacccttgcacttgagcgtcgtattttgtgatgctcgtc
aggggggagcggcctatggaaaaacggcagcaacggcgtttttacgggttctgtgcttggccttttgccttctcatatgttcttctgcttacc
ctgattctgttgataaccgtataccgctttgagtgagctgataccgctcggcagcggaaacgacggcagcagtgatgagcaggaag
cggaaagcggcccaatagcgaacccgtctcccgcgctgtggcggatcattatgaatgcagctggcagcagaggttcccgactggaaagcgggc
agtgtgagcgaacgcaatgaatgtgagtgctcactcattaggcaccacaggtttacactttatgcttccggctgtatgtgtgtggaattgtgagcgg
ataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgccaagctgtgaagttaaacatgatttactaactaactatcttcaatattttcagagctt
aaaaatggcgtgaatcactacacacgatggatagcgttaaacacttggaaatgaat

pGN401:

SECUENCIA ID N°: 6

[illegible]

pGN110:

SECUENCIA ID N°: 7

[illegible]

[illegible]

cagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcggccacgctcccgaaggagaaaggcggacagg
tatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagctccaggggggaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttcgccac
ctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggcccagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttcctggcctttgt
ggcctttgtcacatgtctttcctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacga
ccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgccaatacgcacaaccgcctctcccgcgcgttggccgattcattaatgcagctg
gcacgacagggttcccactggaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttacctcactcaltaggcaccgccaggcttacactttatgt
tccggctcctatgttgtgtggaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaaacagctatgacatgattacccaagctcggaattaacctcactaa
agggacaacaaagctgggggg

pAS2-cyh2-HA+bothT7-final

SECUENCIA ID N°: 8

gatacgcgcagacatccctatagtagctgattactgcagccaagctaattccggcggaatttcattatgattttattattataaagttataaaaaa
ataagtgatatacaattttaagtgactcttaggttttaaacgaaaattcttcttgtagtaacicttctctgtaggtcaggttgctttctcaggtatagcatgaggt
cgctctattgaccacacctctaccgcatgcaagcttggcgtaatcatggctatagctgttctctgtgaaattgtatccgctcacaattccacacacatac
gagccgggaagcataaagtgtaaaagcctgggtgcttaagttaggttaactacataaattgctgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgt
cgtgcccagctggattaatgaatggccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattggcgctcttccgttccctcgtcactgactgctgctgctgctg
ttcggctgcgcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggtataacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcc
agcaaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgctgtgctgctgttttccataggtcctgccccctgacgagcatcacaaaaicgacgctcaagtcagag
gtggcgaaaaccgacaggactataaagataccaggcggttccccctgggaagcctcctgctgctccttcttccgacctgcccgttaccggatacctgtc
cgcttcttcccttgggaagcgtggcgcttctctatagctcactgctgtagtctcagctggtgtaggtctgctcctcagctgggtgtgtgacgaac
cccccttcagccccagcgtgctgcttaccggttaactatcgtctgagtcaccccggttaagacacgactatcggcactgagcagccactgtgtaaca
ggattagcagagcgaggtagtagggcggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagattttgtgtctgctgctgct
gaagccagcttacccttggaaaaagagttgtgtagcttctgtagcggcgaacacacacacgctggtgtagcggtgtttttgttgcgaagcagcagattacgctg
agaaaaaagggaicctcaagaagatccttgaatcttcttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaaacacgtaagggaattttgtgcatgagattacaaa
aaggatctcacttagatctttaaattaaaaaagagtttaaatcaatcaaaagtataatagtaaacctgtgtctgacgttaccatgtcttaacagtgagggc
acctatctcagcagatctgtctatttctgtatccataggtgctgactccccgctggtgataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctg
aatgataccgcgagaccacgctcaccggtccagatttatcagcaataaacacagccagccggaaggcgagcgagcagaagtggtctgcaactttatcc
gctcctacccagcttattattgttgcgggaagcgtagtagtgcgaggaatagtttgcgcaacgtgttgcattgtacagggcatgctgtgtgtca
cgctcgtctgttggtaggttcaatcagctccggttcccaacgatcaagcgaggtacatgacccccatgtgtgcaaaaaagggttagctcttctgctcct
ccgactgctgtcagaagaaggtggcgaggttatacactatggttagggcagcactgataattctctactgtcattccatccgtaagatgctttctgtgac
tggtgtagtactcaacaaagtcatctgagaatagtgtagcgcgacggaggtgcttctccggcgctcaataggggataatccgcccacatagcagaac
tttaaaagtgtcctacattggaaaacgcttctggggcgaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcgtatgaacccactgctgaccccaactg
atcttcagcatcttttactttaccagcgttcttgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcccgaaaaaagggaataaggcgacacggaatgttgat
actcactactcttcttcttcaattattggaagcattatcagggttattgtctcatgagcggtatcatatttgaaatgatttagaaaaataaacaataagggttcgc
gcacattccccgaaaagtccacctgaacgaagcatctgtcttctttagaacaataatgcaacgcgagagcgcttaattttcaaacaaagaatctga
gctgcattttacagaacagaatgcaacgcgaaagcgtattttaccaacgaagaatctgtcttctttagtaaaaaaatgcaacgcgagagcgctaa
ttttcaaacaaagaatctgagctgctattttacagaacagaatgcaacgcgagagcgctattttaccaacaaagaatctatacttctttttgtctcaaaaaatg
catcccgagagcgctatttttcaacaaagcatcttagattacttttttcttcttgcgctctataatgagctctctgataaacttttgcactgttaggtcgttaag
gttagaagaggtctactttgtgtcttatttctcttcaataaaaaagcctgactccacttccgcttactgattactagcgaagcgtcgggtgctattttcaag
ataaaggcatccccgattatattctatcagcatgttggaatgcgcatcttgtgaacagaagtgatagcgttgatgattcttctgtcagaaaattatgaacg
gttcttctatttgtctctatatactacgtataggaatgtttacatttctgtatgtttctgattacictatgaatagcttactacaatttttgcataaagtagtaatac
tagagataaacataaaaaatgttagaggtcgaggttagatgcaaggtcaaggagcgaaagggtggaatgggttaggttataggggatatagcacagagatatata
gcaaaagagatacttttagcaaatgtttgtggaagcgtatctgcaatatttttagtgcgtttagcagtcctggtgctgtttgtgttttgaagtgctgtctcagagc
gctttgtgtttcaaaagcgctctgaagttctatactttctagagaataggaaatccggaataggaaactcaaaagcgtttccgaaaacgagcgcttccgaaat
gcaacgcgagctgcgcacatacagctcactgttcacgtcgcacattatctgctgtgttctgtatataatatacatagagaagaacggcatagctgctgtttat
gcttaaatgcgtacttattatgctctattatgtaggtgaaaggtagtctgattaccctgtgataatccattccatgcccgggtatctgtatcttctcagca
ctacccttagctgtctatatactgctccactctcaattggattgctcattctcaatgctatcttcttctgatttgatcatataaagaaccattatcatgta
cattaaactataaaaaataggcgtatcacagagcccttctgctcgcgcttctgggtatgacgggtgaaaaacctctgacacatgagctcctggagacggctca
cagctgtctgttaagcggtatccgggagcagacaagccctcagggcgctgtagcgggtgttggcggtgtcggggtgctgttcaactatgcccgaicag
agcagattgtactgagagtgacacatagatcaacgacattactatataatataataggaaagcatttaataagacagcattgataatagtgactttgtcagttatg
acgccagatggcagtagtggaagatactttatgaaaaatagctgtgacctttagtacaatcttgcagcagcttcttcttttgcggaatgaatgaatctg
gtcgaaaaaagaaaaaggagggccaaaggaggagggcattgtgactattgagcagctgagtaacgtgattagcacaacaaaggcagcttggagtagt
tctgttaataatttcacaggttagtctgctcattgggtgaaagtttgcggttcagagcagagcggcagagaatgtgcttagattccgactgctgactgctg
ggfataatagtgtgcccataagaaagaaacattgaccgggtattgcaaggaaaattcaagctgtgtaaaagcatataaaatagttcagggcactccgaa
atactgtgttggcgtgttctgtaataacctaaggaggtgttttgcctgtgctgaatgattacggcattgatatctccaactgcatggagatgagctgtggca
agaataccaagagttctcgtgttgcagttataaaagactcgtatttcaaaaagactgcaacatactactcagtgagcttcaagaaacctcattctgttatt
ccctgtttgtatcagaagcaggtgggacaggtgaacttttgattggaactcgaattctgactgggttggaaggcaagagagccccgaaagcttaactttat
gttagctgtgtgactgacgccagaaaatgtgtgtatgctgcttagattaaatggcggtattgtgtgtgtgtatgtaagcgagggtgtggagcaaaatgtgttaaaa
gacttcaacaaaatagcaaatctgcaaaaatgctaagaaaataggttattactgagtagtatttttaagtagttgttgcactgtccgatctatcggtgtgaa
ataccgcacagatgcgtaaggagaaaaatccgcatcaggaaatgtaaacgttaalaattttttaaaatcgcgttaaattttttaaatcagctcatttttaac
aataggccgaaalcggcaaaatcccttaataacaaaagaatagaccgagatagggtgagtggtttccagtttgaaacagagtcacatttaaaagacgt
ggactccaacgtcaaaaggcgaaaaacccgtatcagggcgatggccactacgtgaacacatccctaalcagtttttgggtcaggtgctggtgtaaaag
cactaaatcgggaacccctaaaggagccccgatttagcttgcgggggaaagccggcgaaactgctgagaaagggaagggaagcgaagagag
cggggcgttagggcgttggcaagtgtagcggticacgtctgctgtaaccaccacaccgcccgttctaatgctgcccactacagggcgctgctgctcattc
ccattcaggtcgtcgaactgttgggaaggcgatcggtgctggcccttctgctattacgccagctggcgaaaggggatgtctgcaaggcgattaaagt

gggtaacgccagggtttccagtcacgacgtgttaaacgacggccagtcgtccaagctttcgagctcgagatcccgagctttgcaaattaaagccttc
 gagcgtcccaaaccttctcaagcaagggtttcagtaatagttacatgcgtacacgcgtctgtacagaaaaaaagaaaaattgaaataaataacgttctt
 aatactaacataactataaaaaataaataggacctagacttcagggtgtctaacctctcttctcggttagagcggatgtggggggaggcggtgaatgtaa
 gcgtgacataactaattacatgataccttttgttttcgggtgtacaatatggacttctcttcttggcaaccaaacccatacatcgggattctataatacctt
 cgttgggtctccctaactgtaggtggcgaggaggagataacaatagacagataccagacaagacataatgggctaacaagactacaccaattacactg
 cctcattgaggtgggtacataacgaactaatactgtagccctagactgtatagccatcatcatatcgaagtctcactacccttttccatttgcattctattgaagta
 ataataggcgcatgcaacttcttttcttttcttctctctcccccgtgtgtgtctcaccataccgcaatgacaaaaaaatgatggaagacactaaaggaaa
 aaattaacgacaaagacagcaccaacagatgtgtgttccagagctgtatgggtatcttcgaacacacgaaacttttctcttctcattcacgcacta
 ctctctaataagcaacgggtatagcgttctctcagttacttgaattgaaataaaaaagtttgcgtttgtctatcaagtataaataagacctgcaattataatc
 ttgtttctctcgtcattgttctcgttctcttctcttcttcttctgcacaataatttcaagctataccaagcacaatcaactccaagcttgaagcaagcctcct
 gaaagatgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgcgataatttgcgacttaaaaagctcaagtgctccaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctga
 agaacaactgggagtgctgtactctccaaaacaaaagggtcctcgtactagggcacatctgacagaagtgggaatcaaggctagaagactgggaaca
 gctatttctactgattttctcagagaagaccttgacatgatttgaataatggatcttaccaggaataaaagcattgttaacaggatatttgaagataatgtg
 aataaagatgcggtcacagatagattggttcagtgagactgataatgccttaacattgagacagcatagaataagtgacacatcatcatcgggaagagat
 agtaacaaaggicaagacagttgactgtatcgccggaattcttaatacgaactactatagggcatatggccatggaggccccggg

pGAD424-without-FULL-ICE-BOTH-T7

SECUENCIA ID N°: 9

[illegible]

cggtgcattttgttttcaaaaaatgaagcacagattcttcgtgtglaaaatagcgcttcgcgttgcaattctgtctgtaaaaatgcagctcagattcttggttgaa
aaattagcgcctcgcgttgcaattttgttcaaaaaatgaagcacagatgcttcgtgtgcagctcaattctttttttttttttttttctctccccgttggtgtc
caccatatccgcaatgacaaaaaaatgatggagaacataaaggaaaaaattaacgacaaagacagcaccacagatgctggtgttcagagctgatga
ggggatcttcggaacacagaaacttttctctctcattcacgcacactactctctaatgagcaacgggtatcggcctctctcagttactgaattgaaataa
aaaaagttgccgcttgctatcaagataaatagacctgcaattatatactttgtttctctgctcattgttctcgttcccttctctgttctttttctgcacaattt
caagctataccaagcatacaatcaactcgaagcttgcgaagatggalaagcgggaattaatcccgagcctccaaaaaagagagaaggtcgcaattggg
taccgcgcgaattttaaactcaagttgggaattgctgtagctcattgtcttcaattctactaacgtagtcaacgctcggaacccatacaactcaacaaaa
ttcgaagcgttctacaaacattgctctcttaacgcttcagtataactgaataaagaaatcagcgtcgtataaattgatgtgtgtaataatcaaaaaccac
tgtcacctgttgtagcggaacaaactcgtataacgcgttggaaactactcagcgggatgttaataccactcaatgatgatgtatataactctattcgtatga
tgaagataccccaccaaaccccaaaaaagagatcgaaatttataacgactcactatagggcccatggacggaataccagttcattcttatgtacctatgctg
agaatcgtgccaataagaagccaatacttcttagatgatgcaataatatataaataaaaacaaaacagaaggctg

[illegible]

pGN207:

SECUENCIA ID N°: 11

ccggctggtagccgctagccgtacgaaccgggttctagaactagtggtatccactttagatcaacalgaicagaatccaatcagttggcttgcctgacga
ccctggcttactctggacgatcaaatggatnttttagccaaaatatcggtttcagtttccaatggatcagaaggtcccttcgctgttgacagcccttgacacggaa
ctgttaattgatctcccttctgttgatgtaactgactgtgaagttgggtatctccactacgttccacatggaaccagagattcgtcttgggtttcatctttcaatt
catagaactcaattggctcttccctcgtatctctgtgtgttttcagtcgaaggtgacgacatcttgcgaagacatcagttacctgattggctcccttgggtt
cgttggctgtcctttaccttgatattgatatgtacactgttcagttccatattgttgggttcagtgatgttatcttccactttgtcctgaagattgtcctttggca
acgcaaaactcgtgagatgtatgtccttttcaatttgcagccttgcctctctcgaattcttttcattgaaatcttcatcttctgttgcctgcacatca
ataagcaaatgaacttagagatgtgttcgacgttcagcttgcacgaagaatcttcacgtaagattcttgcgagcaaggtttcttggcttcgcaaacac
acgaltcagaaggaacagaaggaatctccagttccagcctgtttacgagcagaagaatctgaattgatattcttccccttaagatttggaaacagttgtctgt
tttctgaiccttggaaacacgagagcttcttccatcgtccattcttaiccttctttcaatgacgaaagcttactgataccgttcgacctgagggggggg
cctctgtcgtgagtcggtacaaatcactgaaactccaaaggcagccagtgaggaaacgtgaaagaagaagaaagagtcactggaacaggtttgattttct
ttctggctcaaaaagatgaattattgattttcagccagatactcccaaaactagcagcgagaagtctgcgaagctgttcacagctgccccagagaatcgcg
gggaagttagccaagggtagttttcaaaaatcaataactgatacalaattttattgtttgttgaatttaagaataataatctcaaaaatctctctgaattta
aagattgcagattatattcgaagaaattcagataattcatagagctatgttaattttcatttaccagttcagaaactcgaagaaatcagaagaaatcaaa
gaaaaggcttagcggggatgacgcgcttgcacacccaagacgtatgaagccgggaaacttcacagctccaaaagggtccaaaggagaccaggt
ttgtcaaaagcttctcgtcgattatcttctatttcaattttcagagaatcagagctcttcgaaaaalccccggttcttcaagatctccagaaggcttctcag
cacgttccccgtcacgacttcttagacggcgcggagaagaagctcagaagaagcaatccgaagagccagcaccgtaccagagaaaaagaa
gaaaagagccgctggtatttctacgaacagaacccggaggagcatatttccaccgccaaaacttcgactatgcaacaacagattagtgtataagcaa
agtgaacagttatcagagaatgaatggggaagaatgaagaaaaagattcagcgattgttaacagagtcacgcgaagaatctgttcaaatgtcag
agaacttctcaagagaalgtgattcgttcaagtgagtgagaaaatcgaaggaaaggaagaattatattttcaggggacgttctcgtcgtgac
attattcacaagctcagcttcttcacaggagcttctcactgaactctatgcagcttgcgcgagtttgcagttcactgaaattccctcatgctgttgtagactttctcc
gtctgtcgtattgtcagttcctcaaaaagatttctctgaatttgcagaaatcagaggttgcgtgaacgtgatcacaattatcgcacattgtattatcaacaggt
gtctcagaagttcttgcgtggaatcagatctgtatgttgaagaaccaactgaltgattcagttgaagtcgcatattgcgttcttgaagaagtgtggag
caaaagcttctgagatgtctccagcgtcttaacagtgctacgaccttcttctgtcaattctcatggaactgaagaagatcggaataatgcactgtgac
acgtattcagttatgtatgtgagactgcaatgcagattcgaagggaacaaatttgcggtaaagtagaataataaattagttttatagaaaaaaataattaga
ataatttaattctactagccaatcagggcagcttttgcgcatagttctattatgaaaaatttggagaatttctcatattctcgtcggaaaacttggaaatc
gacgagatcttctgcttctgtcagctgcacgtcttctgtcttctcgtctgtcttctgtcgtacaaagaaccttgttgagtctacaaatgaactctgt
gttgcgtctgttctgtcactggatgcagctagcagctgacttctcgaataatcagattgagttgcgattaggttgcactgagaaatcgaagataatcgaact
tttgaataatctcagaggaattaaaaaattattctgcacaatctcaaaaatttacttctgacacatttctcacaacttttcaaaagttaagtaagtaaaaa
altgataaaaatcggaalattggcgaalttcagaccatttttaagcattttcaaaaaaaattgcagctgaataaattgcatatttcagataaatcagcgattt
ctgttctgtacactagtttttagtttaaaaaattgttgaagaacatggtgtcgaatggtaattctatgaatttccatgtgttttttcaataaacaactatcc
aaacttccaaaactcacttttgcggagcttgggtctatcagaatctgtcgtcagtttataagcagagcactctgtatcactgaaaaataattttatcaca
aacttgaatacaactaaaccacttaattacttctcgtatcttctgtcgtcgttgcagatgacgggtgaagaagccaaattgtagtgtgattgttgcacgtc
cttctgggtgtgtacgtcagtgctcgtcaatgctatttagtataaacttagccctaagattcaattatgaagtgatttaattttcttgcacctttaaagt
gactcttttggattagaacataatagacgtgtttacctatttataaaactagaacatcaatgatalacgaccaaaatggataactcctcactgttgcgat
ctaggcaactgttcttcaagaatttctacgttaactgtatgaagaatacaaaatttctgttggccgcaaaaatagggtttaagtggtgagatgtttttat
tagctaacagggaalattatagtttttttgcgaagaacacactgaaaacccctaattgtatataatttttggagcagcttctgtctttagcgaataaaat
tcgataaaaacagaatttaagtgaattgttcacatttagtttctattttatcaaaatttgtgtcctaaaaaacatcgaagctgtctctaaaaaaatgcattaaaaa
agggggtttcagttggttttccattaaaaaagctaaatttaactaaaaatccatcatatttccaactttgtcacaacaaataaaatgtgtgtcaaaatgtgttcg
aaaaaatgttttttttttttttaatttaataaataaataatgttttcttgcgtggacacatacaattttggcgtaaaatttcagttcaaaatttccattttacaacct
aatcataaagctacgtctgacttctcgtcacttaactcgtgcgtgactgacgaagaacacccgtagccaaaagaacagaagaacacagcagtgattgt
ggtagtgtgcgttcacatcgaacatcagcaaatcagcttctgtgggtctcacttccgtatctatgagagaggggagaggaatgagcgaattgaggaca
gttcttcgacagcagcgtcgtcactcaatacgaatactcgaaggaggtgagagaaaaatttttcaataagccccctcgttgatatacatcacactatc
atactccgaagaatggtcgaattgaatggacgtcagctgtgtgtctgtatgttcgaaggcatcatcgtatgaataacgaagaagaataaataatttgc
aggcgtatccggcggtcattgaagacttggactgtatgaggaggagatcatcctacacacttaatttggaggatgcgtgtgtatcggaaaatg
ggcttgatgaatgtactgaccacacggggggggcattaaatttaataaattgaaltcattcagatgtgttcaaacctagatccagaalttcgaaaagaacga
ggaggtttatgaggagatcgttaaggaaatcatttgaaacgccgataatttcggatgaggtgtgtgcgcagagttggaigtgaagaagagggtagt
gatgtggaagagggtccgaagaagactacagagattatgataatcgtatcagaattgactgtttcagaaggatattcattttgagtttggccggcga
attctgtaagtgtccgggttgcgaaaaattgtcgaatttgcgggaaaaaaaattccggaattttataaaaaatttgaataaataaatttgaatttcacatt
ctcagagaagaactcactgacattgcaatcatttttgcataccagaagctgttcacaaatttgcgaatttgaacttcagacagcagtcaggctcagc
gtgtgtcgaagaaaaaatttgcacaaaaaaacaaacaaatcataaaattttaaanaaaaaacctcgtttttttttttttttatcagagaaaaacaaaaa
atgtatttttgcgaatttcaaaatactatccccgaaaatttcaaatattttctttcagaaacgaactctgcgcatgtcttgcgttattgtgtgtcctaacagctga
cctacgagcgtattctacggaatgtctatcgaacgtttctgcgacttgccttcgaataaccagcaalatttgaagaagcttgcacaggacagctattccac
gattaccggaattgacatcacaaaactcgcgaatttgcgtcgccttattgtctatttgcctctgcagcgatgtctattgactggaagatttggccgatattgaa
aatgaccgaagagagacacaacttcttgcgagaatctataataaataataatttaattgaacttgcggaggcgatggtgaattgaacttcaatcgcagag
ttactgataccgttgagtttctagagagatttttctgattcaatttccctattttcagaacttttggctcattgtcttgttggattatccacgaactaatccg
aacagcgacgtcatttgcacacttctcacaattgattggatttgggtgtttgactgttgaacttctcagactgaatgtcgttgcgcaagggtctcagaagaaga
agggaagctctgagactgtgaaggccgaatcaagctcagatcagacttcttgcgacttctcagactcgtgacttcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
gactcgtctcagatctcacttcttcttcttcaaatcagacgpcagaacacgaagaanaaagaagaagaagaacagtgaaagagagttccaaaaaagag

gaaaaagagaatattggtcgcacgggacgtggtgagacaagagagctgaacgtcaicgtgaicaaagtgtggagaacaaggacaaggatcgtcgcacg
 tcgccaggatcttcacgaaaatcgtcggccagaaagagagatgaccgcaaggatcggagtaagatcgtcgtcgaagactcggatgatgagg
 atcggaaaggtcgtgaacgtcgggaagattcaggggaaagacgtcgggagatcgggacgtcgtcgaacaaaggatcaggaggaatcaccg
 tgaagatcgcgtgacccgaagcaagatcgtgaggatcgcgtgacccgtcgtcgtacgtcgtatgagatcgtgaaacacgtcgtcggatagaagt
 gaagagcggaggagacgtcgtcgtgaagtgaatcggatgacgtcgcgcgtcgtgaatttcaaaatttaatactgaatattgttttttctatt
 atttattatcttctgtgttttttctgtcttcaaaaaaattcaatcaatcaaatcaaatcagcgggttttttctcttccgtcctcccaattcgtattccgct
 cctctatctgaacacaatgtcgaagttattatctctcgtcttcaatttcattaggacgttggggggaattgtgtggaagggggaaacacacaaaaaggatg
 atggaaatgaaataaggacacacataatgcaacacattcaattcagaaatattggaggaagggttaaaagaaacataaaatatatagaggaggaa
 ggaaaactagtaaaaataagcaaaagaaattaggcgaacgatgagaattgtctcgttggcaaaatcggaatcgtatggagaggcacgtttgcca
 aggcgaatgttcggtatggagatctgtaaaattttiaagtgaatttgggtgtccttttcaaaaatttccgattttcgttgaattacgggtccaggct
 cgacacgtcttccaaattttcaaaatcaaaagagccttaattgggtgtgtgtccttttcaaaaatttccgattttcgttgaattacgggtccaggct
 tatttatgattttcaaaaaattcaaaagaaactgggtgaaaactcggaaaattgtgaactacagtaatccaaatcctaaaggcgcacaccttttaaatgtccgc
 cccaatcagataatttttaagattcgtagagcggccgaccggttggagctccaaatcgcctatagtgagtcgtattacaattcactggccgtcgt
 tttaacaacgtcgtgactgggaaaacccctggcgttaccacaaatcgtcgttgcagcacatcccccttccgagcgtgcgtgaatagcgaaggagccc
 gcaccgatcgccttcccaacagtgtcgtagcctgaatggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcaatagcggcggtgtgtgtgtgtacgc
 gcagcgtgacccgtacactgtccagcgccttagcgcgccttctcgttcttcccttctcgtccacgttccggttcccggttcccggtcaagctcta
 aatcggggggtcccttaggggttccgatttagtctttacggcacctcgcaccccaaaaactgtatagggtgatgttccacgtatgtggccatcgcct
 gatagacgtttttcgcctttagcgttggagtcacgttcttaaatgtgactctgttccaaactggaaacacacacacccctatctcgttctattctt
 gatttataagggaatttgcggtttcggcctattgtttaaataatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaaacaataatataacgttacaattica
 ggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctattgttttttcaataatcattcaaatatgtatccgtcatgagacaataacccgtataaatgc
 ttcaataatattgaaaaaggaagagtatgatttcaacatttccgtgtcgccttatttcccttttttgcggcattttgccttctgttttgcaccagaaac
 gctgggtgaaagttaaagatgtcgaagatcagttgggtgcagagtggttaccatgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagttttcc
 ccgaaagacgttttcaaatgtagcacttttaagttctgtatgtggcgcgttatttccgtatgtacgcgggcaagagcaactggtgcgcgtat
 acactattctcagaatgacttgggtgagttactcaccagtcacagaaaagcaatcttaccgatggcatgacagtaagagaattatgagtcgtgtccataag
 catgagtgataacactcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacccgttttttcaacaatgggggatcatgtaactc
 cctgtatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtgcaatggcaacaacgttgcgcaact
 attactggcgaactacttacttacttctccggcaacaattatagactggagcgggataaagtgcaggaccacttctgcgtcgccttcc
 ggctggctgtttattgtgataaatcggagccgggtgagcgtgggtctcgcgttattgcagcactggggccagatggtgaagccctccctgtatcgt
 agttatctacacgacgggcagtcaggaactatggatgaacgaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgttaactgtcag
 accaagttaactatatacttttagattgatttaaaacttcaatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctatgacaaaatcccttaa
 cgtgagttttgttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgttaatctgctgttgcacacaaaa
 aaaccaccgctaccagcgggtgtgttggcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataact
 gtcttctagtgtagccgtatgtagccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtcgtctaatcctgttaccagtggtcgtcgcag
 tggcgaatagctgttcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttgcgcacacagcc
 cagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaagcgcacgcttcccgaaaggagaaaggcggagagg
 tatccggtaagcggcagggctggaaacaggagagcgcacgaggagcttcaggggggaacgcttggatctttatagctcgtcgggttccgcac
 ctctgacttgagcgtcgtattttgtatgtcgtcagggggccgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttaggttcttgcgttgcct
 ggctttgtctcacatgttcttctcgttattccctgtattctgttgataaccgtattaccgcttttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacga
 ccgagcgcagcgtgagcgtgagcgaaggagcgggaagagcgcgaacacgtccttcccgccggttggccggttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcacgacaggtttccgactggaagcgggcagtgagcgaacgaattatgtgagttacttacttactttaggcacccaggcttacttattgtct
 tccggctcctatgtgtgtgaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagctatgacctgattacgcaagctcggaaattacccctactaa
 agggaaacaaagctgggggggactctccaaatcgtctcgtctgaaaaacgaaagtggaccttgcacacgaaaaatgggcgaaaaatga
 aattgagcttttgggtcgaaaaaatgttttgaatgtgagaacagttaaacacgaagatcatattttttagacccggatgctcgtgaaaaatgtctg
 acatagatttaaaaaagcatalatatattttcaactgtgaaagtgttgcacatttatagaatctcctatttgcacattgttttttatttaactgaggcag
 ttttgaacaccccttttgaacatttgaatctcttgaagtatactgtcgaaggactgacttgagcgttcgaaatgccaagaagaaaactataattgaatctgc
 gctaaattgagaatgcaaccgcgtcactggacaattgaaaaaaatttattcggaggcgcacaacgggtattttcgaattgattttctgtgtattttct
 cattttttataaattctctttgattatcgttctgtgtgagaaatttaatttattcaaacctttttatagtaagata

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Devgen N. V.
- 5 <120> Caracterización de la función génica usando inhibición por ARNbc
- <130> 50897/408
- <140> 99932836.2
- 10 <141> 02-07-1999
- <150> GB 9814536.0
- <151> 03-07-1998
- 15 <150> GB 9827152.1
- <151> 09-12-1998
- <160> 11
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 3216
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico
- 30 <400> 1
- gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
- ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc 120
- tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaataagacc 180
- gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
- tccaacgtca aaggggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
- cccaaataca gttttttgct gtgcaggtgc cgtaaagctc taaatcggaa ccctaaaggg 360
- agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaaac tggcgagaaa ggaagggaag 420
- aaagcgaaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
- accacacccg ccgcgcttaa tgcgcgcta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
- gcaactgttg ggaaggcgga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag 600
- ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
- gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatac actcactata gggcgaattc gagctcggta 720
- cccggggatc ctctagagtc gaaagcttct cgccctatag tgagtcgtat tacagcttga 780
- gtattctata gtgtcaccta aatagcttgg cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt 840
- gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 900
- cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 960
- tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc ggggggagag 1020

```

gcggtttgcg tattggggcg tcttcgcgtt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 1080
ttcggtgcg gcgagcggtg tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat 1140
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 1200
aaaaggccgc gttgctggcg tttttcgata ggctcgcgcc cctgacgag catcacaaaa 1260
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 1320
cccctggaag ctcctcgtg cgtctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt 1380
ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca 1440
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 1500
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagcacttat 1560
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 1620
cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 1680
gcgctctgct gaagccagtt accttcgaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 1740
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 1800
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaa 1860
actcacgta agggattttg gtcagtgat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 1920
taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca 1980
gttaccaatg cttaatcagt gaggcacct tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca 2040
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggaggggctta ccactcggcc 2100
ccagtgcctc aatgataccg cgagaccac gctcacccgc tccagattta tcagcaataa 2160
accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctcctg aactttatcc gcctccatcc 2220
agtctattaa ttgttgccg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 2280
acgttggttg cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat 2340
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgat ccccatggtg tgcaaaaaag 2400
cggttagctc cttcggctct ccgatcgtt tcaagaagta gttggccgca gtgttatcac 2460
tcagtgttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 2520
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata ccgcgcccgg cgaccgagtt 2580
gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata gtgtatgaca tagcagaact ttaaaagtgc 2640
tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 2700
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttacca 2760
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 2820
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 2880
gttattgtct catgagcgga tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 2940
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga 3000
cattaacctt taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgctt ttcggtgatg 3060
acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 3120
atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgcggggct 3180
ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactga 3216

```

<210> 2

<211> 6460

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 2

ctagcatgaa caggattaac atcgctaaga acgacttctc tgacatcgaa ctggctgcta 60

```

tcccgttcaa cactctggt gaccattacg gtgagcgttt agctcgcgaa cagttggccc 120
ttgagcatga gtcttacgag atgggtgaag cacgcttcgg caagatgttt gagcgtcaac 180
ttaagctgg tgaggttgcg gataacgctg ccgccaagcc tctcatcact accctactcc 240
ctaagatgat tgcacgcac aacgactggt ttgaggaagt gaaagctaag cgcggcaagc 300
gcccacagc cttccagttc ctgcaagaaa tcaagccgga agccgtagcg tacatcacca 360
ttaagaccac tctggcttgc ctaaccagtg ctgacaatac aaccgttcag gctgtagcaa 420
gcgcaatcgg tcgggccatt gaggacgagg ctgcttcgg tcgtatccgt gaccttgaag 480
ctaagcactt caagaaaaac gttgaggaac aactcaacaa gcgcgtaggg cacgtctaca 540
agaaagcatt tatgcaagtt gtcgaggctg acatgctctc taagggtcta ctcggtggcg 600
aggcgtggtc ttcgtggcat aaggaagact ctattcatgt aggagtacgc tgcacgaga 660
tgctcattga gtcaaccgga atggttagct tacaccgcca aaatgctggc gtagtaggtc 720
aagactctga gactatcgaa ctgcacctg aatacgtgga ggctatcgca acccgtcgag 780
gtgcgctggc tggcatctct ccgatgttcc aaccttgctg agttcctcct aagccgtgga 840
ctggcattac tgggtggtggc tattgggcta accgctcgtc tctctggtcg ctggtgcgta 900
ctcacagtaa gaaagcactg atgcgtacg aagacgttta catgcctgag gtgtacaaag 960
cgattaacat tgcgcaaaac accgcatgga aaatcaacaa gaaagtccta gcggtcgcca 1020
acgtaatcac caagtggaag cattgtccgg tcgaggacat ccctgcgatt gagcgtgaag 1080
aactcccgat gaaaccggaa gacatcgaca tgaatcctga ggctctcacc gcgtggaaac 1140
gtgctgcgcg tgcgtgtgac cgcaaggaca gggctcgcaa gtctcgcgt atcagccttg 1200
agttcatgct tgagcaagcc aataagtttg ctaaccataa ggccatctgg ttccttaca 1260
acatggactg gcgcggtcgt gtttacgccc tgtcaatgtt caaccgcaa ggtaacgata 1320
tgacaaaagg actgcttaag ctggcgaaaag gtaaaccaat cggtaaggaa ggttaactact 1380
ggctgaaaat ccacggtgca aactgtgcgg gtgtcgataa ggttccgttc cctgagcgca 1440
tcaagttcat tgaggaaaac cacgagaaca tcatggcttg cgctaagtct ccactggaga 1500
acacttggtg ggctgagcaa gattctccgt tctgcttcct tgcgttctgc tttgagtacg 1560
ctgggttaca gcaccacggc ctgagctata actgctccct tccgctggcg tttgacgggt 1620
cttgcctcgg catccagcac ttctccgcga tgcctcgaga tgaggtaggt ggtcgcgcgg 1680
ttaacttget tctagttag accgttcagg acatctacgg gattgttget aagaaagtca 1740
acgagattct acaagcagac gcaatcaatg ggaccgataa cgaagtagtt accgtgaccg 1800
atgagaacac tggtgaaac tctgagaaag tcaagctggg cactaaggca ctggtggtc 1860
aatggctggc tcacggtgtt actcgcagtg tgactaagcg ttcagtcag acgctggctt 1920
acgggtccaa agagttcggc ttcggtcaac aagtgtcggg agataccatt cagccagcta 1980
ttgattccgg caaggttcgg atgttcactc agccgaatca ggctgctgga tacatggcta 2040
agctgatttg ggaatctgtg agcgtgacgg tggtagctgc ggttgaagca atgaactggc 2100
ttaagtctgc tgetaagctg ctggctgctg aggtcaaaga taagaagact ggagagattc 2160
ttcgcaagcg ttgcgtgtg cattgggtaa ctctgatgg tttccctgtg tggcaggaat 2220
acaagaagcc tattcagacg cgcttgaacc tgatgttcct cggtcagttc cgcttacagc 2280
ctaccattaa caccaacaaa gatagcgaga ttgatgcaca caaacaggag tctggtatcg 2340
ctcctaactt tgtacacagc caagacggta gccaccttcg taagactgta gtgtgggcac 2400
acgagaagta cggaatcgaa tcttttgcac tgattcacga ctccctcggg accattccgg 2460
ctgacgctgc gaacctgttc aaagcagtgc gcgaaactat ggttgacaca tatgagtctt 2520
gtgatgtact ggctgatttc tacgaccagt tcgctgacca gttgcacgag tctcaattgg 2580
acaaaatgcc agcacttcgg gctaaaggta acttgaacct ccgtgacatc ttagagtcgg 2640
acttcgcgtt cgcgtaacca tggattgat atctgagctc cgcacggcc gctgtcatca 2700
gatcgccatc tcgcgccgtt gcctctgact tctaagtcca attactcttc aacatcccta 2760
catgctcttt ctccctgtgc tcccacccc tatttttgtt attatcaaaa aaacttcttc 2820
ttaatttctt tgttttttag cttcttttaa gtcacctcta acaatgaaat tgtgtagatt 2880
caaaaataga attaatcgt aataaaaagt cgaaaaaat tgtgctccct cccccatta 2940

```

ataataatc tatcccaaaa tctacacaat gttctgtgta cacttcttat gtttttttta 3000
 cttctgataa attttttttg aaacatcata gaaaaaacg cacacaaaat accttatcat 3060
 atgttacgtt tcagtttatg accgoaatTT ttatttcttc gcacgtctgg gcctctcatg 3120
 acgtcaaatc atgtcatcgt tgaaaaagtt ttggagtatt tttggaattt ttcaatcaag 3180
 tgaaagttta tgaaattaat tttcctgctt ttgctttttg ggggtttccc ctattgtttg 3240
 tcaagagttt cgaggacggc gtttttcttg ctaaaatcac aagtattgat gagcacgatg 3300
 caagaaagat cggaagaagg tttgggtttg aggcctcagt gaaggtagt agaagttgat 3360
 aatttgaaag tggagtagtg tctatggggt ttttgctta aatgacagaa tacattccca 3420
 atataccaaa cataactggt tcctactagt cggccgtacg ggccctttcg tctgcgcgt 3480
 ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt 3540
 ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg 3600
 tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatag 3660
 cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg gccttaaggg 3720
 cctcgtgata cgctattttt tataggTTaa tgtcatgata ataattggtt cttagacgtc 3780
 aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca 3840
 ttcaaataag tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 3900
 aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt ttgcggcatt 3960
 ttgccttctt gtttttgcgc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 4020
 gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 4080
 ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagtcttgc tatgtggcgc 4140
 ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgtt cgcgcatac actattctca 4200
 gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 4260
 aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtataaac actgcggcca acttacttct 4320
 gacaacgato ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 4380
 aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 4440
 caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact 4500
 tactctagct tcccggaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 4560
 acttctgcgc tcggcccttc cggttggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga 4620
 gctggtgtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt 4680
 agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagac agatcgtga 4740
 gatagggtgc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 4800
 ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 4860
 taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttctgtc cactgagcgt cagaccccg 4920
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttga 4980
 aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgttggg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 5040
 ttttccgaag gtaactggtt tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtga 5100
 gcgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 5160
 aatctgttta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc 5220
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca 5280
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga 5340
 aagcgccacg cttcccgaa ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg gcagggtcgg 5400
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt 5460
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag gggggcggag 5520
 cctatggaag aacgccagca acgggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 5580
 tgcctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 5640
 tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat cagtgagcga 5700
 ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaac gcctctccc gcgcgttggc cgattcatta 5760
 atgcagctgg cagcagcagg ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 5820

```
tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat 5880
gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta 5940
cgccaagcgt gcatgcctgc aggtcgactc tagaggatca agagcatttg aatcagaata 6000
tggagaacgg agcatgagca ttttcgaagt tttttagatg cactagaaca aagcgtgttg 6060
gcttctctcg agcccgttt cttatatac ccgcattctg cagccttaca gaatgttcta 6120
gaaggtccta gatgcattcg tttgaaaata ctcccgttg gtgcaaagag acgcagacgg 6180
aaaatgtatc tgggtctctt tattgtgtac actacttttc catgtaccga atgtgagtcg 6240
ccctcctttt gcaacaagca gctcgaatgt tctagaaaaa ggtggaaaat agtataaata 6300
ccgttgaaaa taaataccga acaacatttg ctctaattgt gaaattagaa atcttcaaac 6360
tataatcctc tcaactggatc cccgggattg gccaaaggac ccaaaggatg gtttcgaatg 6420
atactaacat aacatagaac attttcagga ggacccttgg 6460
```

5 <210> 3
 <211> 8330
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

```
<400> 3
gttgctgtaa agagatgttt ttattttact ttacaccggg tctctctctc ctgccagcac 60
agctcagtggt tggctgtgtg ctccgggtcc tgccaccggc ggctcctctc tcttcttctt 120
cttctctcct gctctcgctt atcacttctt cattcattct tattcctttt catcatcaaa 180
ctagcatttc ttactttatt ttttttttcc aattttcaat tttcagataa aaccaaacta 240
cttgggttac agccgtcaac agatccccgg gattggccaa aggacccaaa ggtatgtttc 300
gaatgatact aacataacat agaacatttt caggaggacc cttgcttgga gggtagccga 360
tgactgctcc aaagaagaag cgtaagctca tgaacacgat taacatcgct aagaacgact 420
tctctgacat cgaactggct gctatcccgt tcaacactct ggctgacct tacggtgagc 480
gttttagctcg cgaacagttg gcccttgagc atgagctcta cgagatgggt gaagcacgct 540
tccgcaagat gtttgagcgt caacttaaag ctggtgaggt tgcggataac gctgccgcca 600
agcctctcat cactacccta ctccctaaga tgattgcacg catcaacgac tggtttgagg 660
aagtgaagac taagcgcggc aagcgccgca cagccttcca gttcctgcaa gaaatcaagc 720
cggaagccgt agcgtacatc accattaaga ccactctggc ttgcctaacc agtgctgaca 780
atacaaccgt tcaggtgtga gcaagcgcaa tcggtcgggc cattgaggac gaggtcgcct 840
tcggctcgat ccgtgacctt gaagctaagc acttcaagaa aaacgttgag gaacaactca 900
acaagcgctg agggcacgct tacaagaaag catttatgca agttgtcgag gctgacatgc 960
tctctaaggg tctactcggg ggcgaggcgt ggtcttcgtg gcataaggaa gactctattc 1020
atgtaggagt acgctgcacg gagatgctca ttgagtcaac cggaatgggt agcttacacc 1080
gccaaaatgc tggcgtagta ggtcaagact ctgagactat cgaactcgca cctgaatacg 1140
ctgaggctat cgcaaccgtg gcagggtgcg tggctggcat ctctccgatg ttccaacctt 1200
gcgtagttcc tcctaagccg tggactggca ttactggtgg tggctattgg gctaaccggtc 1260
gtcgtctctc ggcgctggtg cgtactcaca gtaagaaagc actgatgcgc tacgaagacg 1320
tttacatgcc tgaggtgtac aaagcgatta acattgcgca aaacaccgca tggaaaatca 1380
acaagaaagt cctagcggtc gccaacgtaa tcaccaagtg gaagcattgt ccggtcgagg 1440
acatccctgc gattgagcgt gaagaactcc cgatgaaacc ggaagacatc gacatgaatc 1500
ctgaggctct caccgctggg aaacgtgctg ccgctgctgt gtaccgcaag acaaggctcg 1560
caagtctcgc cgtatcagcc ttgagttcat gcttgagcaa gccataagt ttgctaacca 1620
```

taaggccatc tggttccctt acaacatgga ctggcgcggt tctgtgttac gctgtgtcaa 1680
 tgttcaaccc gcaaggtaac gatatgacca aaggacgtct tacgctggcg aaaggtaaac 1740
 caatcggtaa ggaaggttac tactggctga aaatccacgg tgcaaaactgt gcgggtgtcg 1800
 ataaggtttc gtttccctgag cgcacaaagt tcattgagga aaaccacgag aacatcatgg 1860
 cttgcgctaa gtctccactg gagaacactt ggtgggctga gcaagattct ccgttctgct 1920
 tccttgcggt ctgctttgag taagctgggg tacagcacca cggcctgagc tataactgct 1980
 cccctccgct ggcgtttgac gggctcttgc ctggcatcca gcacttctcc gcgatgctcc 2040
 gagatgaggt aggtggctgc gcgggttaact tgcttctag tgaaccggt caggacatct 2100
 acgggattgt tgctaagaaa gtcaacgaga ttctgcaagc agacgcaatc aatgggaccg 2160
 ataacgaagt agttaccgtg accgatgaga acactgggtg aatctctgag aaagtcaagc 2220
 tgggcactaa ggcaactggc ggtcaatggc tggcttacgg tgttactgc agtgtgacta 2280
 agcgttcagt catgacgctg gcttacgggt ccaaagagtt cggcttccgt caacaagtgc 2340
 tggaagatac cattcagcca gctattgatt ccggcaaggg tctgatgttc actcagccga 2400
 atcaggctgc tggatacatg gctaagctga tttgggaatc cgtgagcgtg acgggtggtag 2460
 ctgcggttga agcaatgaac tggcttaagt ctgctgctaa gctgctggct gctgaggtca 2520
 aagataagaa gactggagag attcttcgca agcgttgccg tgtgcattgg gtaactctg 2580
 atgggtttccc tgtgtggcag gaatacaaga agcctattca gacgcgctg aacctgatgt 2640
 tcctcggtca gttccgctta cagcctacca ttaacaccaa caaagatagc gagattgatg 2700
 cacacaaaca ggagtctggt atcgctccta actttgtaca cagccaagac ggtagccacc 2760
 ttcgtaagac ttagtggtg gcacacgaga agtacggaat cgaatctttt gcactgattc 2820
 acgactcctt cggtaaccatt ccggctgacg ctgcgaacct gttcaaagca gtgcgcgaaa 2880
 ctatggttga cacatatgag tcttgtgatg tactggctga tttctacgac cagtctcgctg 2940
 accagttgca cgagtctcaa ttggacaaaa tgccagcact tccggctaaa ggtaacttga 3000
 acctcgtga catcttagag tcggacttcg cgttcgcgta agggccact agtcggccgt 3060
 acgggccctt tctgtctcgcg cgtttcgggt atgacggtga aaacctctga cacatgcagc 3120
 tcccgagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg 3180
 gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgoggca tcagagcaga 3240
 ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3300
 accgcatcag gcggccttaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg 3360
 ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaacctct 3420
 atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga 3480
 taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcggc 3540
 cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg 3600
 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 3660
 aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat gatgagcact 3720
 tttaaagtto tgctatgtgg cgcggtatta tcccgattg acgcccggca agagcaactc 3780
 ggtcgcgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag 3840
 catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat 3900
 aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 3960
 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa 4020
 gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgccg 4080
 aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg 4140
 gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgtcggccc ttcgggtgg ctggtttatt 4200
 gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtg tcattgcagc actggggcca 4260
 gatggttaag cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 4320
 gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 4380
 gaccaagttt actcatatat acttttagatt gattttaaag ttcatTTTTA atttaaaagg 4440
 atctaggtga agatcccttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg 4500

```

ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt 4560
ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg 4620
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 4680
ccaaatactg tcctttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 4740
ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 4800
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 4860
tgaacggggg gttegtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 4920
tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaaa ggcgacagg 4980
tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaac 5040
gcctggtatc tttatagtc tgtcgggttt cgcacacctc gacttgagcg tcgatttttg 5100
tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgggc ctttttacgg 5160
ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttcttcc ctgcttacc cctgattct 5220
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc 5280
gagcgcagcg agtcagtga cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc 5340
cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccg ctagaaagcg 5400
ggcagtgaac gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta 5460
cactttatgc ttccggtctg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 5520
ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctgtaagttt aaacatgata ttactaacta 5580
actattctca tttaaatttt cagagcttaa aaatggctga aatcactcac aacgatggat 5640
acgctaacaa cttggaaatg aaataagctt gcatgcctgc agagcaaaaa aatactgctt 5700
ttccttgcaa aattcgggtc tttcttcaaa gagaaacttt tgaagtcggc gcgagcattt 5760
ccttctttga cttctctctt tccgccaaaa agcctagcat ttttattgat aatttgatta 5820
cacacactca gagttcttcg acalgataaa gtgtttcatt ggcactcgcc ctaacagtac 5880
atgacaaggg cggattatta tcgacgata ttgaagacaa actccaaatg tgtgctcatt 5940
ttggagcccc gtgtggggca gctgctctca atatatctact agggagacga ggagggggac 6000
cttatogaac gtcgcagtag ccattcttcc tcttttatgc actctcttca ctctctcaca 6060
cattaatcga ttcatagact cccatattcc ttgatgaagg tgtgggtttt tagctttttt 6120
tcccgatttg taaaaggaag aggcgtacga tgttaggaaa aagagaacgg agccgaaaaa 6180
acatccgtag taagtcttcc ttttaagccg acacttttta gacagcattc gccgctagtt 6240
ttgaagttaa aattttaaaa aataaaaatt agtttcaatt ttttttaatt actaaatagg 6300
caaaagtttt ttcaagaact ctagaaaaac tagcttaatt catgggtact agaaaaattc 6360
ttgttttaaa tttaatattt atcttaagat gtaattacga gaagcttttt tgaaaattct 6420
caattaaaag aatttgccga tttagaataa aagtcttcag aaatgagtaa aagctcaaat 6480
tagaagtgtg tttttaaagg aaaaacacga aaaaagaaca ctatttatct tttcctcccc 6540
gcgtaaaatt agttgttgtg ataatagtga tccgctgtct atttgcactc ggctcttcac 6600
accgtgcttc ctctcacttg acccaacagg aaaaaaaaa acacagctctg agacgggtga 6660
ttgccttacc aagagcgtcg tctctttcac ccagtaacaa aaaaaatttg gtttctttac 6720
tttatattta tgtaggtcac aaaaaaaaag tgatgcagtt ttgtgggtcg gttgtctcca 6780
caccacctcc gcctccagca gcacacaatc atcttctgtt gttctcgacg attccttgta 6840
tgccgcgggtc gtgaatgcac cacattcgac gcgcaactac acaccacact cactttcggg 6900
ggattacta cacgtcatcg ttgttcgtag tctccogctc tttcgtcccc actcactcct 6960
cattattccc cttggtgtat tgattttttt taaatggtag accactcctg acgtttctac 7020
cttcttgttt tccgtccatt tagattttat ctggaaattt ttttaaaatt ttaggccaga 7080
gagttctagt tcttgttcta aaagtctagg tcagacatac attttctatt tctcatcaaa 7140
aaaaaagttg ataaagaaaa ctggttattc agaaagagtg tgtctcgttg aaattgattc 7200
aaaaaaaaat tcccacctct cgcttgtttc tcaaaatatg agatcaacgg attttttcct 7260
tctcgattca attttttgct gcgctctgtc tgccaaagtg tgtgtgtccg agcaaaagat 7320
gagagaattt acaaacagaa atgaaaaaaa gttggccaaa taatgaagtt ttatccgaga 7380

```

```

ttgatgggaa agatattaat gttcttttacg gtttggaggg gagagagaga tagattttcg 7440
catcaaactc cgcctttttac atgtctttta gaatctaaaa tagatttttc tcatcatttt 7500
taatagaaaa tcgagaaatt acagtaattt cgcaattttc ttgccaaaaa tacacgaaat 7560
ttgtgggtct cggcacgata tcggtcttag tggttcattt ggtttaaaag tttataaaat 7620
ttcaaattct agtgtttaat ttccgcataa ttggacctaa aatgggtttt tgtcatcatt 7680
ttcaacaaga aatcgtgaaa atcctgttgt ttcgcaattt tcttttcaaa aatacacgaa 7740
atatatggta atttcccgaa atattgaggg tctcgccacg atttcagtca cagtggccag 7800
gattttatcac gaaaaaagtt cgcctagtct cacatttccg gaaaaccgaa tctaaattag 7860
ttttttgtca tcattttgaa caaaaaatcg agacatccct atagtttcgc aattttcgtc 7920
gcttttctct ccaaaaatga cagtctagaa ttaaaattcg ctggaactgg gaccatgata 7980
tcttttctcc ccgtttttca ttttattttt tattacactg gattgactaa aggtcaccac 8040
cacgccaggt gtgtgccata tcacacacac acacacacac aatgtcgaga ttttatgtgt 8100
tatccctgct tgatttctgt ccgttgtctc tctctctcta ttcattcttt gagccgagaa 8160
gctccagaga atggagcaca caggatcccg gcgcgcgatg tcgtcgggag atggcgccgc 8220
ctgggaagcc gccgagagat atcaggaag atcgtctgat ttctctcgg atgccacctc 8280
atctctcgag tttctccgcc tgttactccc tgccgaacct gatatttccc 8330

```

<210> 4

<211> 6470

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 4

```

aagcttgcat gcctgcaggg cttggctgac tctagacact tttcagctac ctagatacat 60
ggatatcccc gcctcccaat ccaccacccc agggaaaaag aagggtctgc cgaaaaatca 120
aagttatctc caggctcgcg catcccaccc agcggttgac ttctctccac cacttttcat 180
tttaaccctc ggggtacggg attggccaaa ggacccaaaag gtatgtttcg aatgatacta 240
acataacata gaacattttc aggaggaccc ttgcttggag ggtaccgagc tcagaaaaaa 300
tgactgtctc aaagaagaag cgtaaggtag cggtaatgaa cacgattaac atcgctaaga 360
acgacttctc tgacatcgaa ctggctgcta tcccgttcaa cactctggct gaccattacg 420
gtgagcgttt agctcgcgaa cagttggccc ttgagcatga gtcttaacgag atgggtgaag 480
cacgcttccg caagatgttt gagcgtcaac ttaaagctgg tgaggttgcg gataacgctg 540
ccgccaaagg tctcatcact accctactcc ctaagatgat tgcacgcac aacgactggt 600
ttgaggaagt gaaagctaag cgcggcaagc gcccgacagc cttccagttc ctgcaagaaa 660
tcaagccgga agccgtagcg tacatcacca ttaagaccac tctggcttgc ctaaccagtg 720
ctgacaatac aaccgttcag gctgtagcaa gcgcaatcgg tcggggccatt gaggacgagg 780
ctcgtctcgg tcgtatccgt gacctgaag ctaagcactt caagaaaaac gttgaggaac 840
aactcaacaa gcgcgtaggg cacgtctaca agaaagcatt tatgcaagtt gtcgaggetg 900
acatgctctc taagggtcta ctcggtggcg aggcgtggtc ttctgtggcat aaggaagact 960
ctattcatgt aggagtacgc tgcacgaga tgctcattga gtcaaccgga atggttagct 1020
tacaccgcca aaatgctggc gtagtaggtc aagactctga gactatcgaa ctgcacactg 1080
aatacgtgta ggctatcgca acccgtgcag gtgcgctggc tggcatctct ccgatgttcc 1140
aaccttgcgt agttcctcct aagccgtgga ctggcattac tgggtgtggc tattgggcta 1200
acggctcgtc tcctctggcg ctggtgcgta ctcacagtaa gaaagcactg atgcgctacg 1260
aagacgttta catgcctgag gtgtacaaag cgattaacat tgcgcaaaac accgcatgga 1320

```

aaatcaacaa gaaagtcccta gcggtcgcca acgtaatcac caagtggaag cattgtccgg 1380
 tcgaggacat ccctgcgatt gagcgtgaag aactcccgat gaaaccggaa gacatcgaca 1440
 tgaatcctga ggctctcacc gcgtggaaac gtgctgcgc tgctgtgtac cgcaaggaca 1500
 gggctcgcaa gtctcgccgt atcagccttg agttcatgct tgagcaagcc aataagtttg 1560
 ctaaccataa ggccatctgg ttcccttaca acatggactg gcgcggctgt gtttacgccg 1620
 tgtcaatgtt caaccgcaa ggtaacgata tgaccaaagg actgcttacg ctggcgaaag 1680
 gtaaaccaat cggtaaggaa ggttactact ggctgaaaat ccacgggtgca aactgtgcgg 1740
 gtgtcgataa ggttccgttc cctgagcgca tcaagttcat tgaggaaaac cagagaaca 1800
 tcatggcttg cgctaagtct ccactggaga acacttggtg ggctgagcaa gattctccgt 1860
 tctgcttcct tgcgttctgc tttaggtacg ctggggtaca gcaccacggc ctgagctata 1920
 actgctccct tccgctggcg tttagcgggt cttgctctgg catccagcac ttctcccgga 1980
 tgctccgaga tgaggtaggt ggtcgcgcgg ttaacttgtt tcctagttag accgttcagg 2040
 acatctacgg gattgttgtt aagaaagtca acgagattct acaagcagac gcaatcaatg 2100
 ggaccgataa cgaagttagt accgtgaccg atgagaacac tggtgaaatc tctgagaaag 2160
 tcaagctggg cactaaggca ctggctgggc aatggctggc tcacgggtgtt actcgagtg 2220
 tgactaagcg ttcatgcatg acgctggctt acgggtccaa agagttcggc ttccgtcaac 2280
 aagtgtctga agataccatt cagccagcta ttgattccgg caagggtccg atgttctact 2340
 agccgaatca ggctgtctga tacatggcta agctgatttg ggaatctgtg agcgtgacgg 2400
 tggtagctgc ggttgaagca atgaactggc ttaagtctgc tgctaagctg ctggctgtg 2460
 aggtcaaaga taagaagact ggagagattc ttcgcaagcg ttgcgctgtg cattgggtaa 2520
 ctctgatgg tttccctgtg tggcaggaat acaagaagcc tatcagacg cgcttgaaac 2580
 tgatgttctt cggctcagttc cgcttacagc ctaccattaa caccaacaaa gatagcgaga 2640
 ttgatgcaca caaacaggag tctggtatcg ctcttaactt tgtacacagc caagacggtg 2700
 gccaccttcg taagactgta gtgtgggcac acgagaagta cggaaatcgaa tcttttgac 2760
 tgattcacga ctcttcgggt accattccgg ctgacgctgc gaacctgttc aaagcagtg 2820
 gcgaaactat ggttgacaca tatgagttct gtgatgtact ggctgatttc taogaccagt 2880
 tcgctgacca gttgcacgag tctcaattgg acaaatgcc agcacttccg gctaaaggta 2940
 acttgaacct ccgtgacatc ttagagtcgg acttcgcgtt cggctaagaa ttccaactga 3000
 gcgcgggtcg ctaccattac caacttgtct ggtgtcaaaa ataatagggg ccgctgtcat 3060
 cagagtaagt ttaactgag ttctactaac taacgagtaa tatttaaatt ttcagcatct 3120
 cgcgcgcgtg cctctgactt ctaagtccaa ttactcttca acatccctac atgtctcttc 3180
 tcctgtgtct cccacccctt atttttgtta ttatcaaaaa aacttcttct taatttcttt 3240
 gttttttagc ttcttttaag tcacctctaa caatgaaatt gtgtagattc aaaaatagaa 3300
 ttaattcgta ataaaaagtc gaaaaaaatt gtgctccctc ccccatctaa taataattct 3360
 atcccaaat ctacacaatg ttctgtgtac acttcttatg ttttttttac ttctgataaa 3420
 ttttttttga aacatcatag aaaaaaccgc acacaaaata ccttatcata tgttacgttt 3480
 cagtttatga ccgcaatttt tttttcttcg cacgtctggg cctctcatga cgtaaatca 3540
 tgctcatcgt gaaaaagttt tggagtattt ttggaatttt tcaatcaagt gaaagtttat 3600
 gaaattaatt ttctgctttt tgcttttttg gggtttcccc tattgtttgt caagagtttc 3660
 gaggacggcg tttttcttgc taaaatcaca agtattgatg agcacgatgc aagaaagatc 3720
 ggaagaaggt ttgggtttga ggctcagtg aaggtgagta gaagttgata atttgaaagt 3780
 ggagtagtgt ctatggggtt ttgctcttaa atgacagaat acattcccaa tataccaaac 3840
 ataactgttt cctactagtc ggccgtacgg gccctttcgt ctgcgcgctt tcggtgatga 3900
 cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct tgtaagcgga 3960
 tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg 4020
 gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatagtc ggtgtgaaat 4080
 accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgg ccttaagggc ctctgtatgc 4140
 gcctatTTTT ataggttaat gtcagtataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt 4200

```

ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctatctt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 4260
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 4320
tgagtattca acatttccgt gtgcgccctta ttcctttttt tgcggcattt tgccttcctg 4380
tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac 4440
gagtggttta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt ttccgccccg 4500
aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc 4560
gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg 4620
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg catgacagta agagaattat 4680
gcagtgtctg cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg 4740
gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg 4800
atcgttgagg acccgagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc 4860
ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt 4920
cccggaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct 4980
cgcccttcc ggctggctgg tttattgtct ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc 5040
gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca 5100
cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct 5160
cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt 5220
taaaacttca tttttaatct aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga 5280
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 5340
aaggatcttc ttgagatcct tttttctgct gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac 5400
caccgctacc agcgggtggt tgtttgcgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 5460
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag 5520
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 5580
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 5640
taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg 5700
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa agcggccagc 5760
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc 5820
gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgctt ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc 5880
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa 5940
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 6000
tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgcgtg 6060
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagatc agtgagcgag gaagcggaag 6120
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgccg gattcattaa tgcagctggc 6180
acgacaggtt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 6240
tactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 6300
ttgtgagcgg ataacaatct cacacaggaa acagctatga coatgattac gccagctgt 6360
aagtttaaac atgatcttac taactaacta ttctcattta aattttcaga gcttaaaaaat 6420
ggctgaaatc actcacaacg atggatagcg taacaacttg gaaatgaaat 6470

```

<210> 5

<211> 4689

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 5

aagcttgcat gcoctgcaggc cttgggtcgac tctagacact tttcagctac ctagatacat 60
ggatatcccc gcoctcccaat ccacccaccc agggaaaaag aagggtctcg cgaaaaatca 120
aagttatctc caggctcgcg cateccaccg agcgggtgac ttctctccac cacttttcat 180
tttaaccctc ggggtacggg attggccaaa ggacccaaag gtatgtttcg aatgatacta 240
acataacata gaacattttc aggaggaccc ttgcttgagg ggtaccgagc tcccgggatt 300
aatacgactc actataccgg tagaasaaat gagtaaagga gaagaacttt tccctggagt 360
tgtcccaatt cttgttgaat tagatgggtga tgttaatggg cacaaatttt ctgtcagtgg 420
agagggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa acttaccctt aaattttatt gcactactgg 480
aaaactacct gttccatggg taagttaaaa catatatata ctaactaacc ctgattattt 540
aaattttcag ccaacacttg tccactactt ctgttatggg gttcaatgct tctcgagata 600
cccagatcat atgaaacggc atgacttttt caagagtggc atgcccgaag gttatgtaca 660
ggaaagaact atatttttca aagatgacgg gaactacaag acacgtaagt ttaaacagtt 720
cggtaactaa taaccataca tatttaaatt ttcagggtgt gaagtcaagt ttgaagggtga 780
tacccttggt aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct 840
tggacacaaa ttggaatata actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaaca 900
aaagaatgga atcaaagttg taagtttaaa catgatttta ctaactaact aatctgattt 960
aaattttcag aacttcaaaa ttagacacaa cattgaagat ggaagcgttc aactagcaga 1020
ccattatcaa caaaatactc caattggcga tggccctgtc cttttaccag acaaccatta 1080
cctgtccaca caatctgcc tttcgaaaga tcccacgaa aagagagacc acatggctct 1140
tcttgagttt gtaacagctg ctgggattac acatggcatg gatgaactat acaaatagca 1200
ttcgtagaat tccaaactgag cgcgggtcgc taccattacc aacttgtctg gtgtcaaaaa 1260
taaatagggc cgctgtcatc agagtaagtt taaactgagt tctactaact aacgagtaat 1320
atttaaatat tcagcatctc gcgcccgtgc ctctgacttc taagtccaat tactcttcaa 1380
catccctaca tgctctttct cctgtgctc ccaccccta tttttgttat tatcaaaaaa 1440
acttcttctt aatttctttg ttttttagct tcttttaagt cacctctaac aatgaaattg 1500
tgtagattca aaaatagaat taattogtaa taaaaagtcg aaaaaaattg tgctccctcc 1560
ccccattaat aataattcta tcccaaaatc tacacaatgt tctgtgtaca cttcttatgt 1620
tttttttact tctgataaat ttttttgaa acatcataga aaaaaccgca cacaaaatac 1680
cttatcatat gttacgtttc agtttatgac cgcaattttt atttcttcgc acgtctgggc 1740
ctctcatgac gtcaaatcat gctcatcgtg aaaaagtttt ggagtatttt tggaattttt 1800
caatcaagtg aaagtttatg aaattaattt tccgtctttt gctttttggg ggtttccctt 1860
attgtttgtc aagagtttcg aggacggcgt tttcttctgt aaaatcaca gtattgatga 1920
gcacgatgca agaaagatcg gaagaagggt tgggtttgag gctcagtggg aggtgagtag 1980
aagtgataa tttgaaagtg gagtagtgct tatgggggtt ttgccttaa tgacagaata 2040
cattcccaat ataccaaaaca taactgtttc ctactagtcg gccgtacggg ccctttcgtc 2100
tcgcgcgttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 2160
cagcttgctt gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcaggcgcg tcagcgggtg 2220
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 2280
accatatgcy gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcggc 2340
cttaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatgggtttt 2400
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 2460
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 2520
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 2580
gcggcatttt gccttccctgt ttttgcctac ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct 2640
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaaactg atctcaacag cggttaagatc 2700
cttgagagtt ttcgccccga agaactgttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 2760
tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 2820
tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 2880

```

atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac 2940
ttactttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3000
gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3060
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3120
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3180
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 3240
gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3300
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3360
atcgctgaga taggtgcctc actgattaag catttggaac tgtcagacca agtttactca 3420
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 3480
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca 3540
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 3600
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca ggggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 3660
ccaactcttt ttccgaaggc aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 3720
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacttc 3780
gctctgctaa tctgtttacc agtggtgct gccagtggtg ataagtcgtg tcttaccggg 3840
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg 3900
tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 3960
cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggc agaaaggcgg acaggatatc ggtaagcggc 4020
agggctcgaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 4080
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctgcaggg 4140
gggcgagacc tatggaaaaa cgcagcaac ggggcctttt tacggttctt ggccttttgc 4200
tggccttttg ctccatgtt ctttctgctg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 4260
accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 4320
gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg 4380
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 4440
gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacctt tatgcttccg 4500
gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 4560
catgattacg ccaagctgta agtttaaaaca tgatcttact aactaactat tctcatttaa 4620
attttcagag cttaaaaatg gctgaaatca ctcaaacga tggatacgtc aacaacttgg 4680
aatgaaat 4689

```

<210> 6

<211> 5175

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 6

```

gatcccggcg cgcgatgtcg tcgggagatg gcgcgcctg ggaagccgcc gagagatata 60
agggaagatc gtctgatttc tctcggatg ccacctcacc tctcgagttt ctccgcctgt 120
tactccctgc cgaacctgat atttcccgtt gtcgtaaaga gatgttttta ttttacttta 180
caccgggtcc tctctctctg ccagcacagc tcagtgttgg ctgtgtgctc gggctcctgc 240
caccggcggc ctcatcttct tcttcttctt ctctcctgct ctgccttacc acttcttcat 300
tcattcttat tctttttcat catcaaaacta gcatttctta ctttatttat ttttttcaat 360
tttcaatttt cagataaaac caaactactt ggggttacagc cgtcaacaga tccccgggat 420

```

tggccaaagg acccaaaggt atgtttcgaa tgatactaac ataacataga acatttttcag 480
 gaggaccctt gcttggaggg taccggtaga aaaaatgagt aaaggagaag aactttttcac 540
 tggagttgtc ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aatgggcaca aattttctgt 600
 cagtggagag ggtgaagggt atgcaacata cggaaaactt acccttaaat ttatttgcac 660
 tactggaaaa ctacctgttc catgggtaag tttaaacata tatatactaa ctaaccctga 720
 ttattttaa at tttcagccaa cacttgtcac tactttctgt tatgggtgtc aatgcttctc 780
 gagataccca gatcatatga aacggcatga ctttttcaag agtgccatgc ccgaagggtta 840
 tgtacaggaa agaactatat ttttcaaaga tgacgggaac tacaagacac gtaagtttaa 900
 acagttcggg actaactaac catacatatt taaattttca ggtgctgaag tcaagtttga 960
 aggtgatacc cttgttaata gaatcgaggt aaaagggtatt gatttttaaag aagatggaaa 1020
 cattcttggg cacaaattgg aatacaacta taactcacac aatgtatata tcatggcaga 1080
 caaacaagg aatggaatca agttgtgaag tttaaacttg gacttactaa ctaacggatt 1140
 atattttaa at tttcagaact tcaaaattag acacaacatt gaagatggaa gcgttcaact 1200
 agcagaccat tatcaacaaa atactccaat tggcgtatgg cctgtccttt taccagacaa 1260
 ccattacctg tccacacaat ctgccctttc gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat 1320
 ggtccttctt gagttttaa cagctgctgg gattacacat ggcatggatg aactatacaa 1380
 atagcattcg tagaattcca actgagcgcc ggtcgctacc attaccaact tgtctggtgt 1440
 caaaaataat aggggcccgt gtcacagag taagttttaa ctgagttcta ctaactaacg 1500
 agtaatat t aaattttcag catctcgcc cgtgcctct gacttctaag tccaattact 1560
 cttcaacatc cctacatgct ctttctccct gtgctccac cccctatttt tgttattatc 1620
 aaaaaaactt cttcttaatt tctttgtttt ttagcttctt ttaagtcacc tctaacaatg 1680
 aaattgtgta gattcaaaaa tagaattaat tcgtaataaaa aagtcgaaaa aaattgtgct 1740
 cccctcccc attataata atctatccc aaaaatctaca caatgttctg tgtacacttc 1800
 ttatgttttt tttacttctg ataaattttt tttgaaacat catagaaaa accgcacaca 1860
 aaatacotta tcatatgtta cgtttcagtt tatgaccgca atttttat tttctgcacgt 1920
 ctgggcctct catgacgtca aatcatgctc atcgtgaaaa agttttggag tatttttggg 1980
 atttttcaat caagtgaag tttatgaaat taattttctt gcttttgcct tttgggggtt 2040
 tccctatttg tttgtcaaga gtttcgagga cggcggtttt cttgctaaaa tcacaagtat 2100
 tgatgagcac gatgcaagaa agatcggaag aaggtttggg tttgaggctc agtgggaagg 2160
 gagtagaagt tgataatttg aaagtggagt agtgtctatg gggtttttgc cttaaatgac 2220
 agaatacat cccaatatac caaacataac tgtttcctac tagtcggccg tacgggcccg 2280
 gtaccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca 2340
 tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacaacat acgagccgga 2400
 agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg 2460
 cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 2520
 caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttctc gctcactgac 2580
 tcgctgcgct cgtgcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaa ggcggtata 2640
 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 2700
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 2760
 gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagagggtggc gaaaccgcac aggactataa 2820
 agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctgctgcgct ctctgttcc gacctgccc 2880
 cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 2940
 cgctgtagg atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa 3000
 cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaaat atcgtcttga gtccaaccg 3060
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 3120
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaagg 3180
 acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 3240
 tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag 3300

```

attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 3360
gctcagtggg acgaaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc 3420
ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag tatatatgag 3480
taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtggag cacctatctc agcgatctgt 3540
ctatttcgtt catccatagt tgccgtgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 3600
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca 3660
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact 3720
ttatccgctt ccacccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 3780
gttaatatgt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tctgtgtgtc acgctcgtcg 3840
tttgggtatg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 3900
atgttggtga aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tctgtgtcag aagtaagttg 3960
gccgcagtgt tatcactcat gggtatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca 4020
tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 4080
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 4140
agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 4200
ttaccgctgt tgagatccag ttgatgtaa cccactcgtg caccactg atcttcagca 4260
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 4320
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat 4380
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa 4440
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctaa attgtaagcg 4500
ttaatatatt gttaaaattc gcgttaaat tttgttaaat cagctcattt ttaaccaat 4560
aggcggaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagt 4620
ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc 4680
gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc atcacctaa tcaagttttt 4740
tggggtcgag gtgccgtaaa gcaactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag 4800
cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggagg gaagaaagcg aaaggagcgg 4860
gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtc cgctgcgctg aaccaccaca cccgccgcgc 4920
ttaatgcgcc gctacagggc gcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag 4980
ggcgatcggt gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgtgcaa 5040
ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca 5100
gtgagcgcgc gtaatacgac tcaatatagg gcgaattgga gctccaccgc ggtggcggcc 5160
gctctagaac tagtg                                     5175

```

<210> 7

<211> 12482

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 7

```

gatcctccaa aatcgtcttc cgctctgaaa aacgaaagtg gacctttgac atccgaaaaa 60
atgggcgaaa aatgaaatt gagctttttg ggtcgaaaaa aatgttttta gaatgctgag 120
aacacgttaa acacgaagat catatttatt ttgagaccgg gatgctctga aaatgtctga 180
catagattta aaaaagcata tatatatatt tcattttcaa cgtgaaagtt ttgtgcaact 240
ttatagaatc tcctattggc acattgtttt ttatttaact gaggcagttt ttgaacacct 300
ttttgaaact ttgaatctct ttgaagtata ctgtcgaaaa gactgacttg agcgttcgaa 360

```

ES 2 320 527 T5

atgccagaag aaaactatat ttgaatctcg cgctaaattg agaaatgcaa ccgcgctcca 420
 ctggacaatt ggaaaaaaaaa ttatttcgga ggcgacaacg gtattttcga aattgatttt 480
 ctgtgtattt tctcattttt tataaattct tctttgattt atcgttcgtt tgtgagaaat 540
 ttaattgtat tcaaaccttt ttatagtaag ataccggtgg taccgctagc cgtacgaacc 600
 cgggattggc caaaggaccc aaaggtatgt ttogaatgat actaacataa catagaacat 660
 ttccaggagg acccttgctt ggagggtacc ggatgactgc tccaaagaag aagcgttaagc 720
 tcatgaacac gattaacatc gctaagaacg acttctctga catcgaactg gctgctatcc 780
 cgttcaacac tctggctgac cattacgggtg agcgttttagc tcgcgaacag ttggcccttg 840
 agcatgagtc ttacgagatg ggtgaagcac gcttcgcga gatgtttgag cgtcaactta 900
 aagctggtga ggttcgggat aacgctgccg ccaagcctct catcactacc ctactcccta 960
 agatgattgc acgcatcaac gactggtttg aggaagtga agctaagcgc ggcaagcgcc 1020
 cgacagcctt ccagttcctg caagaaatca agccggaagc cgtagcgtac atcaccatta 1080
 agaccactct ggcttgcccta accagtgtctg acaatacaac cgttcaggct gtagcaagcg 1140
 caatcggtcg ggccattgag gacgaggtc gcttcggtcg tatcgtgac cttgaagcta 1200
 agcacttcaa gaaaaacgtt gaggaacaac tcaacaagcg cgtagggcac gtctacaaga 1260
 aagcatttat gcaagtgtc gaggtgaca tgctctctaa gggctctactc ggtggcgagg 1320
 cgtggtcttc gtggcataag gaagactcta ttcattgtagg agtacgctgc atcgagatgc 1380
 tcattgagtc aaccggaatg gttagcttac accgccaaaa tgctggcgta gtaggtcaag 1440
 actctgagac tatcgaactc gcacctgaat acgctgaggc tatcgcaacc cgtgcagggtg 1500
 cgctggctgg catctctccg atgttccaac cttgcgtagt tctctctaag ccgtggactg 1560
 gcattactgg tgggtgctat tgggctaacg gtcgtcgtcc tctggcgctg gtgcgtaactc 1620
 acagtaagaa agcactgatg cgctacgaag acgtttacat gcctgagggtg taaaaagcga 1680
 ttaacattgc gaaaaacacc gcatggaaaa tcaacaagaa agtcctagcg gtgcgcaacg 1740
 taatcaccaa gtggaagcat tgtccggtcg aggacatccc tgcgattgag cgtgaagaac 1800
 tcccgatgaa accggaagac atcgacatga atcctgaggc tctcacccgc tggaaacgtg 1860
 ctgcgcgtgc tgtgtaccgc aagacaaggc tcgcaagtct cgcggtatca gccttgagtt 1920
 catgottgag caagccaata agtttgctaa ccataaggcc atctgggtcc cttacaacat 1980
 ggactggcgc ggttcgtgtt tacgctgtgt caatgttcaa ccgcgaaggt aacgatatga 2040
 ccaaaaggacg tcttacgctg gcgaaaggta aaccaatcgg taaggaaggt tactactggc 2100
 tgaatatcca cgggtgcaaac tgtgcgggtg tcgataaggt ttcgtttcct gagcgcatca 2160
 agttcattga ggaaaaccac gagaacatca tggcttcgcg taagtctcca ctggagaaca 2220
 cttggtgggc tgagcaagat tctccgttct gcttccttgc gttctgcttt gagtacgctg 2280
 ggttacagca ccacggcctg agctataact gctcccttcc gctggcggtt gacgggtcct 2340
 gctctggcat ccagcacttc tccgcgatgc tccgagatga ggtagggtgt cgcgcggtta 2400
 acttgcttcc tagtgaaacc gttcaggaca tctacgggat tgttgctaag aaagtcaacg 2460
 agattctgca agcagacgca atcaatggga ccgataacga agtagttacc gtgaccgatg 2520
 agaacactgg tgaaatctct gagaaagtca agctgggcac taaggcactg gctggtcaat 2580
 ggctggctta cgggtgtact cgcagtgtga ctaagcgttc agtcatgacg ctggcttacg 2640
 ggtccaaaga gttcggcttc cgtcaacaag tgctggaaga taccattcag ccagctattg 2700
 attccggcaa ggtctgatg ttcactcagc cgaatcaggc tgctggatac atggctaagc 2760
 tgatttgga atccgtgagc gtgacgggtg tagctgcggt tgaagcaatg aactggctta 2820
 agtctgctgc taagctgctg gctgctgagg tcaaagataa gaagactgga gagattcttc 2880
 gcaagcgttg cgctgtgc at tgggtaactc ctgatggttt ccctgtgtgg caggaataca 2940
 agaagcctat tcagacgcgc ttgaacctga tgttcctcgg tcagttccgc ttacagccta 3000
 ccattaacac caacaaagat agcgagattg atgcacacaa acaggagtct ggtatcgctc 3060
 ctaactttgt acacagccaa gacggtagcc accttcgtaa gactgtagtg tgggcacacg 3120
 agaagtacgg aatcgaatct tttgcactga ttacgactc cttcgggtacc attccggctg 3180
 acgctgcgaa cctgttcaaa gcagtgcgcg aaactatggt tgacacatat gagtcttgtg 3240

atgtactggc tgattttctac gaccagttcg ctgaccagtt gcacgagtct caattggaca 3300
 aaatgccagc acttccggct aaaggtaact tgaacctccg tgacatctta gagtccgact 3360
 tcgctgtcgc gtaagggccc tcgtcgagtc ggtcacaatc acctgaaact ccaaaggcag 3420
 ccagtggagg acgtgaagaa gaagaaaaag agtcactctga acaggtttga ttttctttct 3480
 ggtcaaaaag atgaaattat tgattttcag ccagatactc ccaaaactag cagcgagaag 3540
 tctgcaagtc gttcacagtc gccagagaa tcgcggggaa tgagccaaga ggtatgtttt 3600
 tcaaaaatca ataactgac ataattttta ttgtttgtg aatttaagaa aataatattc 3660
 gaaaattcct ctgaattatc aagattgcag tattaatttc gagaaaaatt gagatattca 3720
 tagagctatt gtaaattttc ttgatttcag actgaaactt cggaaaatca agagaaaatc 3780
 aaagaaaagg atgacgggga tgatcagcct ggcacaccga acagctatag aagccgggaa 3840
 acttcaccag ctccaaaaag gtccaaggag accaggtttg tcaaaagctt cctgcgatta 3900
 atttctcatt caatttttca gagaatcaga gtctcctgaa aaatccccgg ttcgttcaag 3960
 atctcccaga aggtcttcag caggttcccc gtcacgatct cctagacggc gccgagaaa 4020
 aagctcagaa agaaagcaat ccgaagagcc agcaccgcta ccagagaaaa agaagaaaga 4080
 gccgtggat attctacgaa caagaaccgg aggagcatat attccaccgg ccaaaacttcg 4140
 acttatgcaa caacagatta gtgataagca aagtgaacag tatcagagaa tgaattggga 4200
 aagaatgaag aaaaagattc acggattggg taacagagtc aacgcgaaga atcttgttca 4260
 aattgtcaga gaacttcttc aagagaatgt gattcgttca aagtgagtga gaaaatcgaa 4320
 ggaaaaggaa agaattaatt taatttttca ggggacttct ctgccgtgac attattcaag 4380
 ctcaggcttt ctcaccagga ttctctaacg tctatgcagc tttggcggca gttatcaact 4440
 cgaaattccc tcatgtcggg gaacttcttc tccgtcgtct gattgtacag ttcaaaaaga 4500
 gtttccgtag aaatgacaga gggtcacgg tgaacgtgat caaattcctc gcacatttga 4560
 ttaatcaaca agttgctcac gaagtctctg cgtgggaaat catgattctg atgcttgaag 4620
 aaccaactga tgattcagtt gaagtgcgca ttgcttcctt gaaagagtgt ggagcaaaagc 4680
 ttctggagat tgctccagca gctcttaaca gtgtctacga ccgtcttcgt gcaattctca 4740
 tggaactga aagatcgaa aatgcactgg atcgacgtat tcagtatatg attgagactg 4800
 caatgcagat tcgaaaggac aaatttgcgg taaggtagaa tatataaata gtttattaga 4860
 aaaaaataaa ttagaataat ttaaatcct actagccaat caggcgacct ttttgcgcct 4920
 agttctatta ttgaaaaatt tggagaattt ctcataattc cgtcgggaa tctggaattc 4980
 gacgagatct tctggcttct gtgcagctgc atcgtttgt gctcccttct tcgcttgtct 5040
 tctgtgtaca ccaagaacct tgttgagttc atcaactgaa tctgtgactg gcttgttct 5100
 cactggatgc actagacgac tgattctcga gaaatcagat tgagttgcga ttagggtgac 5160
 ctagaatttg ggaataatac gaacttttga aaatattcag gaggattaaa aaaattattc 5220
 tcgacaatcc tacaaattta cttattgcac catgttgctc caacattttt cattaaaagt 5280
 taatgaaaaa atgtagaaaa tcggaatttg gcaattttca gaccattttt aagcattttc 5340
 aaaaaaaaat tgcagctgaa ataaatgtca ttttcagata aatcgagcga tttttgttg 5400
 tctgacacta gtttttagtt ttaaaaaatg ttggaagaac atggtgcaat aggtaatttc 5460
 atagaatttc catgtgtttt ttttcaatta accaattatc caaatcttcc aaactcacat 5520
 tttgcggagc tgggctatca agaactctgt gcagttttat aagacgagca tctotgatat 5580
 cactgaaaaa taatttttaa tcaaaacttg aatatcaact aaaccaactt attaaacttc 5640
 tcgatcttct gtggttcggg acgatgacgg tgaagaagcc aattgtagta gttgatttgg 5700
 ttcaagctct ttoggtgttg tacgtcagtg tctgcaatg ctatttagtt ataacttagg 5760
 cctaagattc aatttaatga agtgattaaa ttgttctct gaacctctta agatgatctt 5820
 ttggattaga aacatataag acaggtttac ctatctatta aaaaacagat caaaatagat 5880
 acgaccaaat cggataatcc atgcctacct ggcactatag aacgtgttct tagaagattt 5940
 cttacgtaat cgtatgaaga aataacaatt tgatcgttgg ccagcaaaaa tagggtttta 6000
 agtgggatag tgtttttatt agctaaccgg aaaattttat agttttttt tgcaagaaac 6060
 cactgaaaac ccctaatgtg tatacatttt ttggagcagc ttctggtctt ttgagcaat 6120

```

aaaattcgat aaaacagaat ttaagtgtaa attgttcaca tttagtttct attttatcaa 6180
attttggtgc tcaaaaacat tcgaagctgc totaaaaaaa tgcattaaaa aaggggtttt 6240
cagtggtttt tcacattaaa aaagctaatt ttaactaaaa atcoatcata tttccaactt 6300
tgtcacaaca ataaaatgct ggtcaaaatg tgttcgaaaa aatgtttttt tttttaattt 6360
ttataattta aaaatagttt tctttcgctg ggacacatac atttttgggc gtaaattttc 6420
agtcaaaatt tccattttta caaccataat cataaagcta cgtctgatct ctctcgact 6480
tacctgcgcc tgattcgaaa gaacaaccgt agccaaaaga acaagaagaa caagcacgta 6540
gttggtgtag tggacgttca tcacgcaata ctgaccaatg gtcgtggggt ctcaactttc 6600
gtactattga gagaggggag actgaagatg gcaattgagg acagtgtctt cgacgcacgc 6660
atgcatccat aagcataatc caggagggat ggagagaaaa atcttgtttc taagcccttc 6720
cctttgtaat acatacacat atctaatacc gaagaatggc taattgaatg gacgtcagct 6780
gttgctgtag ttgccaaaggc atcatcgatg aaataactga aagaagaatg taaataatta 6840
ttgcaggcgt atccggcggg cattgaagac ttggacttga ttgaggagga ggatcagatc 6900
atccatacac ttaatttga ggatgcggtt gatccgaaa atgggcttag taagtactg 6960
accacacgcg gggggcatta atttaataaa ttgaattcca tttcagatgt gttcaacta 7020
gatccagaat tcgaaaagaa cgaggagggt tatgaggaga tccgtaagga aatcatttga 7080
aacgcgcgata tttcgatga ggatggtggc gacgagttgg atgatgaaga agagggtagt 7140
gatgtggaag aggtccgaa gaagactaca gagattattg ataatactga tcagaattga 7200
ctgctttcag aaggatttca ttttgagttt tgggcccggca aatctgtaag ttgccggtt 7260
ccgaaaattt gctgaatttg ccgaaaaaaa aaattccgga atttatttaa aaactttttg 7320
taaaaattaa attaaatttg caacttttca gagaagtcta cctgacaatg caatcatctt 7380
tggactacca agaagctgct cacaatttgc tgaaaatgaa gattccagac agcatgcagg 7440
tcagcgatgt tgcaaagaaa aattttcgac caaaaaaacc aaccaatcat aaaattttaa 7500
aaaaaactcc gtttttttct ttttttttat acgagaaaaa ccaaaaaaat gtatttttgc 7560
caaattctaa aatactatcc ccgaaatttt caatattttc tctttcagaa cgaactctgc 7620
gcgatgcttg tcgattgttg tgctcaacag cgtacctacg agcgattcta cggaatgctc 7680
atcgaaactt tctgccgact tcgcctcgaa taccagcaat actttgaaaa gctctgccag 7740
gacacgtatt ccacgattca ccgaattgac atcacaaaac tgcggaattt ggctcgctt 7800
attgctcatt tgctctcgac ggatgctatt gactggaaga ttttgccga tatgaaaatg 7860
accgaagagg acacaacttc ttctggcaga atctatatta aatataatg taatgaactt 7920
gtggaggcga tgggaatggt taaacttcat tcgagagtta ctgatccgtg agtttcttag 7980
agagagttgt tttcgtattc aattttccct attttcagaa ctttggtca ttgctttgtt 8040
ggattattcc cactgaacta tccgaacagc gcacgatttt cgatcaactt cttcacaatg 8100
attggatttg gtggtttgac gttggaactt cgtgaatggc tggcaaaggg totcaagaag 8160
aagaagggaa tgctggatca gttgaaggcc gaatcaagct cagattcctc gtctcttcg 8220
gattcgctcag actcgtctga ttcttcggat tctgacgatt catccgactc gtcttcagat 8280
tctcatctt cttcagaatc agagccagaa ccaccgaaga aaaagaagaa gaagaacagt 8340
gaagagaggt caaaaaagaa ggaaaaagag aatattggtc gacgggatcg tggagacaag 8400
agagctgaac gtcactgtga tcaaagtgtg gagaacaagg acaaggatcg tcgacgtcgc 8460
caggattctg acgaaaatcg tcggccagaa cgaggagatg accgcaagga tcggagttaa 8520
gatcgtcgtc gtcaagactc ggatgatgag gatcggaaa gtcgtgaacg tcgggaagat 8580
tcaggggaaa gacgtcgcgg agatcgggat cgacgtgatc gaaacaagga tcaggaggat 8640
cacctgaaag atcgccgtga ccgaagcaag gatcgtgagg atcgacgtga tcgccgtcgt 8700
catgactctg atgatgatcg taaaactcgt cgggatagaa gtgaagagcg aggaggacgt 8760
cgtcgtgaag tggaaatcgga tgatcgacgc cgacgtcgtt gaattttcaa attttaata 8820
ctgaatatct gtttttttct ctattattta tttattctct ttgtgttttt tttcttgctt 8880
tctaaaaaat taattcaatc caaatctaaa catgagcggg tttttttctc tttcgtctc 8940
ccaattcgta ttccgctcct ctcatctgaa cacaatgtgc aagtttattt atottctcgc 9000

```

```

tttcatttca ttaggacgtg gggggaattg gtggaagggg gaaacacaca aaaggatgat 9060
ggaaatgaaa taaggacaca caatatgcaa caacattcaa ttcagaaata tggaggaagg 9120
tttaaaagaa aacataaaaa tatatagagg aggaaggaaa actagtaaaa aataagcaaa 9180
gaaattagggc gaacgatgag aattgtcttc gcttggcaaa tgcgaatccg tatggagagg 9240
cacgtttggc gaaggcaaat gttcggtagt gagatctgta aaaattttta agttgaaatt 9300
tgggtgttgc tttttacaaa attttccgat ttctgcttga aattacgggtg ccagggtctcg 9360
acacgtcttc caatttttca aattcaaaag agcctttaat gggctgtagt tgctaatttc 9420
tcgtttttga aaatttttct tccgtttaat cgaaatttga tgtattttat ttatgatttt 9480
caataaattt caaagaaaact ggtgaaaact cggaaaattg tgaactacag taatocaatc 9540
cttaaaaggcg cacacctttt aaatgtccgc cccaatacga tattttttta agattcgcga 9600
gagcgggcgc caccgcggtg gagctccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaattca 9660
ctggcgcgtg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc 9720
cttgacgac atccccctt cgcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 9780
ccttcccaac agttgcgtag cctgaatggc gaatgggacg cgcctgtag cggcgatta 9840
agcggggcgg gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg 9900
cccgtcctt tcgttttctt ccttccctt ctcgccacgt tcgcgggtt tcccgtcaa 9960
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttaacgga cctcgacccc 10020
aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgcctgata gacggttttt 10080
cgccctttga cgttggagtc cacgttctt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca 10140
aactcaacc ctatctcgtt ctattctttt gatltataag ggattltgcc gatttcggcc 10200
tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta 10260
acgtttacaa tttcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 10320
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcagtacac aataaccctg ataaatgctt 10380
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 10440
ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa 10500
gatgtgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt 10560
aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 10620
ctgctatgtg gcgggttatt atccgttatt gacgcggggc aagagcaact cggtcgcgcg 10680
atacactatt ctacgaatga cttggttag tactaccag tcacagaaaa gcatcttacg 10740
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa gcatgagtga taacactgcg 10800
gccaacttac tctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgctt tttcacaac 10860
atgggggac atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 10920
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 10980
actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 11040
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc ctccggctg gctggtttat tgctgataaa 11100
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 11160
ccctcccgta tcgtagtat ctacacgacg ggcagtcagg caactatgga tgaacgaaat 11220
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggttaactgtc agaccaagtt 11280
tactcatata tacttttagt tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg 11340
aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 11400
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 11460
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 11520
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 11580
gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtacg accgcctaca 11640
tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 11700
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggctcggg ctgaacgggg 11760
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 11820
cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta 11880

```

ES 2 320 527 T5

```

agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc caggggggaa cgcctggtat 11940
ctttatagtc ctgtcgggtt tggccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 12000
tcaggggggc cgagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttaag gttcctggcc 12060
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 12120
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 12180
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct 12240
tgcccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag 12300
cgcaacgcaa ttaatgtgag ttacctcact cattagcac cccaggcttt acactttatg 12360
cttcggctc ctatgttggt tgggaattgt agcggataac aatttcacac aggaaacagc 12420
tatgaccatg attacgcaa gctcggaatt aaccctcact aaaggaaca aaagctggg 12480
gg 12482

```

<210> 8

<211> 7209

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 8

```

gatccgtcga cagatctccc tatagtgagt cgtattactg cagccaagct aattccgggc 60
gaatttctta tgatttatga tttttattat taaataagtt ataaaaaaaa taagtgtata 120
caaattttta agtgactctt aggtttttaa acgaaaattc ttgttcttga gtaactcttt 180
cctgtaggte aggttgcttt ctcaggata gcatgaggtc gctcttattg accacacctc 240
taccggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 300
ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 360
taatgagtga ggttaactcac attaatggcg ttgcgctcac tgcccgcctt ccagtcggga 420
aacctgtcgt gccagctgga ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgct 480
attgggcgct ctcccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 540
cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 600
gcaggaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 660
ttgtggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 720
agttagaggt ggcgaacccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggaaagc 780
tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 840
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 900
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagccga ccgtgcgcc 960
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagc acgacttacc gccactggca 1020
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg 1080
aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgtctgtctg 1140
aagccagtta ccttcggaag aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct 1200
ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 1260
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa 1320
gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 1380
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 1440
ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 1500
ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca 1560
atgataccgc gagaccacg ctcaaccgct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 1620

```

ggaagggcgc agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 1680
 tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc 1740
 attgctacag gcacgtggt gtcacgctcg tcgttttgta tggcttcatt cagctccggt 1800
 tcccaacgat caagggcagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 1860
 ttccgtctct cgatcgttgt cagaagtaag ttggcgcag tgttatcact catggttatg 1920
 gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatcgtaa gatgcttttc tgtgactggt 1980
 gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 2040
 gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga 2100
 aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 2160
 taaccacatc gtgcacccaa ctgatcttca gcacctttta ctttcaccag cgtttctggg 2220
 tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt 2280
 tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 2340
 atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 2400
 tttcccgcaa aagtgccacc tgaacgaagc atctgtgctt cattttgtag aacaaaaatg 2460
 caacgcgaga gcgctaattt ttcaaaaaa gaactctgagc tgcattttta cagaacagaa 2520
 atgcaacgcg aaagcgctat tttaaccaag aagaatctgt gcttcatttt tgtaaaaaca 2580
 aaatgcaacg cgagagcgct aatttttcaa acaaagaatc tgagctgcat ttttacagaa 2640
 cagaaatgca acgcgagagc gctattttac caacaaagaa tctatacttc tttttgttc 2700
 tacaaaaatg catcccgaga gcgctatttt tctaacaaag catcttagat tacttttttt 2760
 ctcttttgtg cgctctataa tgcagctctt tgataacttt ttgcactgta ggtccgttaa 2820
 ggttagaaga aggtactttt ggtgtctatt ttctcttcca taaaaaagc ctgactccac 2880
 ttcccgctt tactgattac tagcgaagct gcgggtgcat tttttcaaga taaaggcatc 2940
 ccgattata ttctataccg atgtggattg cgcatacttt gtgaacagaa agtgatagcg 3000
 ttgatgattc ttcatgtgtc agaaaattat gaacggtttc ttctattttg tctctatata 3060
 ctacgtatag gaaatgttta cattttcgta ttgttttcga ttcactctat gaatagttct 3120
 tactacaatt tttttgtcta aagagtaata ctagagataa acataaaaaa tgtagaggtc 3180
 gagtttagat gcaagttcaa ggagcgaaag gtggatgggt aggttatata gggatatagc 3240
 acagagatat atagcaaaga gatacttttg agcaatgttt gtggaagcgg tattcgcaat 3300
 atttttagtag ctcggtacag tccggtgcgt ttttggtttt ttgaaagtgc gtcttcagag 3360
 cgcttttggt tttcaaaaagc gctctgaagt tcctatactt tctagagaat aggaacttcg 3420
 gaataggaac ttcaaagcgt ttccgaaaac gagcgcttcc gaaaatgcaa cgcgagctgc 3480
 gcacatacag ctcaactgtc acgtcgcacc tatatctgcg tgttgctgt atatatatat 3540
 acatgagaag aacggcatag tgcgtgttta tgcctaaatg cgtacttata tgcgtctatt 3600
 tatgtaggat gaaaggtagt ctagtacctc ctgtgatatt atcccattcc atgcggggta 3660
 tegtatgctt ccttcagcac taccctttag ctgttctata tgcctccact cctcaattgg 3720
 attagtctca tcttcaatg ctatcatttc ctttgatatt ggatcatatt aagaaacat 3780
 tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcccttcc gtctcgcgcg 3840
 tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg 3900
 tetgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccg 3960
 gtgtcggggc tggcttaact atgcgcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatag 4020
 atcaacgaca ttactatata tataatatag gaagcattta atagacagca tcgtaatat 4080
 tgtgtacttt gcagttatga cgcagatgg cagtagtgga agatattctt tattgaaaaa 4140
 tagcttgtca ccttacgtac aatcttgatc cggagctttt ctttttttgc cgattaagaa 4200
 ttaattcggc cgaaaaaaga aaagagagg gccaaagagg agggcattgg tgactattga 4260
 gcacgtgagt atacgtgatt aagcacacaa aggcagcttg gagtatgtct gttattaatt 4320
 tcacaggtag ttctgggtcca ttggtgaaag tttgcggctt gcagagcaca gaggccgcag 4380
 aatgtgctct agattccgat gctgacttgc tgggtattat atgtgtgccc aatagaaaga 4440
 gaacaattga cccggttatt gcaaggaaaa tttcaagtct tgtaaaagca tataaaaaa 4500

```

gttcaggcac tccgaaatac ttggttgccg tgtttcgtaa tcaacctaaag gaggatgttt 4560
tggctctggt caatgattac ggcattgata tgcgccaaact gcatggagat gagtcgtggc 4620
aagaatacca agagttcctc ggtttgccag ttattaaaag actcgtattt ccaaaagact 4680
gcaacatact actcagtcca gcttcacaga aacctcattc gtttattccc ttgtttgatt 4740
cagaagcagg tgggacagggt gaacttttgg attggaactc gatttctgac tgggttgga 4800
ggcaagagag ccccgaaagc ttacatttta tgttagctgg tggactgacg ccagaaaatg 4860
ttggtgatgc gcttagatta aatggcggtta ttggtgttga tgaagcggg ggtgtggaga 4920
caaatggtgt aaaagactct aacaaaatag caaatctcgt caaaaatgct aagaaatagg 4980
ttattactga gtagtattta ttttaagtatt gtttgtgcac ttgccgatct atcggtgtg 5040
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcacag gaaattgtaa acgttaatat 5100
tttggttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 5160
aatcggaaca atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc 5220
agtttggaac aagagtcacac tattaagaa cgtggactcc aacgtcaaa ggcgaaaaac 5280
cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc taatcaagtt ttttggggtc 5340
gaggtgcccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 5400
gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag 5460
ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctcgg cgtaaccacc acaccgcgg cgottaatgc 5520
gccgctacag ggcgcgtcgc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcgg 5580
atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg 5640
attaagtgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtcg 5700
tccaagcttt cgcgagctcg agatcccgag ctttgcaaat taaagccttc gagcgtccca 5760
aaaccttctc aagcaagggtt ttcagtataa tgttacatgc gtacacgct ctgtacagaa 5820
aaaaaagaaa aatttgaaat ataaataacg ttcttaatac taacataact ataaaaaat 5880
aaatagggac ctgacttca ggttgtctaa ctcttctctt ttcggttaga gcggtgtgg 5940
ggggaggcgg tgaatgtaag cgtgacataa ctaattacat gatctcttt tgttgttcc 6000
gggtgtacaa tatggacttc ctctttctg gcaaccaaac ccatacatcg ggttctctat 6060
aatacctcg ttggtctccc taacatgtag gtggcggagg ggagatatac aatagaacag 6120
ataccagaca agacataatg ggctaaacaa gactacacca attacactgc ctcatgtatg 6180
gtggtacata acgaactaat actgtagccc tagacttgat agccatcatc atatcgaagt 6240
ttcactaccc tttttccatt tgccatctat tgaagtaata ataggcgcat gcaacttctt 6300
ttcttttttt ttcttttctc tctccccgt tgttgtctca ccatatccgc aatgacaaaa 6360
aaaatgatgg aagacactaa aggaaaaaat taacgacaaa gacagacca acagatgtcg 6420
ttgttccaga gctgatgagg ggtatcttcg aacacacgaa actttttctt tcttctatc 6480
acgcacacta ctctctaata agcaacggta tacggccttc cttccagtta cttgaatttg 6540
aaataaaaaa agtttgccgc tttgctatca agtataaata gacctgcaat tattaatctt 6600
ttgtttcctc gtcattgttc tcttccctt tcttcttctt ttctttttct gcacaatatt 6660
tcaagctata ccaagcatat aatcaactcc aagcttgaag caagcctcct gaaagatgaa 6720
gctactgtct tctatcgaa aagcatgcga tatttgccga cttaaaaagc tcaagtgtc 6780
caaagaaaaa ccgaagtgcg ccaagtgtct gaagaacaac tgggagtgtc gctactctcc 6840
caaaacaaaa aggtctccgc tgactagggc acatctgaca gaagtggaat caaggctaga 6900
aagactggaa cagctatttc tactgatttt tctcagagaa gacctgaca tgattttgaa 6960
aatggattct ttacaggata taaaagcatt gttaacagga ttatttgtac aagataatgt 7020
gaataaagat gccgtcacag atagattggc ttcagtggag actgatatgc ctctaacatt 7080
gagacagcat agaataagtg cgacatcatc atcggaagag agtagtaaca aaggtcaaa 7140
acagttgact gtatcgccgg aattcttaat acgactcact atagggcata tggccatgga 7200
ggccccggg

```

<210> 9

<211> 6820

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 9

```

gatccgtcga cagatctccc tatagtgagt cgtattactg cagagatcta tgaatcgtag 60
atactgaaaa accccgcaag ttcacttcaa ctgtgcatcg tgcaccatct caatttcttt 120
catttataca tcgttttgcc ttcttttatg taactatact cctctaagtt tcaatcttgg 180
ccatgtaacc tctgatctat agaatttttt aaatgactag aattaatgcc catctttttt 240
ttggacctaa attcttcatg aaaatatatt acgagggcctt attcagaagc tttggacttc 300
ttcgccagag gtttggtcaa gtctccaatc aaggttgctg gcttgtctac cttgccagaa 360
atttacgaaa agatggaaaa gggtaaatac gttggtagat acgttggtga cacttctaaa 420
taagcgaatt tcttatgatt tatgattttt attattaaat aagttataaa aaaaaataagt 480
gtatacaaat tttaaagtga ctcttaggtt ttaaaacgaa aattcttggt cttgagtaac 540
tctttcctgt aggtcaggtt gctttctcag gtatagcatg aggtcgctct tattgaccac 600
acctctaccg gcatgccgga aattccccta cctatgaac atattccatt ttgtaatttc 660
gtgtcgtttc tattatgaat ttcatttata aagtttatgt acaaatatca taaaaaaga 720
gaatcttttt aagcaaggat tttcttaact tcttcggcga cagcatcacc gacttcggtg 780
gtactgttgg aaccacctaa atcaccagtt ctgatacctg catccaaaac ctttttaact 840
gcatcttcaa tggccttacc ttcttcaggc aagttcaatg acaatttcaa catcattgca 900
gcagacaaga tagtggcgat agggtaaac ttattctttg gcaaatctgg agcagaaccg 960
tggcatggtt cgtacaaacc aaatgcggtg ttcttgtctg gcaaagaggg caaggacgca 1020
gatggcaaca aacccaagga acctgggata acggaggcct catcggagat gatatcacca 1080
aacatgttgc tgggtgattat aataccattt aggtgggttg ggttcttaac taggatcatg 1140
goggcagaat caatcaattg atgttgaacc ttcaatgtag gaaattcggt cttgatggtt 1200
tctccacag tttttctcca taatcttgaa gaggccaaaa cattagcttt atccaaggac 1260
caaataggca atggtggctc atgttgtagg gccatgaaag cggccattct tgtgattctt 1320
tgcaattctg gaacggtgta ttgttacta tccaaagcga caccatcacc atcgtcttcc 1380
tttctettac caaagtaaata acctcccact aattctctga caacaacgaa gtcagtacct 1440
ttagcaaatt gtggcttgat tggagataag tctaaaagag agtcggatgc aaagttacat 1500
ggtcttaagt tggcgtaaca ttgaagttct ttacggattt ttagtaaacc ttgttcaggt 1560
ctaactact ctgtaccca tttaggacca cccacagcac ctaacaaaac ggcatacacc 1620
ttcttgagg cttccagcgc ctcatctgga agtgggacac ctgtagcatc gatagcagca 1680
ccaccaatta aatgattttc gaaatcgaac ttgacattgg aacgaacatc agaaatagct 1740
ttaagaacct taatggcttc ggctgtgatt tcttgaccaa cgtgggtcac tggcaaaacg 1800
acgatcttct taggggcaga cattagaatg gtatatcctt gaaatatata tatatattgc 1860
tgaaatgtaa aaggtaagaa aagttagaaa gtaagacgat tgctaaccac ctattggaaa 1920
aaacaatagg tccttaaata atattgtcaa cttcaagtat tgtgatgcaa gcatttagtc 1980
atgaacgctt ctctattcta tatgaaaagc cggttccggc ctctcacctt tcttttttct 2040
cccaattttt cagttgaaaa aggtatatgc gtcaggcgac ctctgaaatt aacaaaaaat 2100
ttccagtcac cgaatttgat tctgtgcgat agcgcccctg tgtgttctcg ttatgttgag 2160
gaaaaaaata atggttgcta agagattcga actcttgcat cttacgatac ctgagtattc 2220
ccacagttgg ggatctcgac tctagctaga ggatcaattc gtaatcatgg tcatagctgt 2280
ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa 2340
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga ggtaactcac attaatgog ttgcgctcac 2400

```

tgcccgccttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgga ttaatgaatc ggccaacgcg 2460
 cggggagagc cggtttgctg attgggcgct cttccgcttc ctccgtcact gactcgtgc 2520
 gtcgggtcgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcaetc aaaggcggta atacggttat 2580
 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2640
 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gtcgcgcgcc cctgacgagc 2700
 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 2760
 aggcgttttc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttacgc 2820
 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatagc tcacgctgta 2880
 ggtatctcag ttccgtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 2940
 ttcagcccca ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac 3000
 acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3060
 gcggtgctac agagtctctg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3120
 ttggtatctg cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 3180
 ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3240
 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc taagggtctt gacgtcagc 3300
 ggaacgaaaa ctacagttta gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3360
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatata gagtaaaact 3420
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc 3480
 gttcatccat agttgcctga ctcccgcgc tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 3540
 catctggccc cagtgcctga atgataccgc gagaccacgc ctaccggct ccagatttat 3600
 cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaa tggtcctgca actttatccg 3660
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagtctg ccagttaata 3720
 gtttgcccaa cgttggtgcc attgctacag gcacgcgtgt gtcacgctcg tcgtttggtg 3780
 tggttccatt cagctccggt tcccaacgat caaggcagat tacatgatcc cccatgttgt 3840
 gcaaaaaagc ggttagctcc ttccgtctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 3900
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 3960
 gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 4020
 gaccgagttg ctcttgccc ggcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 4080
 taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 4140
 tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcacctttta 4200
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 4260
 taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 4320
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatattg atgtatttag aaaaataaac 4380
 aaataggggg tccgcgcaca tttcccga aagtgcacc tgacgtctaa gaaccatta 4440
 ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctccgcggtt 4500
 tcgggtgatg cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct 4560
 tgtaagcgga tgcggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 4620
 gtcggggctg gcttaactat ggggcacag agcagattgt actgagagtg caccataacg 4680
 catttaagca taaacacgca ctatgccgtt cttctcatgt atatatatat acaggcaaca 4740
 cgcagatata ggtgcgacgt gaacagttag ctgtatgtgc gcagctcgcg ttgcattttc 4800
 ggaagcgtc gttttcggaa acgctttgaa gttcctatc ogaagtccct attctctagc 4860
 tagaaagtat aggaacttca gagcgtttt gaaaaccaa agcgtctga agacgcactt 4920
 tcaaaaaacc aaaaacgcac cggactgtta cgagotacta aaatattgag aataccgctt 4980
 ccacaaacat tgcacaaaag tatctctttg ctatatatct ctgtgtcata tccctatata 5040
 acctacccat ccacotttcg ctcttgaac ttgcatctaa actcgacctc tacatttttt 5100
 atgtttatct ctagtattac tcttttagaa aaaaaattgt agtaagaact attcatagag 5160
 tgaatcgaac acaatacgaa aatgtaaaaa tttcctatac gtagtatata gagacaaaat 5220
 agaagaaacc gttcataatt ttctgaccaa tgaagaatca tcaacgctat cactttctgt 5280

```

tcacaaagta tgcgcaatcc acatcggtat agaataataat cggggatgcc tttatcttga 5340
aaaaatgcac ccgcagcttc gctagtaatc agtaaacgcg ggaagtggag tcaggctttt 5400
tttatggaag agaaaataga caccaaagta gcttcttctt aaccttaacg gacctacagt 5460
gcaaaaagtt atcaagagac tgcattatag agcgcacaaa ggagaaaaaa agtaatctaa 5520
gatgctttgt tagaaaaata gcgctctcgg gatgcatttt tgtagaacaa aaaagaagta 5580
tagattcttt gttggtaaaa tagcgctctc gcggtgcatt tctgttctgt aaaaatgcag 5640
ctcagattct ttgtttgaaa aattagcgct ctgcggttgc atttttgttt tacaaaaatg 5700
aagcacagat tcttcgttgg taaaatagcg ctttcgcgtt gcatttctgt tctgtaaaaa 5760
tgcagctcag attctttgtt tgaaaaatta gcgctctcgc gttgcatttt tgttctacaa 5820
aatgaagcac agatgcttcg ttgcttgcac gcaacttctt ttcttttttt ttcttttctc 5880
tctccccgtt tgttgtctca ccatatccgc aatgacaaaa aaaatgatgg aagacactaa 5940
aggaaaaaat taacgacaaa gacagcacca acagatgtcg ttgttccaga gctgatgagg 6000
ggtatcttcg aacacacgaa acttttttct tcttcttctt acgcacacta ctctctaata 6060
agcaacggta tacggccttc cttccagtta cttgaatttg aaataaaaaa agtttgccgc 6120
tttgctatca agtataaata gacctgcaat tattaatctt ttgttctctc gtcattgttc 6180
tcgttccctt tcttcttgtt ttctttttct gcacaatatt tcaagctata ccaagcatac 6240
aatcaactcc aagctttgca aagatggata aagcggaatt aattcccgag cctccaaaaa 6300
agaagagaaa ggtcgaattg ggtaccgccc ccaattttta tcaaagtggg aatattgctg 6360
atagctcatt gtccttcaat ttcactaaca gtagcaacgg tccgaacctc ataacaactc 6420
aaacaaatcc tcaagcgctt tcacaaccaa ttgcctctc taacgttcat gataacttca 6480
tgaataatga aatcacggct agtaaaattg atgatggtaa taattcaaaa ccaactgtcac 6540
ctggttggaac ggaccaaact gcgtataacg cgtttggaat cactacaggg atgtttaata 6600
ccactacaat ggatgatgta tataactatc tattcgatga tgaagatacc ccaccaaac 6660
caaaaaaaga gatcgaattc ttaatacgac tcactatagg gcccatggac gaagaatcca 6720
gttcattctt atgtacctat gctgagaatc gtgccaataa gaagccaata cttccttaga 6780
tgaigcaata aatattaaaa taaaacaaaa cagaaggctg 6820

```

<210> 10

<211> 10597

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico

<400> 10

```

ccggtggtac cgggcccccc ctcgaggtcg acggtatcga taagctttcg tcattgaaaa 60
gaaggataag aatggacgat gggagaagc tctcggtgtt ccaggagatc agaaaacagc 120
aactgttcca aatcttaagg agggagaaga atatcaattc agaatttctg ctcgtaacaa 180
ggctggaact ggagatcctt ctgatccttc tgatcgtgtt gttgcgaagc caagaaacct 240
tgctccaaga attcatcgtg aagatctttc tgatacaact gtcaaggctg gagccactct 300
caagttcatt gttcatattg atggtgagcc agcaccagat gtaacatggt cattcaatgg 360
aaaaggaatc ggagagagca aggctcaaat tgaaaatgag ccatacatct cgagatttgc 420
tttgccaaag gcacttcgta agcaaagtgg aaaatatacc atcactgcaa ccaacattaa 480
tggaactgac agtgtcacta tcaatatcaa ggtaaaaagc aagccaacga aaccaagg 540
accaatcgag gtaactgatg tcttcgaaga tcgtgcaact cttgactgga aaccaccaga 600
ggatgacgga ggagagccaa ttgagttcta tgaaattgaa aagatgaaca ccaaggacgg 660
aatctgggtt ccattgtggc gtagtgagga taccacttcc acagtcgatt cactcaacaa 720

```

```

gggagatcat tacaagttcc gtgtcaaggc tgtcaacagc gaaggacctt ctgatccatt 780
ggaaactgaa accgatattt tggctaaaaa tccatttgat cgtccagata gaccagggtcg 840
tccagagcca actgattggg attctgatca tgttgatctc aagtgggagc cactagttct 900
agaagcgctg ctaagggggc cctcgtcgag tgggtcacia tcacctgaaa ctccaaaggc 960
agccagttag gaacgtgaag aagaagaaaa agagtcatct gaacagggtt gattttcttt 1020
ctgggtcaaaa agatgaaatt attgattttc agccagatac tccaaaact agcagcgaga 1080
agtctgcaag tcgttcacag tcgcccagag aatcgcgga agtgagccaa gaggtatgtt 1140
tttcaaaaat caataactga tcataatttt tattgtttgg tgaatttaag aaaataatat 1200
tcgaaaattc ctctgaatta tcaagattgc agtattaatt tcgagaaaaa ttgagatatt 1260
catagagcta ttgtaaattt tcttgatttc agactgaaac ttcgaaaaat caagagaaaa 1320
tcaaagaaaa ggatgacggg gatgatcagc ctggcacacc gaacagctat agaagccggg 1380
aaacttcacc agtccaaaaa aggtccaagg agaccagggt tgtcaaaagc ttcttgcgat 1440
taattctcat ttcaattttt cagagaatca gagtctctg aaaaatcccc ggttcgttca 1500
agatctccca gaaggtcttc agcacgttcc cgtcacgat ctctagacg gcgccgagaa 1560
agaagctcag aaagaaagca atccgaagag ccagcaccgc taccagagaa aaagaagaaa 1620
gagccgctgg atattctacg aacaagaacc ggaggagcat atattccacc cgcctaaact 1680
cgacttatgc aacaacagat tagtgataag caaagtgaac agtatcagag aatgaattgg 1740
gaaagaatga agaaaaagat tcacggattg gttaacagag tcaacgcgaa gaatcttgtt 1800
caaattgtca gagaacttct tcaagagaat gtgattogtt caaagtgagt gagaaaatcg 1860
aaggaaaaag aaagaattaa ttttaatttt caggggactt ctctgccgtg acattattca 1920
agctcaggct ttctcaccag gattctctaa cgtctatgca gctttggcgg cagttatcaa 1980
ctcgaaattc cctcatgtcg gtgaacttct tctccgtcgt ctgattgtac agttcaaaag 2040
aagtttccgt agaaatgaca gaggcgtcac ggtgaacgtg atcaaatcca tcgcacattt 2100
gattaatcaa caagttgctc acgaagttct tgcgtggaa atcatgattc tgatgcttga 2160
agaaccaact gatgattcag ttgaagtcgc cattgcgttc ctgaaagagt gtggagcaaa 2220
gcttctggag attgctccag cagctcttaa cagtgtctac gaccgtcttc gtgcaattct 2280
catggaaaact gaaagatcgg aaaaatgcaat ggatcgacgt attcagtata tgattgagac 2340
tgcaatgcag attcgaaaag acaaatttgc ggttaaggtag aatataataa tagtttatta 2400
gaaaaaaata aattagaata atttaaatte ctactagcca atcaggcgac ctttttgocg 2460
atagttctat tattgaaaaa tttggagaat ttctcatatt ctcgctcgga aatctggaat 2520
tcgacgagat cttctggctt ctgtgcagct gcacgccttt gtgctccctt tctcgcttgt 2580
cttctgtgta caccaagaac cttgttgagt tcatcaactg aatctgtgac tggcttgttg 2640
ctcactggat gcactagacg actgattctc gagaaatcag attgagttgc gattaggggtg 2700
acctagaaat tgggaataat acgaactttt gaaaatatte aggaggatta aaaaaattat 2760
tctcgacaat cctacaaatt tacttattgc accatgttgc tccaacattt ttcattaaaa 2820
gttaatgaaa aaatgtagaa aatcggaat tggcaatttt cagaccattt ttaagcattt 2880
tcaaaaaaaa attgcagctg aaataaatgt ctttttcaga taaatcgagc gattttctgt 2940
tgtctgacac tagtttttag ttttaaaaaa tgttggaaag acatggtgca ataggtaatt 3000
tcatagaatt tccatgtgtt ttttttcaat taaccaatta tccaaatctt ccaaactcac 3060
attttgcgga gctgggctat caagaatctg ctgcagtttt ataagacgag catctctgat 3120
atcactgaaa attaatTTTT aatcaaaact tgaatatcaa ctaaaccac ttattaactt 3180
tctcgatctt ctgtcgttcg gtacgatgac ggtgaagaag ccaattgtag tagttgattt 3240
ggttcaagtc ctttcggtgt tgtacgtcag tgtcctgcaa tgctatttag ttataactta 3300
ggcctaagat tcaatttaat gaagtgatta aatttgttct ctgaacctct taagatgac 3360
ttttggatta gaaacatata agacagggtt acctatctat taaaaaacag atcaaaatag 3420
atacgacca atcgataat ccatgcctac ctggcatcta ggaacgtgtt cttagaagat 3480
ttcttacgta atcgatgaa gaaataacaa tttgatcggt ggccagcaaa aatagggttt 3540
taagtgggat agtgttttta ttagctaacc ggaaaatttt atagtttttt tttgcaagaa 3600

```

accactgaaa accccetaat tgtatacatt ttttggagca gcttctggtc tttttgagca 3660
 ataaaattcg ataaaacaga atttaagtgt aaattgttca catttagttt ctattttatc 3720
 aaatttttgtt gctcaaaaac attcgaagct gctctaaaaa aatgcattaa aaaaggggtt 3780
 ttcagtgggtt tttcacatta aaaaagctaa ttttaactaa aaatccatca tatttccaac 3840
 tttgtcacaa caataaaatg ctggtcaaaa tgtgttcgaa aaaatgtttt tttttttaat 3900
 ttttataatt taaaaatagt tttctttcgc tgggacacat acatttttgg gcgtaaattt 3960
 tcagttcaaa tttccatttt tacaaccata atcataaagc tacgtctgat ctctctcgca 4020
 cttacctgcg cctgattcga aagaacaacc gtagccaaaa gaacaagaag aacaagcacg 4080
 tagttgtggt agtggacggt catcacgcaa tactgaccaa tggctgtggg gtctcacttt 4140
 ccgtactatt gagagagggg agactgaaga tggcaattga ggacagtgtc ttcgacgcac 4200
 gcatgcatcc ataagcataa tccaggaggg atggagagaa aaatcttgtt tctaagcccc 4260
 tccctttgta atacatacac atatctaata ccgaagaatg gctaattgaa tggacgtcag 4320
 ctgttgctgt agttgccaaag gcatcatcga tgaaataact gaaagaaaga attaaataat 4380
 tattgcaggc gtatccggcg gtcatgaag acttggactt gattgaggag gaggatcaga 4440
 tcacccatac acttaatttg gaggatgcgg ttgatccgga aaatgggctt agtaagtgc 4500
 tgaccacacg cggggggcat taatttaata aattgaattc catttcagat gtgttcaaac 4560
 tagatccaga attcgaagaag aacgaggagg tttatgagga gatccgtaag gaaatcattg 4620
 gaaacgccga tatttcggat gaggatggtg gcgacgagtt ggatgatgaa gaagagggta 4680
 gtgatgtgga agaggctccg aagaagacta cagagattat tgataatact gatcagaatt 4740
 gactgctttc agaaggtatt cattttgagt tttgggccgg caaatctgta agttgccggt 4800
 tgccgaaaaat ttgctgaatt tgccggaaaa aaaaattcgg gaatttattt aaaaactttt 4860
 tgtaaaaatt aaattaaatt tgcaactttt cagagaagtc tacctgacaa tgcaatcatc 4920
 tttggactac caagaagctg ctcacaaatt gctgaaaatg aagattccag acagcatgca 4980
 ggtcagcgat gttgcaaaaga aaaattttcg accaaaaaaa ccaaccaatc ataaaattta 5040
 aaaaaaaact ccgttttttt cttttttttt atacgagaaa aaccaaaaaa atgtattttt 5100
 gccaaattct aaaatactat ccccgaaatt ttcaatattt tctctttcag aacgaactct 5160
 gcgcgatgct tgctcgattgt tgtgctcaac agcgtacctc cgagcgattc tacggaatgc 5220
 tcatcgaacg tttctgccga cttcgccctcg aataccagca atactttgaa aagctctgcc 5280
 aggacacgta ttccacgatt caccgaattg acatcacaaa actgcggaat ttggctcgcc 5340
 ttattgctca tttgctctcg acggatgcta ttgactggaa gattttggcc gatatgaaaa 5400
 tgaccgaaga ggacacaact tctctggca gaatctatat taaatatata tttaatgaac 5460
 ttgtggaggc gatgggaatg gttaaacttc attcgagagt tactgatccg tgagtttctc 5520
 agagagagtt gttttcgtat tcaatttttc ctattttcag aactttggct cattgctttg 5580
 ttggattatt ccacgaact aatccgaaca gcgcacgatt ttcgatcaac ttcttcacaa 5640
 tgattggatt ggggtggttg acgttggaac ttcgtgaatg gctggcaaag ggtctcaaga 5700
 agaagaaggg aatgctggat cagttgaagg ccgaatcaag ctcagattca tcgtcgtctt 5760
 cggattcgtc agactcgtct gattcttcgg attctgacga ttcacccgac tcgtcttcag 5820
 attcctcctc ttcttcagaa tcagagccag aaccaccgaa gaaaaagaag aagaagaaca 5880
 gtgaagagag ttccaaaaag aaggaaaaag agaataattg tcgacgggat cgtggagaca 5940
 agagagctga acgtcatcgt gatcaaaagt tggagaacaa ggacaaggat cgtcgacgtc 6000
 gccaggattc tgacgaaaaat cgtcggccag aacgaggaga tgaccgcaag gatcggagta 6060
 aagatcgtcg tcgtcaagac tcggatgatg aggatcggaa aggtcgtgaa cgtcgggaag 6120
 attcagggga aagacgtcgc ggagatcggg atcgacgtga tcgaaacaag gatcaggagg 6180
 atcacctgta agatcgccgt gaccgaagca aggatcgtga ggatcgacgt gatcgccgtc 6240
 gtcatgactc tgatgatgat cgtaaaactc gtcgggatag aagtgaagag cgaggaggac 6300
 gtcgtcgtga agtggaatcg gatgatcgac gccgacgtcg ttgaattttc aaatttttaa 6360
 tactgaatat ttgttttttt tcctattatt tatttattct ctttgtgttt ttttcttgc 6420
 tttctaaaaa attaatcaa tccaaatcta aacatgagcg gttttttttc tctttccgtc 6480

tcccaattcg tattccgcgc ctctcatctg aacacaatgt gcaagtttat ttatcttctc 6540
 gctttcattt cattaggacg tggggggaat tggtggaagg gggaaacaca caaaaggatg 6600
 atggaaatga aataaggaca cacaatatgc aacaacattc aattcagaaa tatggaggaa 6660
 ggttttaaaag aaaacataaa aatatataga ggaggaagga aaactagtaa aaaataagca 6720
 aagaaattag gcgaacgatg agaattgtcc tcgcttggca aatgcgaatc cgtatggaga 6780
 ggcaegtttg gcgaaggcaa atgttcggta tggagatctg taaaaatttt taagttgaaa 6840
 tttggtgttg ctcttttaca aaattttccg attttcgctt gaaattacgg tgccaggtct 6900
 cgacacgtct tccaattttt caaattcaaa agagccttta atgggctgta gttgctaatt 6960
 tctcgttttt gaaaattttt ctccgttta atcgaaattt gatgtatttt atttatgatt 7020
 ttcaataaat ttcaaagaaa ctggtgaaaa ctcggaatat tgtgaactac agtaatccaa 7080
 tccttaaaag cgcacacctt ttaaagtcc gcccaatac gatatttttt taagattcgc 7140
 tagagcggcc gccaccgagg tggagctcca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt 7200
 cactggcgtt cgttttaca cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc 7260
 gcttgcagc acatccccc ttccgagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc 7320
 gcccttccca acagttgctt agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcat 7380
 taagcgcggc ggggtgtgtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgc agcgccttag 7440
 cgcgcgtcc tttcgtttt ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc ttcccccgtc 7500
 aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgccttacgg cactcgcacc 7560
 ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt 7620
 ttgcgccctt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcctgttc caaactggaa 7680
 caacactcaa ccttatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg 7740
 cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat 7800
 taacgtttac aatttcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt 7860
 tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgtcatgag acaataaacc tgataaatgc 7920
 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcccggtc gcccttattc 7980
 ccttttttgc ggcattttgc ctctctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa 8040
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacct cgaactggat ctcaacagcg 8100
 gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaa 8160
 ttctgctatg tggcgcggtt ttatcccgta ttgacgcgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 8220
 gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 8280
 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aagcatgagt gataacactg 8340
 cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct ttttttcaca 8400
 acatggggga tcatgtaact cgcttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 8460
 caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat 8520
 taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 8580
 ataaagtgtc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc tggctggttt attgctgata 8640
 aatctggagc cggtagcgtt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggtt 8700
 agccctccc tatcgtagt atctacacga cgggcagtca ggcaactatg gatgaacgaa 8760
 atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag 8820
 tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg 8880
 tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 8940
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 9000
 taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaaccgc ggtggtttgt ttgccggatc 9060
 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag ataccaaata 9120
 ctgtccttct agtgtagcgc tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 9180
 catacctcgc tctgctaata ctgttaaccg tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 9240
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 9300
 ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaacta caccgaactg agatacctac 9360

ES 2 320 527 T5

```

agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 9420
taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccagggggg aacgcctggt 9480
atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 9540
cgtcaggggg gccgagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 9600
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atccccgat tctgtggata 9660
accgtattac cgcttttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca 9720
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc 9780
gttgccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg 9840
agcgcaacgc aattaatgtg agttacctca ctcataggc accccaggct ttacacttta 9900
tgcttccggc tcctatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca 9960
gctatgacca tgattacgcc aagctcggaa ttaaccctca cttaaaggaa caaaagctgg 10020
gggggatcct ccaaaatcgt cttccgctct gaaaaacgaa agtggacctt tgacatccga 10080
aaaaatgggc gaaaaaatga aattgagctt tttgggtcga aaaaaatgtt tttagaatgc 10140
tgagaacacg ttaaacacga agatcatatt tattttgaga cccggatgct ctgaaaatgt 10200
ctgacataga tttaaaaaag catatatata tttttcattt tcaacgtgaa agttttgtgc 10260
aactttatag aatctcctat tggcacattg ttttttattt aactgaggca gtttttgaac 10320
acctttttga aactttgaat ctctttgaag tatactgtcg aaaagactga cttgagcggt 10380
cgaaatgccg gaagaaaact atatttgaat ctgcgcgtaa attgagaaat gcaaccgcgc 10440
tccactggac aattggaaaa aaaatttatt cggaggcgac aacggtattt tcgaaattga 10500
ttttctgtgt attttctcat tttttataaa ttcttctttg atttatcggt cgtttgtgag 10560
aaatttaatt gtattcaaac ttttttatag taagata 10597

```

5 <210> 11
 <211> 10599
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ADN plasmídico
 <400> 11

```

ccggtggtac cgctagccgt acgaaccggg gttctagaac tagtggatcc cacttgagat 60
caacatgate agaatcccaa tcagttggct ctggacgacc tggctctatc ggacgatcaa 120
atggattttt agccaaaata tcggtttcag tttccaatgg atcagaaggc ccttcgctgt 180
tgacagcctt gacacggaac ttgtaatgat ctcccttggt gagtgaatcg actgtgaagt 240
gggtatctcc actacgtcca catggaaccc agattccgtc cttggtgttc atottttcaa 300
tttcatagaa ctcaattggc tctcctccgt catcctctgg tggtttccag tcaagagttg 360
cacgatcttc gaagacatca gttacctcga ttggtccctt tggtttcggt ggcttgcttt 420
ttaccttgat attgatagtg aactgtcag ttccattaat gttggttgca gtgatggtat 480
attttccact ttgcttacga agtgcccttg gcaaagcaaa tctcgagatg tatggctcat 540
tttcaatttg agccttgctc tctccgattc cttttccatt gaatgaccat gttacatctg 600
gtgctggctc accatcaata tgaacaatga acttgagagt ggctccgacc ttgacagttg 660
tatcagaaag atcttcacga tgaattcttg gagcaagggt tcttggtctc gcaacaacac 720
gatcagaagg atcagaagga tctccagttc cagccttggt acgagcagaa attctgaatt 780
gatattcttc tccctcctta agatttggaag cagttgctgt tttctgatct cctggaacaa 840
cgagagcttc ttcccatcgt ccattcttat ccttcttttc aatgacgaaa gcttatcgat 900
accgtcgacc tcgagggggg gccctcgctg agtcggtcac aatcacctga aactccaaag 960
gcagccagtg aggaacgtga agaagaagaa aaagagtcac ctgaacaggt ttgattttct 1020

```

```

ttctggtcaa aaagatgaaa ttattgattt tcagccagat actcccaaaa ctagcagcga 1080
gaagtctgca agtcgttcac agtcgcccag agaatcgcgg gaagtgagcc aagaggtatg 1140
tttttcaaaa atcaataact gatcataatt tttattgttt ggtgaattta agaaaaataat 1200
attcgaaaaat tcctctgaat tatcaagatt gcagtattaa tttcgagaaa aattgagata 1260
ttcatagagc tattgtaaat tttcttgatt tcagactgaa acttcggaaa atcaagagaa 1320
aatcaaagaa aaggatgacg gggatgatca gcttggcaca ccgaacagct atagaagccg 1380
ggaaacttca ccagctccaa aaagggtccaa ggagaccagg tttgtcaaaa gcttcctgcg 1440
attaattctc atttcaattt ttcagagaat cagagtctcc tgaaaaatcc ccggttcggt 1500
caagatctcc cagaaggtct tcagcacgtt ccccgtcacg atctcctaga cggcgccgag 1560
aaagaagctc agaaagaaa caatccgaag agccagcacc gctaccagag aaaaagaaga 1620
aagagccgct ggatattota cgaacaagaa ccggaggagc atatatcca cccgccaaac 1680
ttcgacttat gcaacaacag attagtata agcaaaagtga acagtatcag agaataaatt 1740
gggaaagaat gaagaaaaag attcacggat tggttaacag agtcaacgag aagaattctg 1800
ttcaaattgt cagagaactt cttcaagaga atgtgattcg ttcaaagtga gtgagaaaat 1860
cgaaggaaaa ggaaagaatt aatttaattt ttcaggggac ttctctgccc tgacattatt 1920
caagctcagg ctttctcacc aggattctct aacgtctatg cagctttggc ggcagttatc 1980
aactcgaaat tcctcatgt cggtgaactt cttctccgtc gtctgattgt acagttcaaa 2040
agaagtttcc gtagaaatga cagaggcgtc acggtgaacg tgatcaaatt catcgacat 2100
ttgattaatc aacaagttag tcacgaagtt cttgcgctgg aaatcatgat tctgatgctt 2160
gaagaacca ctgatgattc agttgaagtc gccattgctt tctgaaaga gtgtggagca 2220
aagcttctgg agattgctcc agcagctctt aacagtgtct acgaccgtct tctgcaatt 2280
ctcatggaaa ctgaaagatc ggaaaatgca ctggatcgac gtattcagta tatgattgag 2340
actgcaatgc agattcgaaa ggacaaattt gcggttaagg agaatatata aatagtttat 2400
tagaaaaaaa taaattagaa taatttaaat tctactagc caatcaggcg accttttgc 2460
gcatagttct attattgaaa aatttgaga atttctcata ttctcgctcg gaaatctgga 2520
attcgacgag atcttctggc ttctgtgcag ctgcacgct ttgtgctccc tttctcgctt 2580
gtcttctgtg tacaccaaga acctgttga gttcatcaac tgaatctgtg actggcttgt 2640
tgctcactgg atgcactaga cgactgattc tcgagaaatc agattgagtt gcgattaggg 2700
tgacctagaa attgggaata atacgaactt ttgaaaatat tcaggaggat taaaaaatt 2760
attctcgaca atctacaaa tttacttatt gcaccatgtt gctccaacat ttttcattaa 2820
aagttaatga aaaaatgtag aaaatcgga attggcaatt ttcagaccat ttttaagcat 2880
tttcaaaaaa aaattgcagc tgaaataaat gtcattttca gataaatcga gcgattttct 2940
gttgtctgac actagttttt agtttttaaa aatgttggaa gaacatggtg caataggtaa 3000
tttcatagaa tttccatgtg ttttttttca attaaccaat tatccaaatc ttccaaactc 3060
acattttgcg gagctgggct atcaagaatc tgctgcagtt ttataagacg agcatctctg 3120
atatcactga aaattaattt ttaatcaaaa cttgaatatc aactaaacc accttattaac 3180
tttctcgatc ttctgtcgtt cggtagatg acggtgaaga agccaattgt agtagttgat 3240
ttggttcaag tcctttcggg gttgtacgtc agtgcctgc aatgetattt agttataact 3300
taggcctaag attcaattta atgaagtgat taaatttggt ctctgaacct cttaagatga 3360
tcttttggtg tagaaacata taagacaggt ttacctatct attaaaaaac agatcaaaat 3420
agatacgacc aaatcgata atccatgctt acctggcatc taggaacgtg ttcttagaag 3480
atctcttacg taatcgtag aagaaataac aatttgatcg ttggccagca aaaatagggt 3540
tttaagtggg atagtgtttt tattagctaa ccggaaaatt ttatagtttt tttttgcaag 3600
aaaccactga aaaccctcta attgtataca ttttttgag cagcttctgg tctttttgag 3660
caataaaatt cgataaaaca gaatttaagt gtaaatgtt cacatttagt ttctatttta 3720
tcaaattttg ttgctcaaaa acattcgag ctgctctaaa aaaatgcatt aaaaaagggg 3780
ttttcagtggt tttttcacat taaaaagct aattttaact aaaaatccat catatttoca 3840
actttgtcac aacaataaaa tgctggtcaa aatgtgttcg aaaaaatgtt ttttttttta 3900

```

atttttataa tttaaaaata gttttctttc gctgggacac atacattttt gggcgtaaat 3960
 tttcagttca aatttccatt tttacaacca taatcataaa gctacgtctg atctctctcg 4020
 cacttacctg cgcttgattc gaaagaacaa ccgtagccaa aagaacaaga agaacaagca 4080
 cgtagttgtg gtagtggacg ttcacacgc aatactgacc aatggctcgtg gggctctact 4140
 ttcggtacta ttgagagagg ggagactgaa gatggcaatt gaggacagtg tcttcgacgc 4200
 acgcatgcat ccataagcat aatccaggag ggatggagag aaaaatcttg tttctaagcc 4260
 cctccctttg taatacatat acatatctaa taccgaagaa tggctaattg aatggacgtc 4320
 agctgttgct gtagttgcc aaggcatcgc gatgaaataa ctgaaagaaa gaattaaata 4380
 attattgcag gcgtatccgg cggtcattga agacttgac ttgattgagg aggaggatca 4440
 gatcatccat acacttaatt tggaggatgc ggttgatccg gaaaatgggc ttagtaagtg 4500
 actgaccaca cgcggggggc attaatthaa taaattgaat tccatttcag atgtgttcaa 4560
 actagatcca gaattcgaaa agaacgagga ggtttatgag gagatccgta aggaaatcat 4620
 tggaaacgcc gatatttcgg atgaggatgg tggcgacgag ttggatgatg aagaagaggg 4680
 tagtgatgtg gaagaggctc cgaagaagac tacagagatt attgataata ctgatcagaa 4740
 ttgactgctt tcagaaggta ttcattttga gttttgggccc ggcaaatctg taagtgtccg 4800
 gttgccgaaa atttgctgaa tttgccgaa aaaaaaatc cggaatttat ttaaaaactt 4860
 tttgtaaaaa ttaaatthaa tttgcaactt ttcagagaag tctacctgac aatgcaatca 4920
 tctttggact accaagaagc tgctcacaaa ttgctgaaaa tgaagattcc agacagcatg 4980
 caggtcagcg atgttgcaaa gaaaaatttt cgaccacaaa aaccaaccaa tcataaaatt 5040
 taaaaaaaaa ctccgttttt tctttttttt ttatacgaga aaaacacaaa aaatgtattt 5100
 ttgcaaaatt ctaaaatact atccccgaaa ttttcaatat tttctctttc agaacgaact 5160
 ctgcgcgatg cttgtcgatt gttgtgctca acagcgtacc tacgagcgat tctacggaat 5220
 gctcatcgaa cgtttctgcc gacttcgcct cgaataccag caatactttg aaaagctctg 5280
 ccaggacacg tattccacga ttcaccgaat tgacatcaca aaactgcgga atttggtctg 5340
 ccttattgct catttgcctc cgacggatgc tattgactgg aagatttttg ccgatatgaa 5400
 aatgaccgaa gaggacacaa cttcttctgg cagaatctat attaaatata tatttaatga 5460
 acttggtggag gcgatgggaa tggttaaact tcattcgaga gttactgatc cgtgagtctc 5520
 ctagagagag ttgtttctgt attcaatttt cctatttttc agaacttttg ctcattgctt 5580
 tggttgatta tccccacgaa ctaatccgaa cagcgacga ttttcgatca acttcttcac 5640
 aatgattgga ttgggtggtt tgacgttgga acttctgtaa tggctggcaa agggctctca 5700
 gaagaagaag ggaatgctgg atcagttgaa ggccgaatca agctcagatt catcgtcgtc 5760
 ttcggattcg tcagactcgt ctgattcttc ggattctgac gattcatccg actcgtcttc 5820
 agattcctca tcttcttcag aatcagagcc agaaccaccg aagaaaaaga agaagaagaa 5880
 cagtgaagag agttccaaaa agaaggaaaa agagaatatt ggtcgacggg atcgtggaga 5940
 caagagagct gaacgtcacc gtgatcaaa tgtggagaa aaggacaagg atcgtcgacg 6000
 tcgccaggat tctgacgaaa atcgtcggcc agaacgagga gatgaccgca aggatcggag 6060
 taaagatcgt cgtcgtcaag actcggatga tgaggatcgg aaaggctcgtg aacgtcggga 6120
 agattcaggg gaaagacgtc gcggagatcg ggatcgacgt gatcgaaaca aggatcagga 6180
 ggatcacgtg gaagatcgcc gtgaccgaag caaggatcgt gaggatcgac gtgatcgccg 6240
 tcgtcatgac tctgatgatg atcgtaaaa tctcgggat agaagtgaag agcgaggagg 6300
 acgtcgtcgt gaagtggaat cggatgatcg acgcccagct cgttgaattt tcaaatttta 6360
 aatactgaat atttgttttt tttctatta tttatttatt ctctttgtgt tttttttctt 6420
 gctttctaaa aaattaatc aatccaaatc taaacatgag cgtttttttt tctctttccg 6480
 tctocaaatt cgtattccgc tctctcacc tgaacacaa gtgcaagttt atttatcttc 6540
 tcgctttcat ttcattagga cgtgggggga attggtggaa gggggaaaca cacaaaagga 6600
 tgatggaaat gaaataagga cacacaatat gcaacaacat tcaattcaga aatatggagg 6660
 aaggttthaa agaaaacata aaaatatata gaggaggaag gaaaactagt aaaaaataag 6720
 caaagaattt aggcgaacga tgagaattgt cctcgtttg caaatgcgaa tccgtatgga 6780

gaggcacgtt tggcgaaggc aaatgttcgg tatggagatc tgtaaaaatt ttttaagtga 6840
 aatttggtgt tgctctttta caaaattttc cgattttcgc ttgaaattac ggtgccaggt 6900
 ctgcacacgt cttccaattt ttcaaattca aaagagcctt taatgggctg tagttgctaa 6960
 tttctcgttt ttgaaaattt ttcttcggtt taatcgaaat ttgatgtatt ttatttatga 7020
 ttttcaataa atttcaaaga aactggtgaa aactcggaat attgtgaact acagtaatcc 7080
 aatccttaaa ggcgcacacc ttttaaattg ccgccccaat acgatatttt ttttaagattc 7140
 gctagagcgg ccgccaccgc ggtggagctc caattcgccc tatagtgagt cgtattacaa 7200
 ttcaactggc gtctgtttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa 7260
 tcgccttgca gcacatcccc ccttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga 7320
 tcgccccttc caacagttgc gtacgctgaa tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc 7380
 attaagcggc gcgggtgtgg tggttacggc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt 7440
 agcgcgcgct cctttcgtct tcttccttc ctttctcgc acgttcgcgc gctttcccg 7500
 tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga 7560
 ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg ccacgcgcct gatagacggt 7620
 ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 7680
 aacaacactc aacctatct cggctatct ttttgattta taagggattt tgccgatttc 7740
 ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat 7800
 attaacgttt acaatttcag gtggcacttt tggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 7860
 tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 7920
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttcctgt tcgcccttat 7980
 tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 8040
 aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 8100
 cggtaagatc cttgagagtt ttcccccga agaactttt ccaatgatga gcacttttaa 8160
 agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg 8220
 ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 8280
 tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgcctgc ataagcatga gtgataaac 8340
 tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttttca 8400
 caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 8460
 accaaaacgc gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaaact 8520
 attaaactgc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 8580
 ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggccttccg gctggctggg ttattgctga 8640
 taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg gccagatgg 8700
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacgggcagt caggcaacta tggatgaacg 8760
 aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 8820
 agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 8880
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 8940
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 9000
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 9060
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 9120
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 9180
 tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 9240
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 9300
 ggggggttgc tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 9360
 acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tccgaaggg agaaaaggcg acaggatatcc 9420
 ggtaaagcgc agggctcgaa caggagagcg caccaggagg cttccagggg ggaacgcctg 9480
 gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 9540
 ctgcctcagg gggccgagcc tatggaaaaa ccgcagcaac gcggcctttt tacggttccct 9600
 ggccctttgc tggccctttg ctccatggtt ctttctcgc ttatccctg attctgtgga 9660

ES 2 320 527 T5

```

taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 9720
cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga ggcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 9780
gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag 9840
tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 9900
tatgcttccg gctcctatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 9960
cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct 10020
gggggggatc ctccaaaatc gtcttccgct ctgaaaaacg aaagtggacc tttgacatcc 10080
gaaaaaatgg gcgaaaaaat gaaattgagc tttttgggtc gaaaaaatg tttttagaat 10140
gctgagaaca cgttaaacac gaagatcata tttattttga gacccgatg ctctgaaaat 10200
gtctgacata gatttaaaaa agcatatata tatttttcat tttcaacgtg aaagttttgt 10260
gcaactttat agaatctcct attggcacat tgttttttat ttaactgagg cagtttttga 10320
acaccttttt gaaactttga atctctttga agtatactgt cgaaaagact gacttgagcg 10380
ttcgaaatgc cagaagaaaa ctatatttga atctcgcgct aaattgagaa atgcaaccgc 10440
gctccactgg acaattggaa aaaaaattta ttccggaggcg acaacggtat tttcgaaatt 10500
gattttctgt gtattttctc attttttata aattcttctt tgatttatcg ttcgtttgtg 10560
agaaatttaa ttgtattcaa acttttttat agtaagata 10599

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para introducir ARNbc o ADN capaz de producir ARNbc en un animal no humano, comprendiendo dicho método suministrar a dicho animal una célula bacteriana o de levadura adecuada que comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN situada entre dos promotores de manera que sean capaces de iniciar la transcripción de dicha secuencia de ADN en ARN bicatenario tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dichos promotores.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vector de expresión comprende dos promotores idénticos que flanquean la secuencia de ADN.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho marcador de selección está orientada en relación con el promotor o promotores de manera que la transcripción de la secuencia de nucleótidos en ARN bicatenario se produce tras la unión de un factor de transcripción apropiado a dicho promotor o promotores.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica el marcador de selección se proporciona entre los promotores idénticos capaces de iniciar la transcripción de la secuencia de nucleótidos en ARNbc tras la unión del factor de transcripción a los promotores.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 en el que dicho marcador de selección comprende una secuencia de nucleótidos que codifica sup-35, para la introducción en *C. elegans* que tiene una mutación *pha-1*.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha célula bacteriana o de levadura o dicho animal están adaptados para expresar dicho factor de transcripción.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha célula bacteriana o de levadura o dicho animal comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho factor de transcripción unido operativamente a secuencias de control de la expresión adecuadas.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que dicho animal es *C. elegans* y dicha célula bacteriana es *E. coli*.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicha cepa de *E. coli* es una cepa ARNasa III negativa.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho animal es un mutante *nuc-1* de *C. elegans*.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho factor de transcripción es ARN polimerasa T7, T3 o SP6.

FIG. 1.

pGN1

gagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgaaantgtaaacgttaaatatt
 tgttaaaattcgcgttaaatattgtt aaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggc aaaatcccttataaatcaaaagaat
 agaccgagatagggttgagtgttgcagtttggaaacagagtcactaataagaacgtggactccaacgtcaaaagggcgaa
 aaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacc aaatcaagttttgcggtcgaggtgccgtaaagcttaaat
 cggaaacctaaagggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaagggagaaag
 cgaaaggagcgggctagggcgctggcaagttagcgggtcacgctgcgcgttaaccaccacaccgcgcgcttaatgcgc
 cgctacagggcgctccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcgggtcggggcctctcgctartacgcca
 gctggcgaaagggggatgtctgcgaaggcgattaaagtgggtaacgcaggggtttccagtcacgacgttga aaacgacgg
 ccagtgaaatgtaaacgactcactatagggcgaaatcgagctcggtaccggggatcctctagagtcgaaagcttctcgccctat
 agtgagtcgtattacagcttgagtattctatagtgacctaataagcttggcgtaaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgtt
 atccgctcacaaatccacacaacatacgagccgggaagcalaaagtgaagcctgggggtgcctaatagtgagctaaactcacatt
 aattgcgttcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggag
 agggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgctcactgcgtcgctcggtcgttcggctgcggcgagcgggtatcag
 ctactcaaaggcggttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaatgtgagcaaaaggccagcaaaa
 ggccaggaaacctgaaaaaggcgcggttgcgtggcggttttcgataaggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgct
 caagtcagagggtggcgaacctgacaggactataaaagataccaggcggttccccctggaaagctccctcgtgcgcttccctgtc
 cgacctgcccgttaccggatactgtccgctttctccctcgggaagcggtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctca
 gttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttaccggtacta
 tcgtcttgagtcacaacccggttaagacagacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgggtatgt
 agggcggtgtctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttgggtatctgcgctcgtcgaagc
 cagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagc
 agattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggggtctgacgctcagtggaacgaaaaatcacgt
 taagggaatttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatat
 atgagtaaacctggctgacagttaccaatgcttaatacgtgaggcacctatctcagcgatctgtctattcgttcacatagttgcct
 gactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgct

FIG. 1. (CONTINUACIÓN)

caccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggcgagcgagaagtggctcctgcaactttatccgcctcc
 atccagttctattaattgttgcgggaagctagagtaagtgttgcgcagttatagtttgcgcaacgttgttggcatgtacaggca
 tcgtgggtgtcacgctcgtcgttgggtatggctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtg
 caaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgttgcagaaagtaagtggccgagtggtatcactcatggttatggcagcact
 gcataattcttactgtcatgccatccgttaagatgctttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaataccgcgccc
 ggcgaccgagttgctcttgcggcggtcaatacgggataatagtgatgacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaa
 cgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgtaacccactcgtgcacccaactgatctca
 gcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaaaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacg
 gaaatgtgaataactcatactcttcttcaatattattgaagcatttatcagggttatgtctcatgagcggaacatattgaatgtat
 ttagaaaaataaacaataagggttcggcgacatttccccgaaaagtggccactgacgtctaagaaaccatttatcatgacatt
 aacctataaaaaataggcgtatcacgagggccttctgtcgcgcttccgggtgatgacggtgaaaaacctgacacatgcagctcc
 cggagacgggtcacagcttctgttaagcggtatccgggagcagacaagccgtcagggcgcgtagcgggtgttggcggtg
 gtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactga

FIG. 2.

PGN100

ctagcatgaacacgattaacatcgctaagaacgacttctctgacatcgaactggctgctatcccgttcaacactctggctgaccatt
 acgggtgagcgttttagctcgcgaacagttggcccttgagcatgagtttacgagatgggtgaagcacgcttccgcaagatgttga
 gcgtcaacttaagctggtgaggttgcggataacgctgccgccaagcctctcatcactaccctactccctaagatgattgcacgc
 atcaacgactggttgaggaaagtgaagctaagcgcggcaagcgccgacagcctccagttctgcaagaaatcaagccgga
 agcgttagcgtatcaccattaaagaccactctggcttgcctaaccagtgctgacaatacaaccgttcaggctgtagcaagcgca
 atcggctcgggccattgaggacgaggtcgccttcggtcgtatccgtgacctgaagctaagcacttcaagaaaaacgttgaggaa
 caactcaacaagcgcgttagggcacgtctacaagaaagcatttatgcaagttgtcagggtgacatgctcttaagggtctactcg
 gtggcgagggcgtggtcttcgtggcataaggaaagactctattcatgtaggagtacgctgcatcgagatgctcattgagtcacccgg
 aatggtagcttacaccgcaaaatgctggcgttaggtcaagactctgagactatcgaactcgcacctgaatagctgagggct
 atcgcaaccctgtaggtgctgctggctggcatctctcgatgttccaaccttgcgtagttcctcctaagcgtggactggcattac
 tgggtgggtattgggctaacggctcgtcctctggtcgtggtgctgactcacagtaagaaagcactgaltgctacgaagac
 gttacatgcctgaggtgtacaaagcgattaacattgcgcaaaacacccgatggaaaatcaacaagaaagtcttagcggtcggc
 aacgtaatcaccaagtggaagcattgtccgggtcgaggacatccctgcgattgagcgtgaagaactcccgatgaaaccggaaga
 catcgacatgaatcctgaggctctcaccgctggaaacgtgctgccgtgctgtgtaccgcaaggacagggctcgcaagcttc
 gccgtatcagccttgagttcatgcttgagcaagccaataagtttgtaaccataaggccatctgggtcccttacaacatggactggc
 gcggctcgtgttacgccgttcaatgttcaaccgcaaggaacgatatgaccaaaggactgcttacgctggcgaaaggtaaac
 caatcggtaaaggaggttacttactggctgaaaatccacgggtgcaaacgtgctgggtgtcgataaggtccgttccctgagcgcat
 caagttcattgaggaaaaccagagaacatcatggcttgcgttaagtctccactggagaacacttgggtgggtgagcaagattct
 ccgttctgcttcccttgcgttctgtttagtacgctgggttacagcaccacggcctgagctataactgctcccttccgtggcgtttg
 acgggtcttctgcttggcatccagcacttctccgcatgctcggagatgaggtaggtggtcgcgcggttaactgttctttagt
 accgttcaggacatctacgggattgttgaagaaagtcaacgagattctacaagcagacgcaatcaatgggaccgataacgaa
 gtagttaccgtgaccgatgagaacactgggtgaaatcttgagaaagtcaagctgggcactaaggcactgggtggtcaatggctg
 gctcacgggtgttactcgagtgactaagcgttcagtcagcgtggcttacgggtccaaagagttcgggtccgtcaacaagt
 gctggagataaccatcagccagctattgattccggcaaggggtccgatgttactcagccgaatcaggctgctggatacatggct
 aagctgatttgggaatctgtgagcgtgacgggtgtagctgcggtgaagcaatgaactggcttaagtctgctgaagctgctgg

FIG. 2. (CONTINUACIÓN 1)

ctgctgaggtcaaagataaagagactggagagattctcgcaagcgttgccgtgctgcatgggtaactcctgatggttccctgtgt
 ggacaggaatacaagaagcciatcagacgcgcttgaacctgatgttcctcgggtcagttccgttacagcctaccattaacaccaac
 aaagatagcggagattgatcacacaaacaggagctcgtgatcgctcctaacttgtacacagccaagacggtagccaccttcgta
 agactgtagtgtgggcacacgagaagtacggaaatcgaaatctttgcactgattcacgacitccttcggtagccattccggctgacgct
 gcgaacctgttcaaagcagtgccgcaaaactatgggtgacacatgatgcttctgtgactggctgatttctacgaccagttcgct
 gaccagttgcacgagctcaattggacaaaatgccagcacttcgggctaaggttaactgaacctccgtgacatcttagagtcgg
 acttcgcgttcgcgtaacctgggtattgatctgagctccgcacgcggcgtgtcatcagatcgccatctcgcgcccggtgctctg
 acttctaagtccaattactctcaacatccctacatgctcttctccctgtgctccacccctattttgttattatcaaaaaaactcttc
 ttaattcttgttttttagcttcttaagtccacttaacaatgaaattgtgtagattcaaaaatagaattaatctgaataaaaagtcga
 aaaaaattgtgctccctccccattataataattctatcccaaatctacacaatgttctgtgtacactcttatgttttttacttctga
 taaatttttttgaacatcatagaaaaaccgcacacaaaatacctatcatatgttacgtttcagtttatgaccgcaatttttatttctc
 gcacgtctgggctctcatgacgtcaaatcatgctcatcgtgaaaaagtttggagtattttggaaatttcaatcaagtgaagttta
 tgaaattaattttctgcttttgggggttccctattgtttgtaagagtttcgaggacggcgttttctgtctaaatcacaag
 tattgatgagcacgatgcaagaaagatcggaagaaggttgggtttaggctcagtggaagggtgagtagaagttgataaattgaa
 agtgagtagtgtctatgggttttgccttaaatgacagaatfacattcccaatataccaacataactgttccctactagtcggcgt
 acgggccccttctctcgcgcttgcgtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagcttctct
 gtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtagggcgcgctcagcggggtgttggcggggtgtcggggctggcttaactatgc
 ggcatcagagcagattgtactgagagtgacccatctcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacatca
 ggcgcccttaaggccctctgatacgctattttataggttaattgtcatgataataatgtttcttagacgtcaggtggcacttttcg
 gggaattgtgcgggaaccttattgttttttctaatacatcacaatgtatccgctcatgagacaataacctgtataatgtct
 tcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccctattcccttttgcggcattttgcttctgttttg
 ctaccagaaacgctgtgtaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttaccatcgaaactggatctcaaca
 gcggtaagatccttgagagttcggcccgaagaaacggtttccaatgatgagcacttttaaggtctgctatgtggcgcggtattatc
 ccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacatttctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaa
 aagcatctacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacctgagtgataacactgcggccaacttacttct
 gacaacgatcgaggagccgaaggagctaacggctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgcgcttgatcgttgggaacc
 ggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaa
 ctggcgaacttacttctagcttccggcaacaattatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctcgctc
 ggccctccggctggctggttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcca
 gatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacggggagtgaggcaactatggatgaacgaataagacagatcgctgag
 ataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatataacttttagattgatttaaaacttatttttaattaa
 aggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtag
 aaaagatcaaggatcttctgagatccttttttctgcgctaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgg
 ttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagatacacaactgtcttctagt
 gtacccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacataacctcgctctgctaactcgttaccagtggtgctgc
 cagtgccgataaagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatattaccggataaggcgagcggctgggctgaacggggg
 gttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcgccac
 gcttcccgaaggagaaaggcgacaggtatccggtgaagcggcaggggtcggaacaggagagcgacagaggaggttcca
 gggggaaaacgcctggtatctttatgtcctgtcggtttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgattgctcgtcagggggg
 cggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggccttttacgggttccgtggcctttgtggcctttgtcacatgttcttctgctt
 atcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgagcga
 gtcagtgagcaggaagcggagagcgcccaatacgcacaacgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgagctgg
 cacgacaggttcccgactggaaaagcgggagtgagcgcaacgcaattaatgtagttagctcactcattaggcaccacaggct
 ttacattttatgcttccggctgtatgttgttggaaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacatgattacg
 ccaagcttgatgcctgcaggtcgactctagaggatcaagagcatttgaatcagaatatggagaacggagcatgagcatttctga
 agtttttagatgcactagaacaaagcgtgttggcttctctgagcccgcttcttataataccgcattctgcagccttacagaatp**

FIG. 2. (CONTINUACIÓN 2)

ctagaaggctctagatgcattcggttgaaaatactcccggtgggtgcaaagagacgcagacggaaaatgtatctgggtctcttatt
gtgtacactactttccatgtaccgaatgtgagtcgccctccctttgcaacaagcagctcgaatgttctagaaaaagggtgaaaata
gtaraaataccgttgaaaataaataccgaacaacatttgctctaattgtgaaattagaaatcttcaactataatcatctcactggatc
cccggttggccaaaggacccaaagggtatgttcgaatgatactaacataacatagaacatittcaggaggacccttgg

FIG. 3.

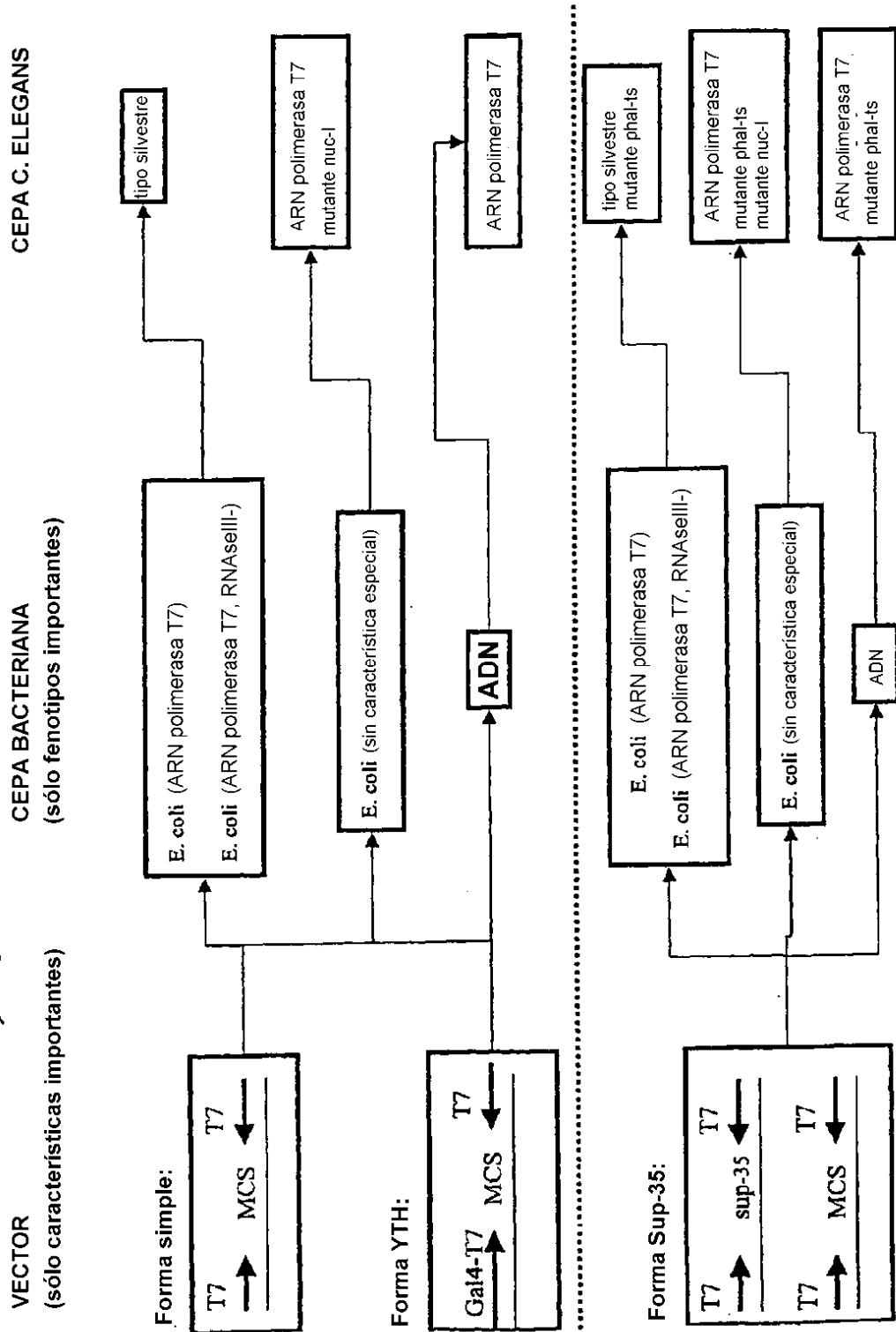


FIG. 4.

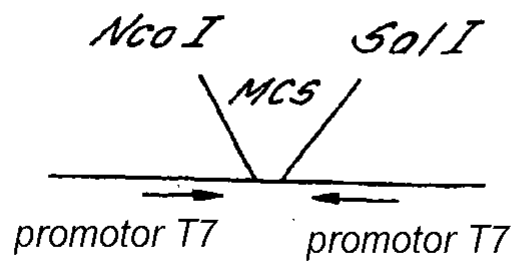
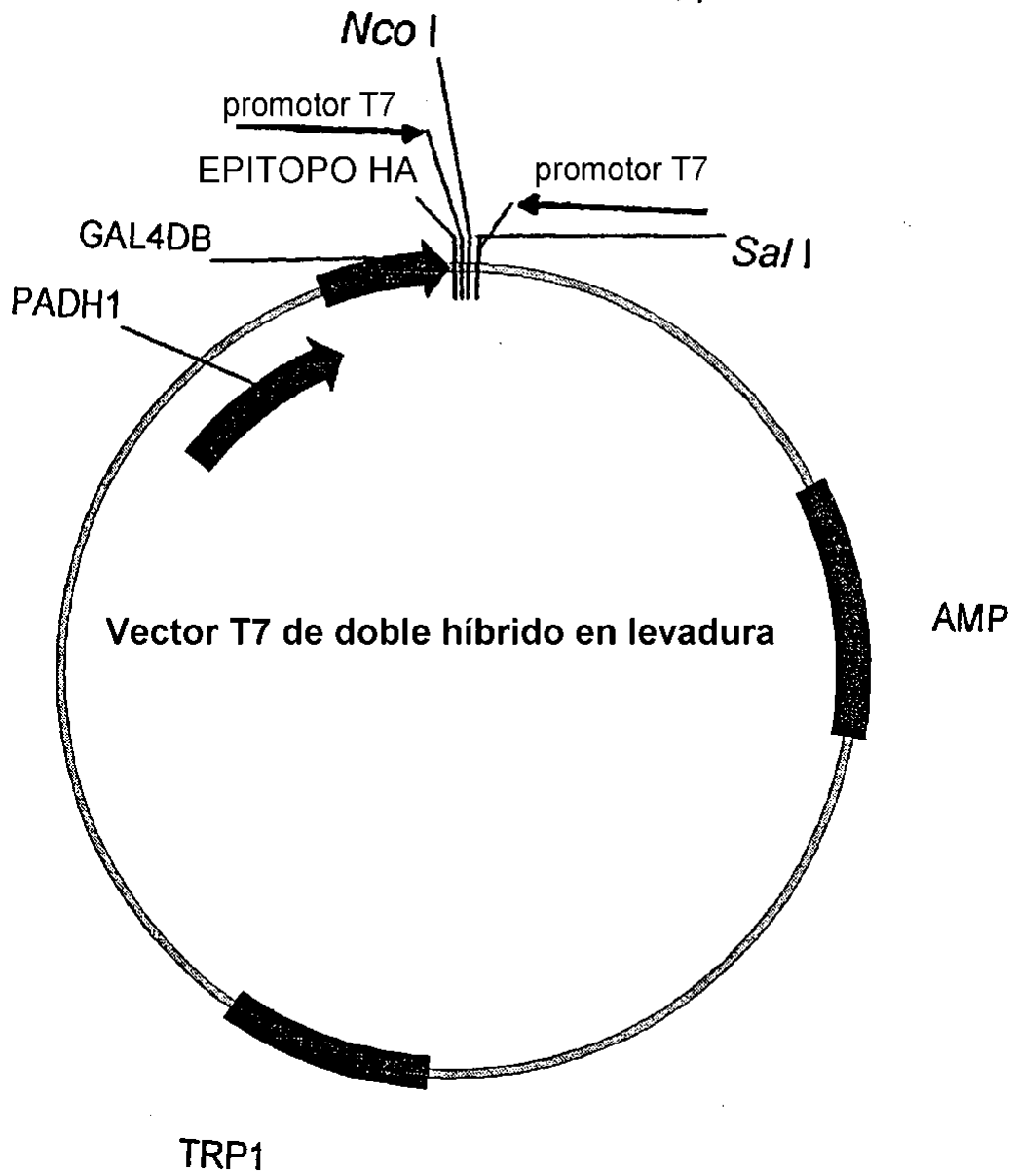


FIG. 5.

**Descripción general del vector de expresión de la ARN
polimerasa T7 de *C. elegans* con 4 ejemplos**

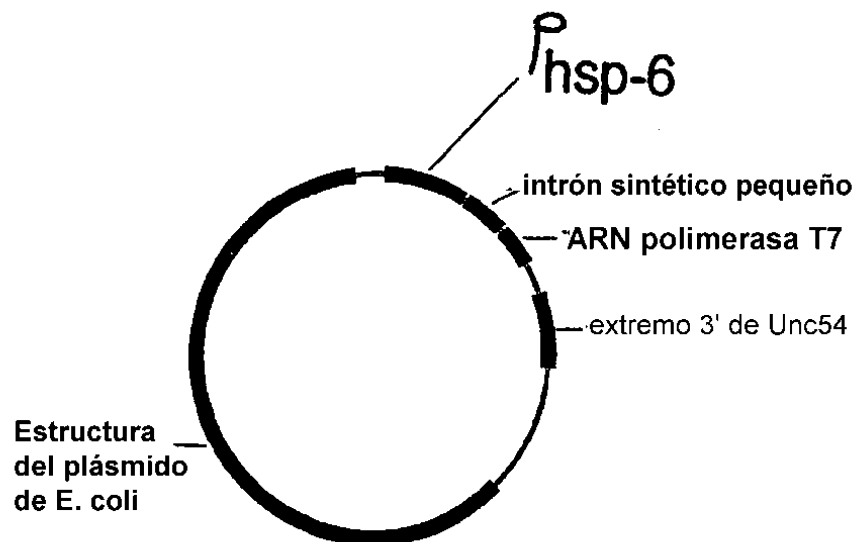


FIG. 5. (CONTINUACIÓN)

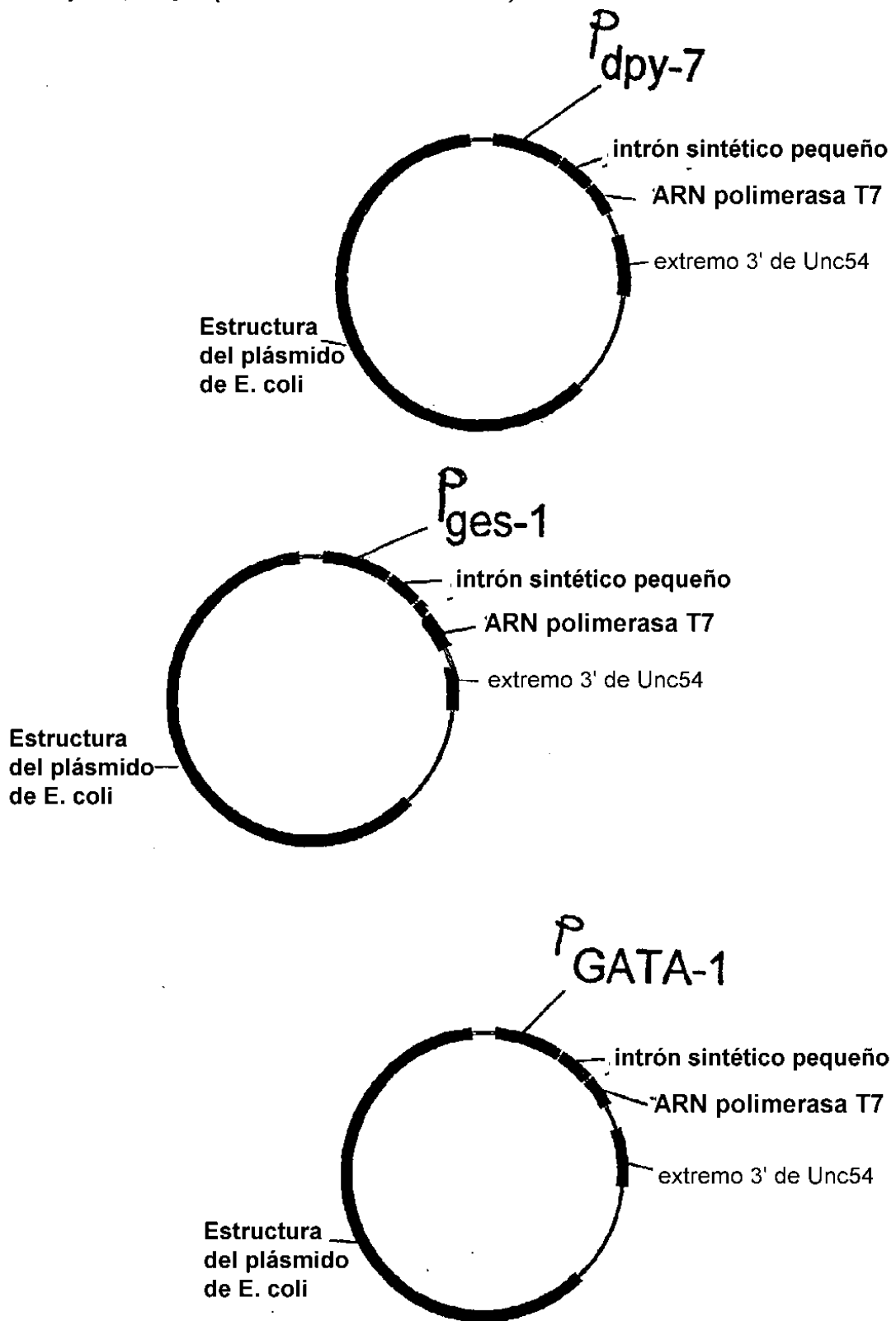


FIG. 6.

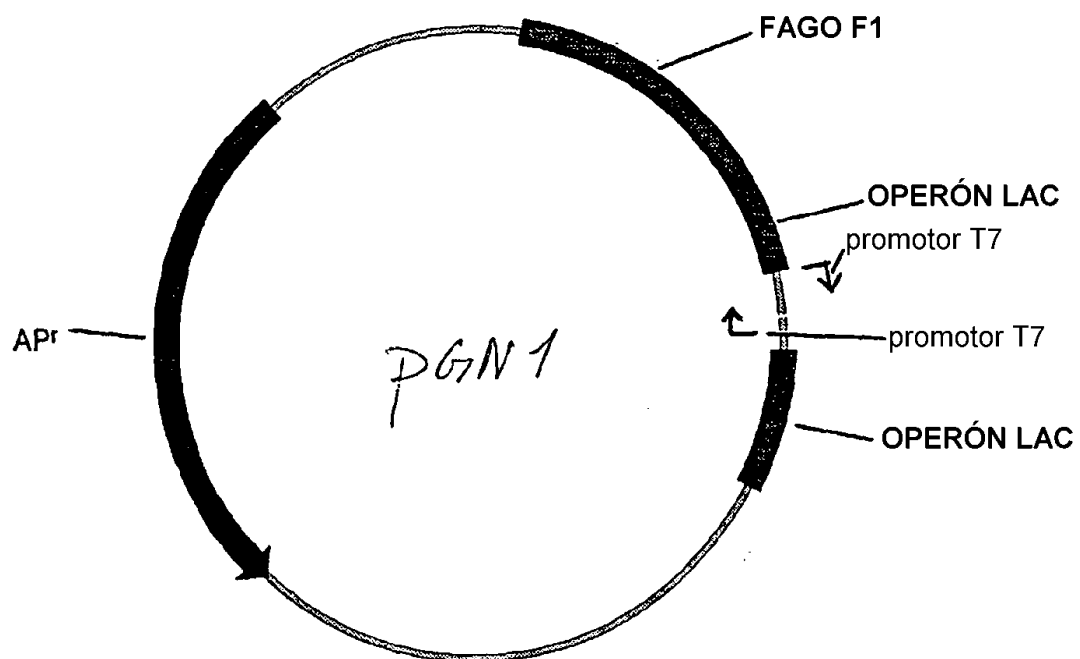
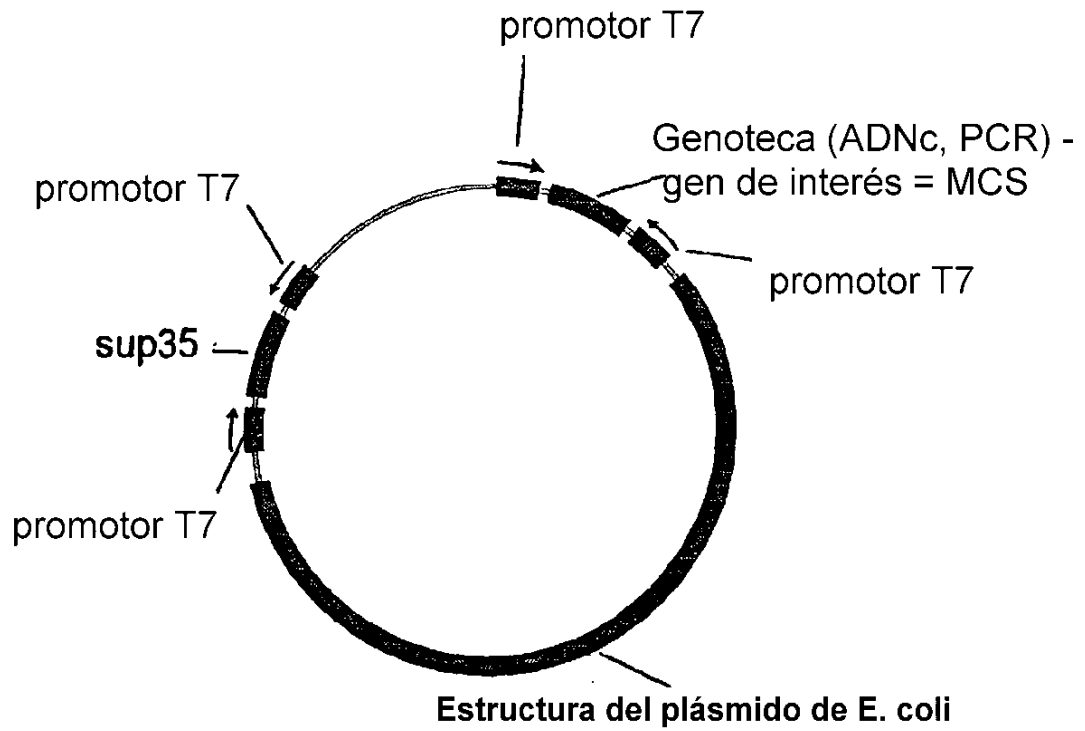


FIG. 7.



vector aumentado para ARNi, que produce ARNbc de sup35 y ARNbc de la genoteca, gen de interés o producto de PCR

FIG. 8.

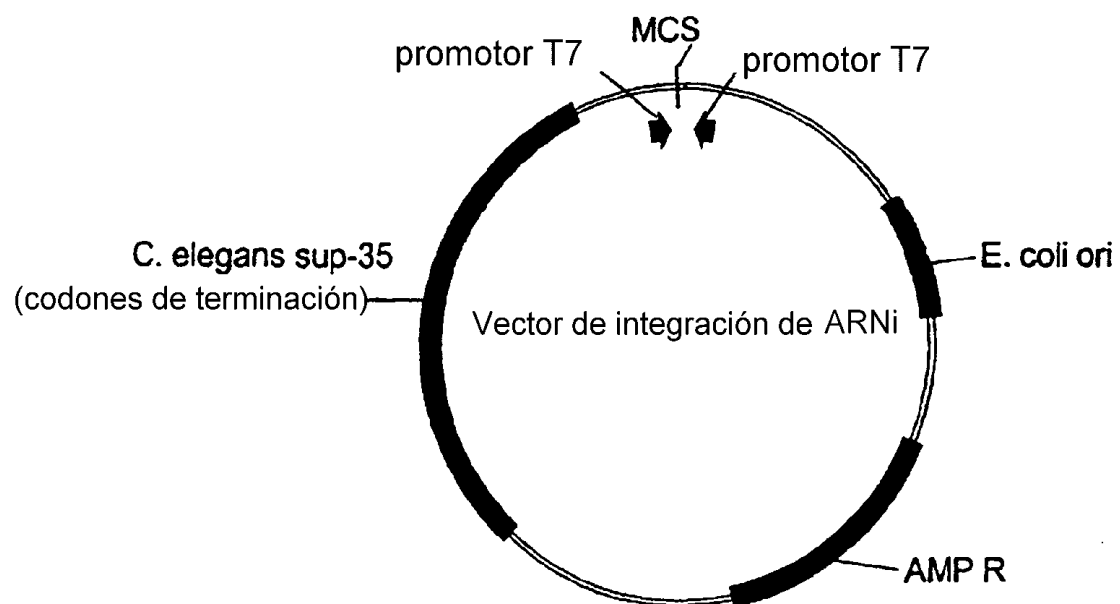


FIG. 9.

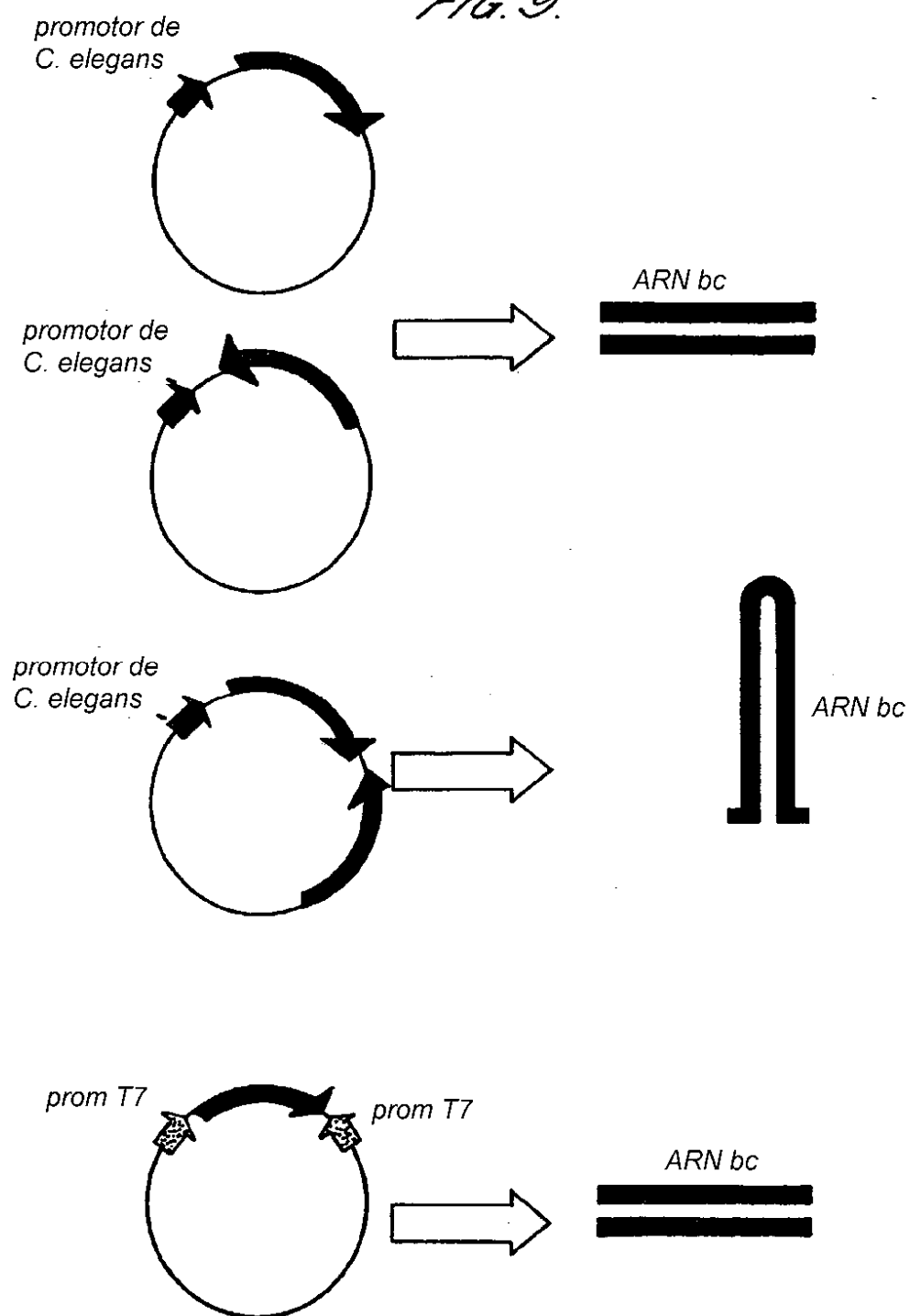


FIG. 10.

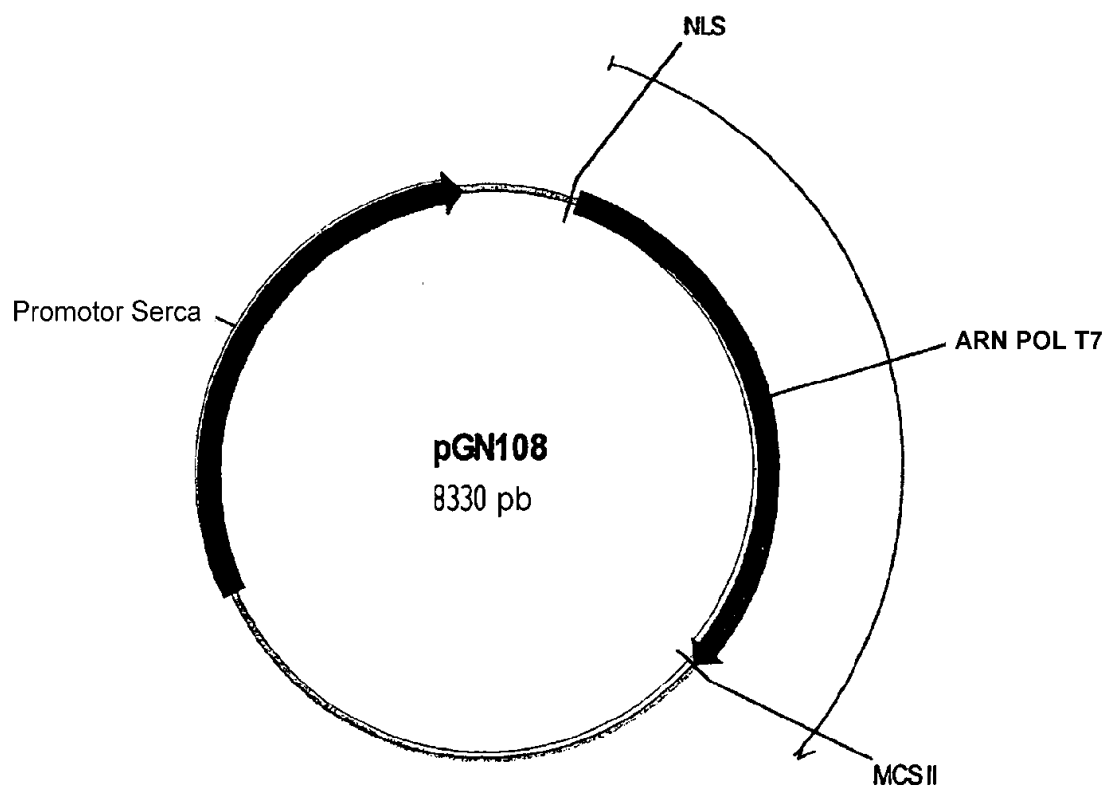


FIG. 11.

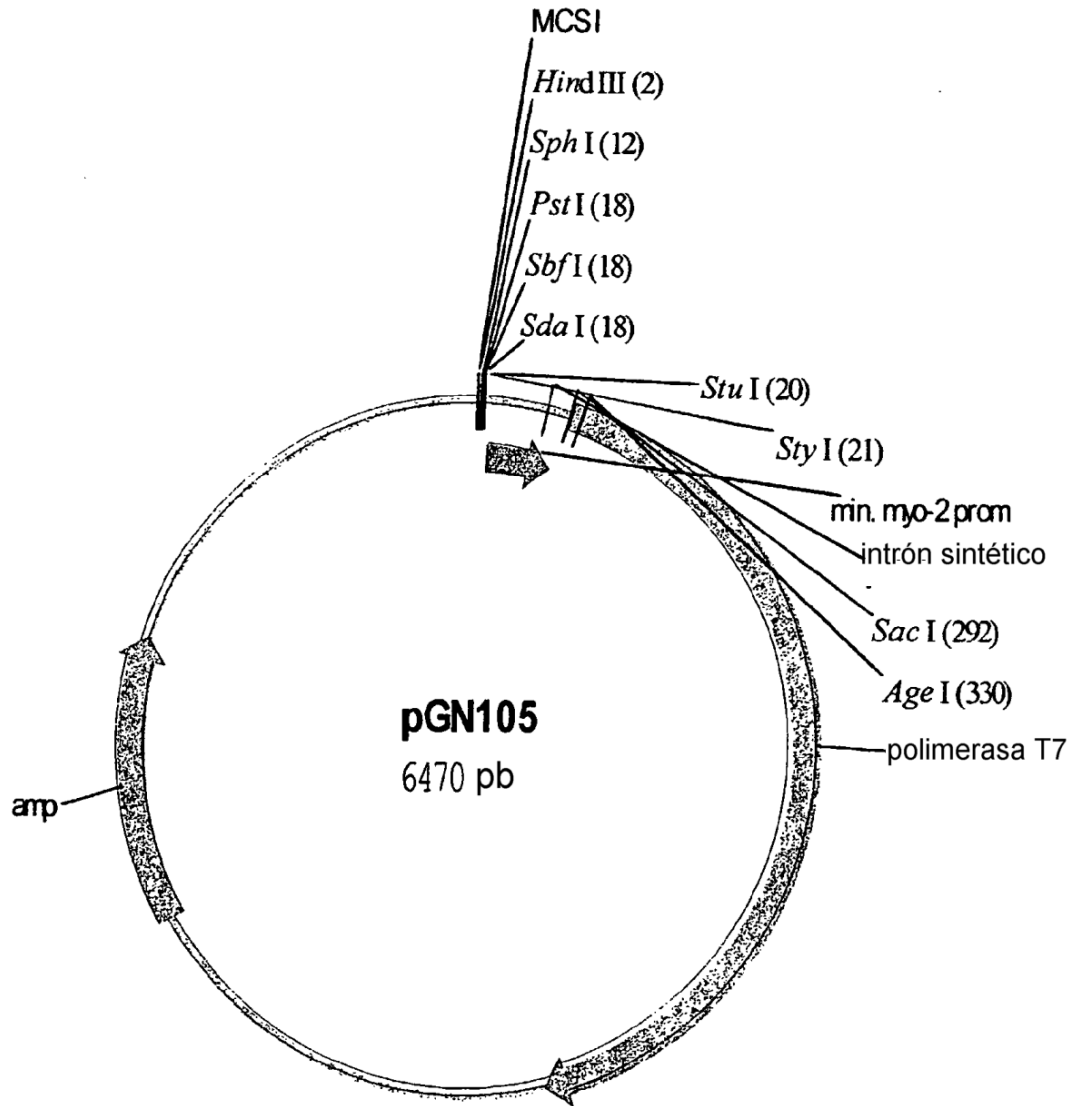


FIG. 12.

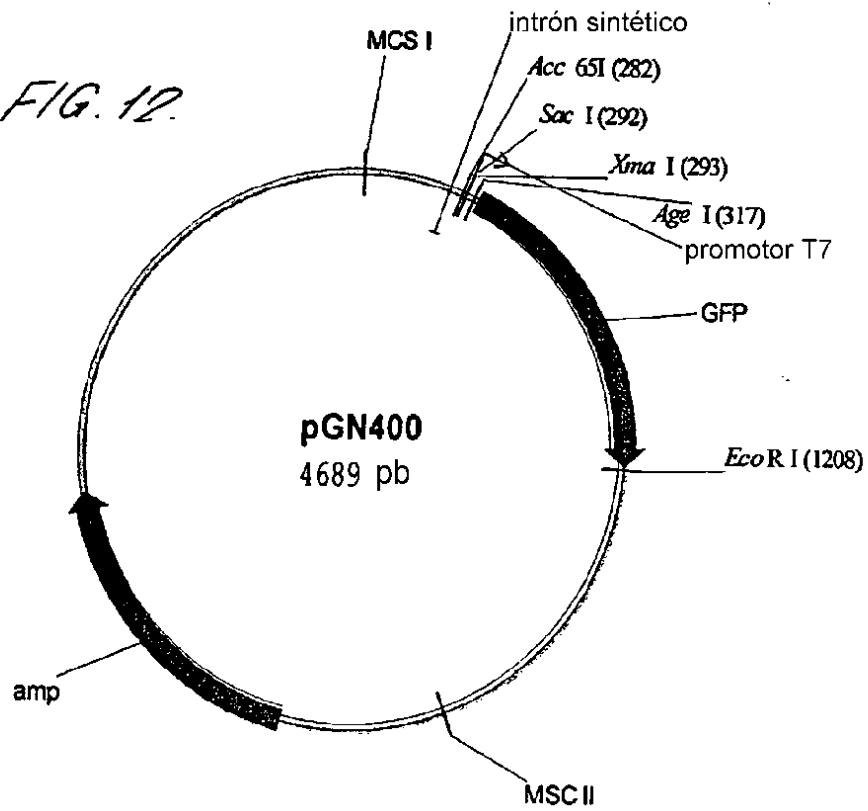


FIG. 13.

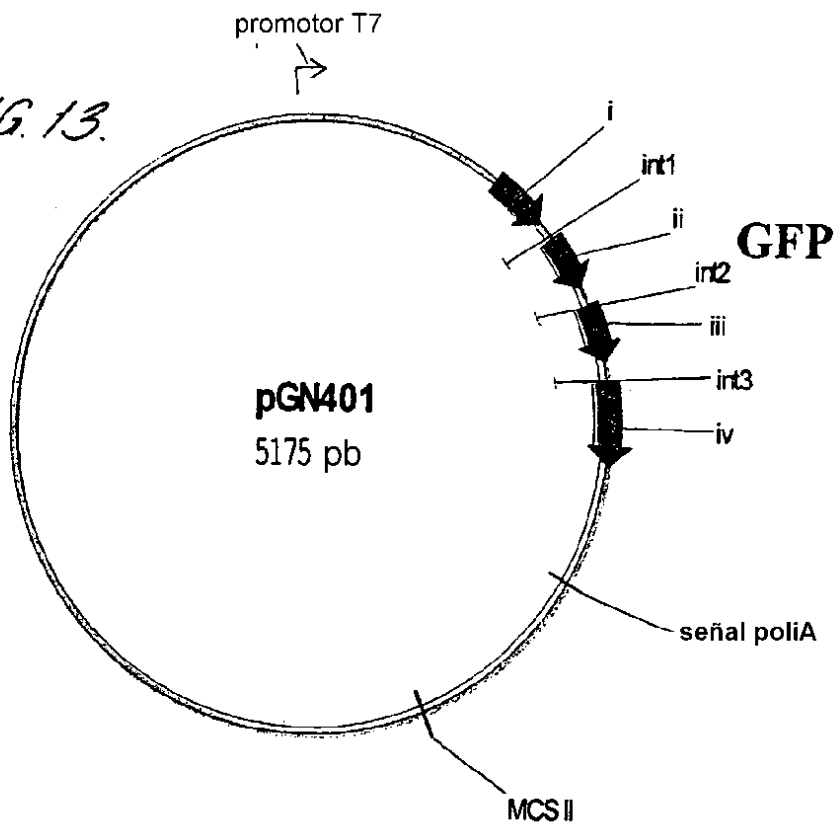


FIG. 14.

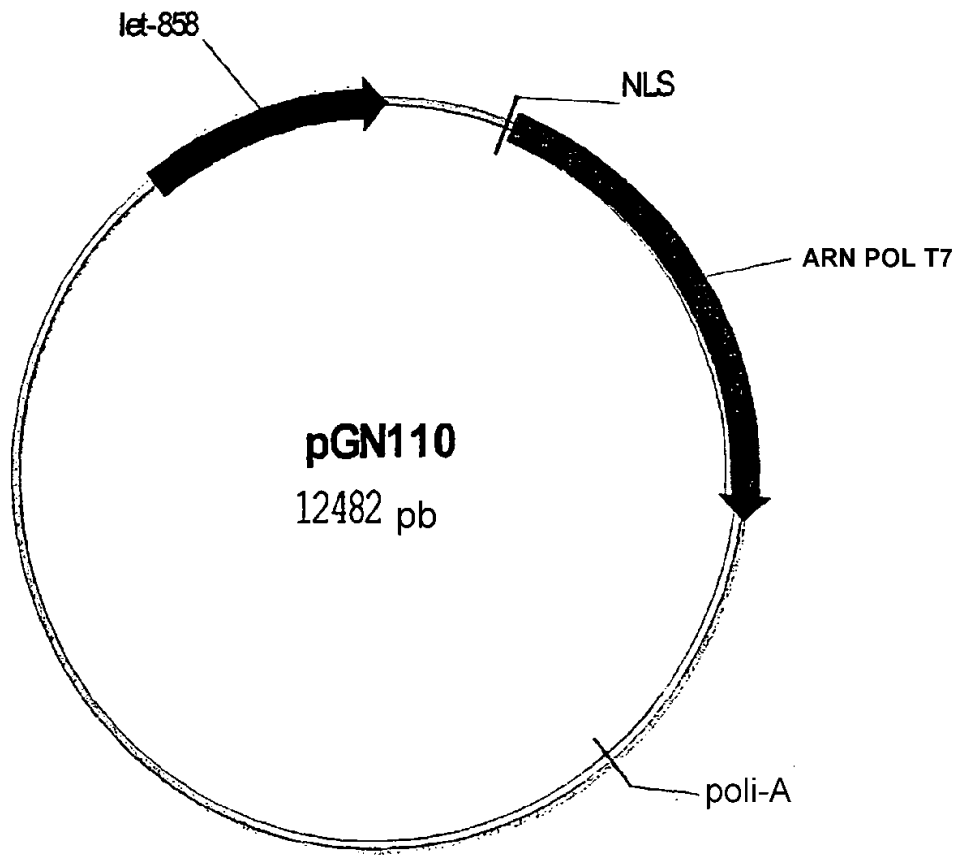


FIG. 15.

pAS2* con T7/T3/Sp6 Directo e Inverso

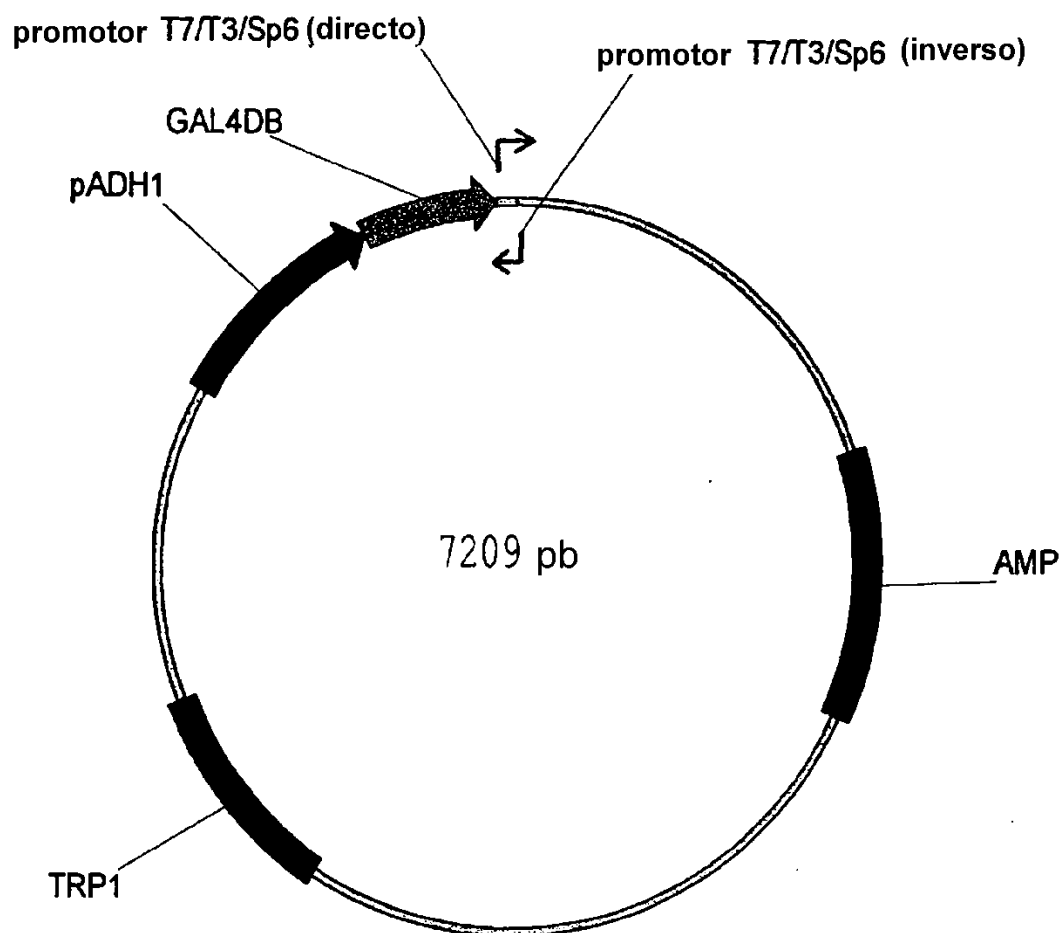


FIG. 16.

pGAD424 con T7/T3/Sp6 Directo e Inverso

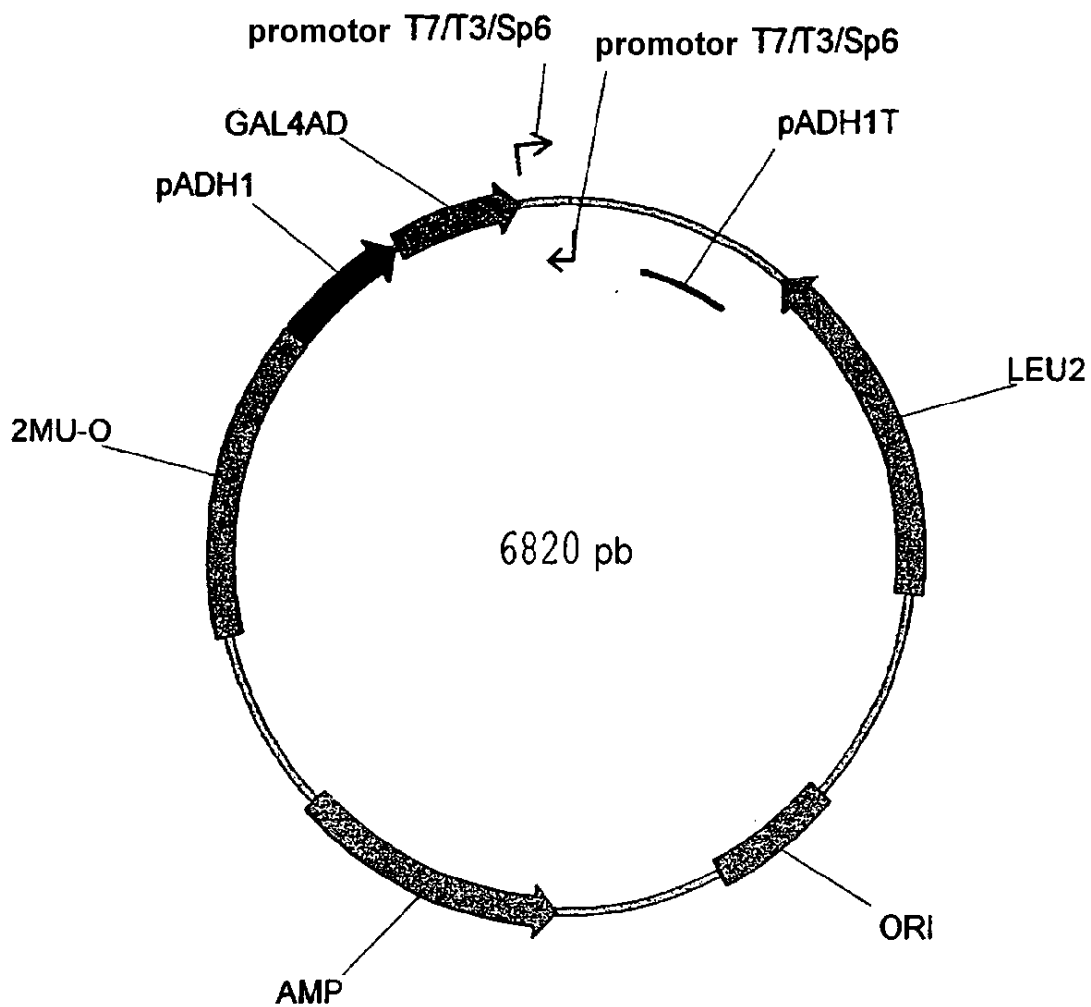


FIG. 17.

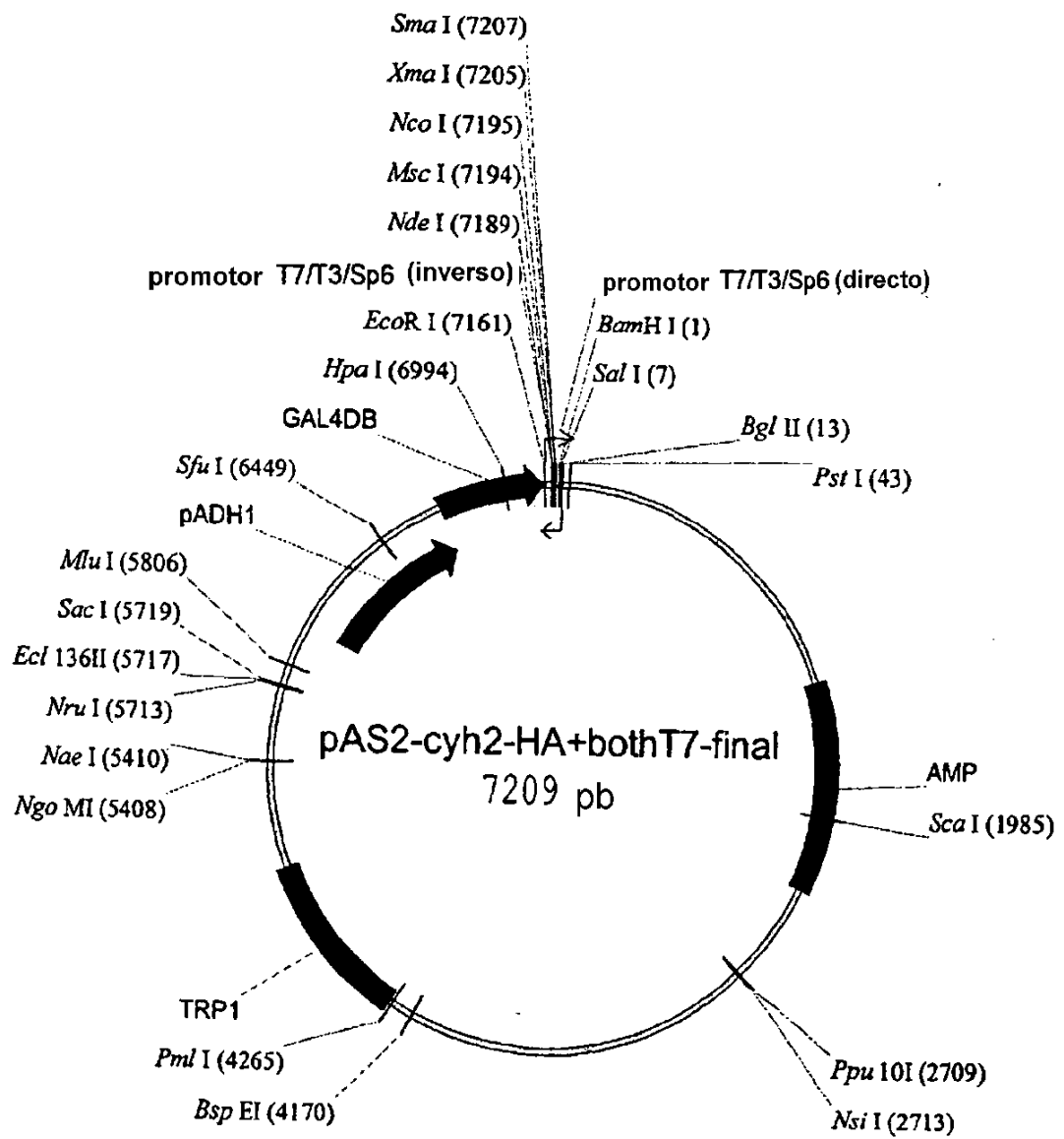


FIG. 18.

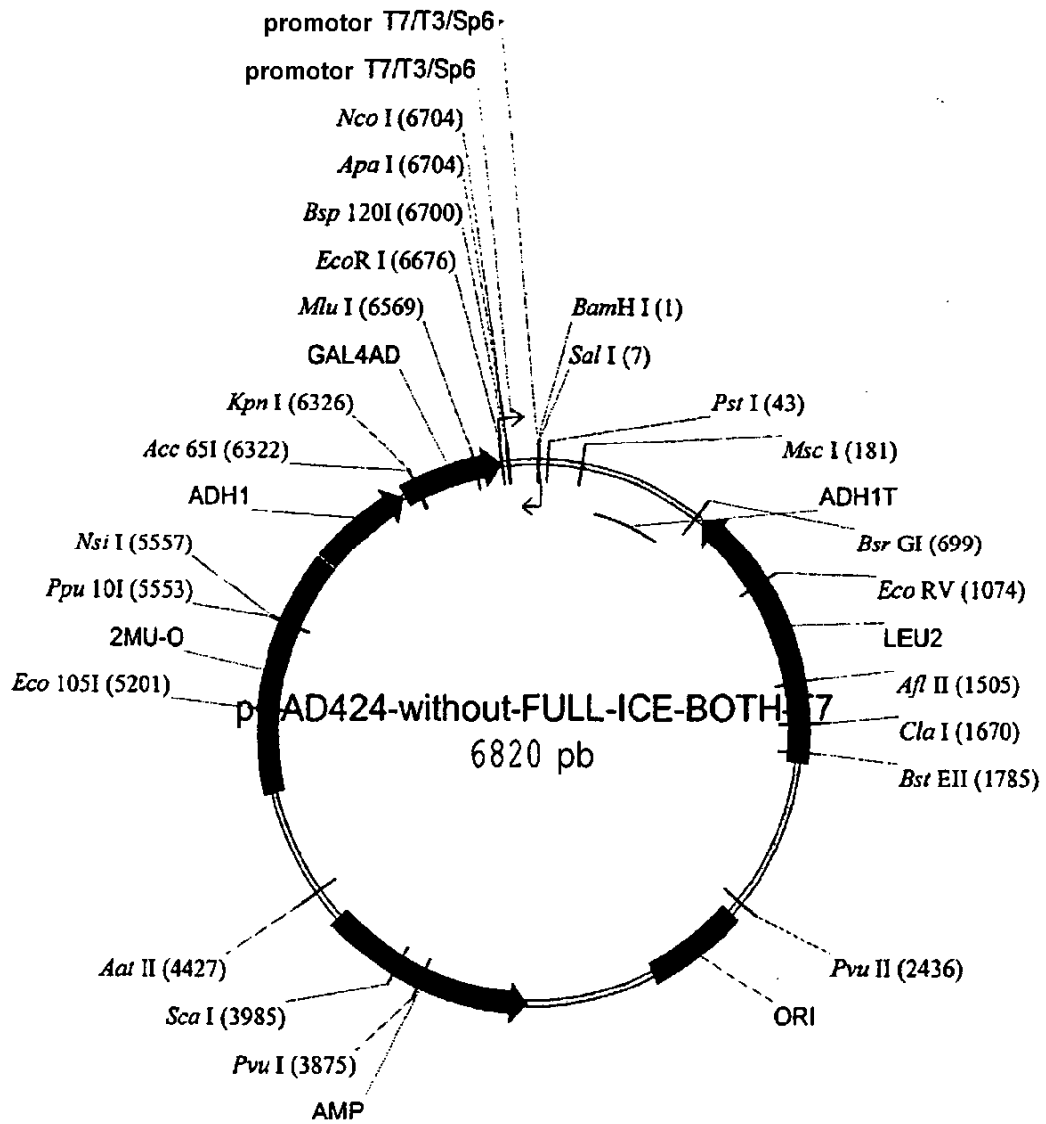


FIG. 19.

