



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612862-9 A2**

(22) Data de Depósito: 14/07/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)



* B R P I 0 6 1 2 8 6 2 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
C12N 15/90

(54) Título: **POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE DNA DE SÍTIO ESPECÍFICO, BIBLIOTECA ISOLADA, MÉTODO DE GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE MOLÉCULAS E MÉTODO PARA SELECIONAR SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO FRT MODIFICADO**

(30) Prioridade Unionista: 18/07/2005 US 60/700,225

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC

(72) Inventor(es): DENNIS BIDNEY, LESZEK A. LYZNIK, WILLIAM J. GORDON-KAMM, YUMIN TAO

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006027380 de 14/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/011733 de 25/01/2007

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE DNA DE SÍTIO ESPECÍFICO, BIBLIOTECA ISOLADA, MÉTODO DE GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE MOLÉCULAS E MÉTODO PARA SELECIONAR SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO FRT MODIFICADO. A presente invenção refere-se a métodos e composições que utilizam populações de sítios de recombinação FRT modificados, randomizados, para identificar, isolar e/ou caracterizar sítios de recombinação FRT modificados. Os sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos podem ser empregados em uma variedade de métodos para a recombinação direcionada de polinucleotídeos de interesse, incluindo métodos para recombinar polinucleotídeos, avaliar a atividade do promotor, selecionar diretamente organismos transformados, minimizar ou eliminar a expressão resultante de integração randômica no genoma de um organismo, tal como uma planta, excisar polinucleotídeos de interesse, combinar cassetes de transferência múltipla, inverter ou remover um polinucleotídeo, e identificar e/ou caracterizar regiões de regulação transcricional. Adicionalmente, é provido um método para obtenção de uma célula transformada compreendendo a transformação da célula com um polinucleotídeo e o cultivo da dita célula sob condições de crescimento, além de um método de obtenção de uma planta transformada compreendendo a transformação de uma célula e a regeneração da planta transformada.

POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE DNA DE SÍTIO ESPECÍFICO, BIBLIOTECA ISOLADA, MÉTODO DE GERAÇÃO DE
5 BIBLIOTECA DE MOLÉCULAS E MÉTODO PARA SELECIONAR SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO FRT MODIFICADO

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção está relacionada a sistemas de recombinação sítio-específicos e métodos de uso.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A inserção randômica de DNA introduzido no genoma de
10 uma célula hospedeira pode ser letal se o DNA estrangeiro introduza em, e dessa forma mutar, um gene nativo criticamente importante. Além disso, mesmo se um evento de inserção randômica não provoca o funcionamento de um gene de uma célula hospedeira, a expressão de uma seqüência de
15 nucleotídeos estrangeira inserida pode ser influenciada por efeitos de posição causados pelo DNA genômico ao redor. Em alguns casos, a seqüência de nucleotídeos é inserida em um sítio onde o efeito de posição é forte o suficiente para suprimir a função ou regulação da seqüência de nucleotídeos
20 introduzida. Em outras instâncias, a sobreprodução do produto gênico possui efeitos deletérios em uma célula.

Por exemplo, em plantas, efeitos de posição podem resultar em agronomia reduzida, custos adicionais para
25 pesquisa adicional, criação de eventos transgênicos adicionais, e tempo mais lento para o produto. Por essas razões, métodos eficientes são necessários para direcionar a inserção de seqüências de nucleotídeos no genoma de

vários organismos, tais como plantas, em posições cromossômicas que permitem a função desejada da seqüência de interesse.

5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São providos métodos e composições usando populações de sítios de recombinação FRT randomizados modificados para identificar, isolar e/ou caracterizar sítios de recombinação FRT modificados. Os sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos podem ser empregados em uma variedade de métodos para recombinação direcionada de polinucleotídeos de interesse, incluindo métodos para recombinar polinucleotídeos, avaliar atividade promotora, selecionar diretamente organismos transformados, minimizar ou eliminar expressão resultante de integração randômica no genoma de um organismo, tal como uma planta, remover polinucleotídeos de interesse, combinar múltiplos cassetes de transferência, inverter ou excisar um polinucleotídeo, e identificar e/ou caracterizar regiões de regulação transcrpcionais, são também providos.

Adicionalmente, é provido um método para obtenção de uma célula transformada compreendendo a transformação da célula com um polinucleotídeo e o cultivo da dita célula sob condições de crescimento, além de um método de obtenção de uma planta transformada compreendendo a transformação de uma célula e a regeneração da planta transformada.

30 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Métodos e composições usando sítios de recombinação FRT modificados incluem, mas não são limitados aos seguintes:

1. Método para selecionar a recombinogênico sítio de recombinação FRT modificado compreendendo:

- 5 a) prover uma primeira população de plasmídios, caracterizada pelo fato de que cada plasmídio em dita primeira população compreende um primeiro marcador de seleção comum; e, cada plasmídio em dita primeira população compreende um membro de
- 10 uma população de sítios de recombinação FRT modificados;
- b) prover uma segunda população de plasmídios caracterizada pelo fato de que cada plasmídio em dita segunda população compreende um segundo
- 15 marcador de seleção comum, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo marcadores de seleção são distintos; e, cada plasmídio em dita segunda população compreende um
- 20 membro da população de sítios de recombinação FRT modificados;
- c) combinar dita primeira população de plasmídios com dita segunda população de plasmídios na
- 25 presença de uma FLP recombinase sob condições onde a recombinação sítio-específica possa ocorrer; e,

d) selecionar um plasmídio co-integrante compreendendo o primeiro e o segundo marcador de seleção, dito plasmídio co-integrante compreendendo o sítio de recombinação FRT
5 modificado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada membro de dita população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados compreende uma
10 região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de nucleotídeo em SEQ ID NO:43.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita primeira e dita segunda população de
15 plasmídios são combinadas na presença da FLP recombinase.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito plasmídio co-integrante compreende a
sítio de recombinação FRT modificado funcional.

20

5. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo, ainda, isolar o plasmídio co-integrante.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo
25 ainda caracterizar o sítio de recombinação FRT modificado de dito plasmídio co-integrante.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que caracterizar o sítio de recombinação FRT modificado compreende determinar a eficiência de excisão.
- 5 8. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que caracterizar o sítio de recombinação FRT modificado compreende determinar a especificidade de recombinação.
- 10 9. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que caracterizar os sítios de recombinação FRT modificados compreende seqüenciar o sítio de recombinação FRT modificado do plasmídio co-integrante.
- 15 10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro ou dito segundo marcadores de seleção é selecionado do grupo consistindo de ampicilina e espectinomicina.
- 20 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita primeira população de plasmídios e dita segunda população de plasmídios são combinadas em uma razão eqüimolar.
- 25 12. Uma biblioteca isolada compreendendo uma população de plasmídios, caracterizada pelo fato de que cada plasmídio em dita população compreende um marcador de seleção comum; e, cada plasmídio em dita população compreende um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados,

caracterizado pelo fato de que dita população de plasmídios compreende pelo menos cerca de 5 membros distintos da população de plasmídios.

5 13. Biblioteca isolada de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que cada membro de dita população de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de nucleotídeo em SEQ ID NO:43.

10

14. Biblioteca isolada de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizada pelo fato de que ditos sítios de recombinação FRT modificados de dita população são recombinogênicos.

15

15. Biblioteca isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que o marcador de seleção é selecionado do grupo consistindo de ampicilina e espectinomicina.

20

16. Biblioteca isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, caracterizada pelo fato de que dita população de plasmídios compreende pelo menos cerca de 100 membros distintos da população de plasmídios.

25

17. Biblioteca isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, caracterizada pelo fato de que dita população de plasmídios compreende pelo menos um sítio FRT recombinogênico modificado compreendendo uma região de

espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18.

5 18. Biblioteca isolada de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que dita população de plasmídios compreende pelo menos um sítio FRT recombinogênico modificado selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,
10 36, 37, ou 38.

19. Um kit compreendendo

15 a) uma primeira população de plasmídios, caracterizada pelo fato de que cada plasmídio em dita primeira população compreende um primeiro marcador de seleção comum; e, cada plasmídio em dita primeira população compreende um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados; e,
20

b) uma segunda população de plasmídios, caracterizada pelo fato de que cada plasmídio em dita segunda população compreende um segundo marcador de seleção comum, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo marcadores de seleção são distintos; e, cada plasmídio em dita segunda população compreende um
25

membro da população de sítios de recombinação FRT modificados.

20. O *kit* de acordo com a reivindicação 19, caracterizado
5 pelo fato de que dito *kit* compreende ainda uma FLP
recombinase ou um polinucleotídeo codificando dita FLP
recombinase.

21. O *kit* de acordo com a reivindicação 20, caracterizado
10 pelo fato de que dito *kit* compreende o polinucleotídeo
codificando um variante biologicamente ativo da FLP
recombinase ou um fragmento biologicamente ativo da FLP
recombinase.

22. *Kit* de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a
15 21, caracterizado pelo fato de que pelo menos um membro de
dita primeira população, ou dita segunda população de
sítios de recombinação FRT modificados, ou ambas populações
compreende

20

a) uma região de espaçamento compreendendo pelo
menos uma alteração de nucleotídeo em SEQ ID
NO:43; e

25 b) uma região de espaçamento selecionada do grupo
consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9,
10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ou 21, 22,
23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,
36, 37, ou 38.

23. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que cada membro de dita primeira e dita segunda população de sítio de recombinação
5 FRT modificado é recombinogênico.

24. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro ou dito segundo marcador de seleção é selecionado
10 do grupo consistindo de ampicilina e espectinomicina.

25. Método para gerar uma biblioteca de moléculas compreendendo:

15 a) prover uma população de sítios de recombinação FRT modificados; e,

b) promover o contato de dita população de sítios de recombinação FRT modificados com uma população de
20 plasmídios tendo um marcador de seleção comum sob condições para a inserção de dita população de sítios de recombinação FRT modificados em dita população de plasmídios, de forma que cada dos plasmídios de dita população compreende um único
25 membro da população de sítios de recombinação FRT modificados, pelo qual uma biblioteca de moléculas é gerada.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que cada membro de dita população de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de 5 nucleotídeo em SEQ ID NO:43.

27. Um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de nucleotídeos compreendendo pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional, dito sítio de 10 recombinação FRT modificado funcional compreendendo uma região de espaçamento seqüência selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18.

15 28. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que dito sítio de recombinação FRT modificado funcional compreende SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, 20 caracterizado pelo fato de que dito variante funcional é substancialmente idêntico a SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

29. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 25 28, caracterizado pelo fato de que dito sítio de recombinação FRT modificado funcional compreende SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

30. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 27, 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo compreende um segundo sítio de recombinação.

5

31. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que dito segundo sítio de recombinação é selecionado do grupo consistindo de um sítio FRT, um sítio FRT mutante, um sítio LOX, ou um sítio LOX mutante.

10

32. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que dito segundo sítio de recombinação é selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

15

33. Polinucleotídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que dito segundo sítio de recombinação é dissimilar e não recombinogênico com respeito ao sítio de recombinação FRT modificado funcional.

20

34. Polinucleotídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que dito sítio de recombinação FRT modificado funcional e dito segundo sítio de recombinação são sítios de recombinação correspondentes.

25

35. Célula compreendendo o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 34.

5 36. Célula de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que dita célula é de uma planta.

10 37. Célula de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo é estavelmente integrado no genoma de dita célula.

38. Célula de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que dita célula é de uma planta monocotiledônea.

15

39. Célula de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que dita célula de planta monocotiledônea é de milho, cevada, milhete, trigo, sorgo, centeio, ou arroz.

20 40. Célula de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que dita célula vegetal é de uma planta dicotiledônea.

25 41. Célula de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que dita célula de planta dicotiledônea é de soja, canola, alfafa, girassol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis*, ou algodão.

42. Planta compreendendo uma célula como definida em qualquer uma das reivindicações 36 a 41.

43. Sementes tendo integrado estavelmente em seu genoma o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 34.

44. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 42, caracterizada pelo fato de que dita célula possui, ainda, estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo codificando uma FLP recombinase.

45. Célula de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que dito polinucleotídeo codifica um variante biologicamente ativo da FLP recombinase.

46. Método para determinar a eficiência relativa de excisão de recombinação de um primeiro e um segundo sítio de recombinação FRT compreendendo:

20

- a) prover um polinucleotídeo compreendendo o primeiro e o segundo sítio de recombinação FRT, caracterizado pelo fato de que a seqüência de espaçamento de dito primeiro ou dito segundo sítio de recombinação FRT é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

25

b) prover uma FLP recombinase sob condições, de forma que dita FLP recombinase implemente um evento de excisão mediada por recombinase; e,

5 c) determinar a eficiência de excisão de dito primeiro e dito segundo sítio de recombinação FRT relativa a uma reação controle, caracterizado pelo fato de que a reação controle é feita sob condições idênticas usando sítios de recombinação FRT do tipo selvagem como o primeiro e o segundo sítios de recombinação FRT.

10

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação FRT são sítios de recombinação correspondentes.

15

48. Método para identificar sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos compreendendo:

20 a) prover um primeiro sítio de recombinação FRT, caracterizado pelo fato de que a seqüência de espaçamento é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e18;

25

b) prover um segundo sítio de recombinação FRT dissimilar;

- c) prover uma FLP recombinase sob condições, de forma que dita FLP recombinase implemente um evento de recombinação; e,
- 5 d) testar um evento de recombinação para, dessa forma, determinar se o primeiro e o segundo sítios de recombinação são não recombinogênicos.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações
10 46 a 48, caracterizado pelo fato de que dito primeiro sítio de recombinação FRT compreende SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de que dito variante funcional é substancialmente idêntico a SEQ
15 ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que dito primeiro sítio de recombinação FRT
20 compreende SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, caracterizado pelo fato de que dito método ocorre
25 *in vivo*.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que prover ou mais ditos primeiros sítios FRT ou ditos segundos sítios FRT compreende transformação.

53. Método para produzir recombinação sítio específica de DNA compreendendo:

- 5 a) prover um primeiro fragmento de DNA compreendendo um primeiro sítio de recombinação sítio-específico, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação sítio-específico compreende um polinucleotídeo que é selecionado do grupo consistindo de:
- 10
- i) um sítio de recombinação FRT tendo uma região de espaçamento selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;
- 15 e
- ii) um sítio de recombinação FRT selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, e 38;
- 20
- b) prover um segundo fragmento de DNA compreendendo um segundo sítio de recombinação sítio-específico o qual é recombinogênico com o primeiro sítio de recombinação sítio-específico; e,
- 25
- c) prover uma recombinase sítio-específica que catalisa uma recombinação sítio-específica entre

o primeiro e o segundo sítios de recombinação sítio-específicos.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado
5 pelo fato de que o primeiro fragmento de DNA e o segundo
fragmento de DNA são providos em uma única molécula de
polinucleotídeo.

55. Método de acordo com a reivindicação 53 ou 54,
10 caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de
recombinação sítio-específico e o segundo sítio de
recombinação sítio-específico são sítios correspondentes.

56. Método de acordo com a reivindicação 53 ou 54,
15 caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de
recombinação sítio-específico e o segundo sítio de
recombinação sítio-específico são sítios dissimilares.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações
20 53 a 56, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de
recombinação sítio-específico e o segundo sítio de
recombinação sítio-específico são diretamente orientados,
relativo um ao outro.

25 58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado
pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de
recombinação sítio-específicos flanqueiam um primeiro
polinucleotídeo de interesse, pelo qual prover a

recombinase sítio-específica excisa o primeiro polinucleotídeo de interesse.

59. Método de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a excisão do primeiro polinucleotídeo de interesse ativa a expressão de um segundo polinucleotídeo de interesse.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 56, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação sítio-específico e o segundo sítio de recombinação sítio-específico estão em orientação oposta relativos um ao outro.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação sítio-específicos flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, pelo qual prover a recombinase sítio-específica inverte o primeiro polinucleotídeo de interesse.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a inversão do primeiro polinucleotídeo de interesse ativa a expressão do primeiro polinucleotídeo de interesse.

63. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a inversão do primeiro polinucleotídeo de

interesse ativa a expressão de um segundo polinucleotídeo de interesse.

5 64. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o primeiro fragmento de DNA é provido em um primeiro polinucleotídeo e o segundo fragmento de DNA é provido em um segundo polinucleotídeo separado.

10 65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo é uma molécula circular.

15 66. Método de acordo com a reivindicação 64 ou 65, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo compreende, ainda, um polinucleotídeo de interesse.

20 67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 66, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação sítio-específico é um sítio de recombinação FRT modificado compreendendo um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, e 38.

25 68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 67, caracterizado pelo fato de que a recombinação sítio-específica ocorre *in vivo*.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a recombinação sítio-específica ocorre em uma célula eucarionte.

5 70. Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que a célula eucarionte é uma célula vegetal.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a célula vegetal é de uma planta
10 selecionada do grupo consistindo de milho, arroz, trigo, cevada, milhete, sorgo, centeio, soja, alfafa, canola, *Arabidopsis*, tabaco, girassol, algodão, e cártamo.

72. Método para direcionar a inserção de um
15 polinucleotídeo de interesse a um sítio alvo compreendendo:

a) prover o sítio alvo compreendendo um primeiro
sítio de recombinação funcional compreendendo uma
seqüência de espaçamento selecionada do grupo
20 consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9,
10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

b) prover um cassete de transferência compreendendo
um segundo sítio de recombinação funcional e dito
25 polinucleotídeo de interesse, caracterizado pelo
fato de que dito primeiro e dito segundo sítios
de recombinação são recombinogênicos com respeito
um ao outro; e,

- c) prover uma recombinase caracterizada pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, e o polinucleotídeo de interesse é inserido no sítio alvo.

73. Método para direcionar a inserção de um polinucleotídeo de interesse a um sítio alvo, dito método compreendendo:

- a) prover o sítio alvo compreendendo um primeiro e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro; e pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

- b) prover um cassete de transferência compreendendo o polinucleotídeo de interesse, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo de interesse é flanqueado por dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação, e,

- c) prover uma recombinase, caracterizada pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa

recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, e o polinucleotídeo de interesse é inserido no sítio alvo.

5 74. Método de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo compreende um segundo polinucleotídeo de interesse flanqueado por dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação.

10 75. Método para avaliar a atividade promotora em uma célula compreendendo:

15 a) prover a célula tendo em seu genoma um sítio alvo compreendendo um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcionais, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombino-gênicos, e pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação
20 compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18; e,

25 b) prover à dita célula um cassete de transferência compreendendo um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo compreendendo um marcador de seleção, caracterizado pelo fato de que dito

cassete de transferência é flanqueado pelo primeiro e pelo segundo sítios de recombinação,

- 5 c) prover uma recombinase, caracterizado pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, pelo qual dito cassete de transferência é integrado ao sítio alvo; e,
- 10 d) monitorar a expressão do marcador de seleção para avaliar a atividade promotora.

76. Método para selecionar diretamente uma célula transformada, dito método compreendendo:

15

- a) prover uma população de células compreendendo um polinucleotídeo compreendendo, na seguinte ordem, um promotor operacionalmente ligado a um sítio alvo, caracterizado pelo fato de que o sítio alvo compreende um primeiro sítio de recombinação e um
- 20 segundo sítio de recombinação, dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um de dito primeiro e
- 25 dito segundo sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

b) introduzir em dita população de células um cassette de transferência compreendendo, na seguinte ordem, o primeiro sítio de recombinação, um polinucleotídeo codificando um gene marcador de seleção não operacionalmente ligado a um promotor, e o segundo sítio de recombinação;

5

c) prover uma recombinase, caracterizado pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação; e,

10

d) cultivar dita população de células em um agente seletivo apropriado para selecionar diretamente a célula expressando o marcador de seleção.

15

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 76, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo é estavelmente incorporado no genoma de uma célula.

20

78. Método para minimizar ou eliminar a expressão resultante de integração randômica de uma molécula de ácido nucléico de interesse em um genoma de uma célula compreendendo:

25

a) prover a célula tendo estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo compreendendo, na seguinte ordem: um promotor ativo em dita célula operacionalmente ligado a um sítio ATG de início

de tradução operacionalmente ligado a um sítio alvo compreendendo um primeiro e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos, e pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

b) prover a dita célula um cassete de transferência compreendendo, na seguinte ordem: o primeiro sítio de recombinação, a molécula de ácido nucléico de interesse, e o segundo sítio de recombinação, caracterizado pelo fato de que o sítio ATG de início de tradução da molécula de ácido nucléico de interesse foi substituído com dito primeiro sítio de recombinação; e,

c) prover uma recombinase, caracterizado pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, pelos quais a molécula de ácido nucléico de interesse é integrada no sítio alvo e, dessa forma, operacionalmente ligada ao promotor e sítio de início de tradução do polinucleotídeo.

79. Método para excisar ou inverter um polinucleotídeo de interesse em uma célula compreendendo:

- 5 a) prover uma célula tendo um cassete de transferência compreendendo o polinucleotídeo de interesse flanqueado por um primeiro e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo
- 10 sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos e caracterizados pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo
- 15 de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;
- b) prover a dita célula um oligonucleotídeo isolado capaz de direcionar uma conversão de nucleotídeo
- 20 em um do primeiro ou do segundo sítios de recombinação, de forma a criar dois sítios de recombinação correspondentes; e,
- c) prover uma recombinase, caracterizado pelo fato
- 25 de que dita recombinase que implementa recombinação nos sítios de recombinação correspondentes, pelos quais o polinucleotídeo de interesse é excisado ou invertido.

80. Método de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que ditos sítios de recombinação correspondentes são diretamente repetidos.

5 81. Método de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que ditos sítios de recombinação correspondentes são invertidos.

10 82. Método de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo de interesse é um promotor ou codifica um polipeptídeo.

83. Método para localizar sítios de integração preferidos no genoma de uma célula, dito método compreendendo:

15

a) introduzir em dita célula um sítio alvo compreendendo, na seguinte ordem: um primeiro sítio de recombinação funcional, um promotor ativo em dita célula operacionalmente ligado a um polinucleotídeo, e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos, e caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

20

25

b) determinar o nível de expressão de dito polinucleotídeo; e,

5 c) selecionar a célula expressando dito polinucleotídeo.

84. Método de acordo com a reivindicação 83, compreendendo, ainda, introduzir na célula um cassete de
10 transferência compreendendo um polinucleotídeo de interesse flanqueado por dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação; e, prover uma recombinase, caracterizado pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de
15 recombinação, pelos quais o cassete de transferência é integrado no sítio preferido.

85. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 75 a 84, caracterizado pelo fato de que dita célula tem
20 estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo codificando dita recombinase.

86. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 84, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de
25 ditos sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos é selecionado do grupo consistindo de um sítio FRT, um variante funcional do sítio FRT, um sítio LOX, e um variante funcional do sítio LOX.

87. Método de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que um de ditos sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos compreende um sítio FRT ou um variante funcional do sítio FRT.

5

88. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que dito variante funcional do sítio FRT é selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, ou 42.

10

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 84, caracterizado pelo fato de que dita recombinase é uma FLP recombinase ou uma recombinase Cre.

15

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que a FLP recombinase ou a recombinase Cre é codificada por um polinucleotídeo tendo códons preferenciais de milho.

20

91. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que dita recombinase compreende uma FLP recombinase ou uma recombinase Cre.

25 92. Método de acordo com a reivindicação 73, 74, 75, 77 ou 78, caracterizado pelo fato de que prover dito cassete de transferência compreende transformação.

93. Método de acordo com a reivindicação 73, 74, 75, 77 ou

78, caracterizado pelo fato de que prover dito cassete de transferência compreende cruzamento sexuado.

94. Método de acordo com a reivindicação 72 a 79 ou 84, caracterizado pelo fato de que prover dita recombinase compreende transformação.

95. Método de acordo com a reivindicação 72 a 79 ou 84, caracterizado pelo fato de que prover dito cassete de transferência compreende cruzamento sexuado

96. Método de acordo com a reivindicação 72 a 78, 83 ou 84, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreende SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de que dito variante funcional é substancialmente idêntico a SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

97. Método de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro ou dito segundo sítio de recombinação compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, e 38.

98. Método para combinar múltiplos cassetes de transferência compreendendo:

a) prover um sítio alvo compreendendo pelo menos um primeiro e um segundo sítio de recombinação funcional;

5

b) prover um primeiro cassete de transferência compreendendo na seguinte ordem pelo menos o primeiro, um terceiro, e o segundo sítios de recombinação funcionais, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o terceiro sítios de recombinação do primeiro cassete de transferência flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, dito primeiro, dito segundo, e dito terceiro sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um de dito primeiro, dito segundo, ou dito terceiro sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

10

15

20

c) prover uma primeira recombinase, caracterizado pelo fato de que dita primeira recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação;

25

d) prover um segundo cassete de transferência compreendendo pelo menos o segundo e o terceiro

sítios de recombinação, caracterizado pelo fato de que o segundo e o terceiro sítios de recombinação do segundo cassete de transferência flanqueiam um segundo polinucleotídeo de interesse; e,

5

- e) prover uma segunda recombinase, caracterizado pelo fato de que dita segunda recombinase reconhece e implementa recombinação no segundo e no terceiro sítios de recombinação, pelo qual o primeiro e o segundo cassetes de transferência são integrados no sítio alvo.

10

99. Método para combinar múltiplos cassetes de transferência compreendendo:

15

- a) prover um sítio alvo compreendendo na seguinte ordem pelo menos um primeiro, um segundo, e um terceiro sítio de recombinação funcional; caracterizado pelo fato de que dito primeiro, dito segundo, e dito terceiro sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um de dito primeiro, dito segundo, ou dito terceiro sítios de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

20

25

- b) prover um primeiro cassete de transferência compreendendo um primeiro polinucleotídeo de interesse flanqueado pelos primeiro e segundo sítios de recombinação;
- 5
- c) prover uma primeira recombinase, caracterizado pelo fato de que dita primeira recombinase ou variante dessa reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação;
- 10
- d) prover um segundo cassete de transferência compreendendo um segundo polinucleotídeo de interesse flanqueado ao menos pelo segundo e o terceiro sítios de recombinação; e,
- 15
- e) prover uma segunda recombinase, caracterizado pelo fato de que dita segunda recombinase reconhece e implementa recombinação no segundo e no terceiro sítios de recombinação, pelos quais o primeiro e o segundo cassetes de transferência são integrados no sítio alvo.
- 20

100. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo está em uma célula.

25

101. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo é

estavelmente incorporado no genoma da célula.

102. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dita
5 primeira, dita segunda, ou dita primeira e dita segunda recombinase compreende uma FLP recombinase.

103. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que dita primeira ou dita
10 segunda recombinase compreende, ainda, uma recombinase Cre.

104. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que pelo menos um polinucleotídeo codificando pelo menos dita primeira ou
15 dita segunda recombinase é estavelmente incorporado no genoma da célula.

105. Método de acordo com a reivindicação 97 ou 98, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de ditos
20 sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos é selecionado do grupo consistindo de um sítio FRT, um variante biologicamente ativo do sítio FRT, um sítio LOX, e um variante biologicamente ativo do sítio LOX.

25 106. Método de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que um de ditos sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos compreende um sítio FRT ou um variante biologicamente ativo do sítio FRT.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que dito variante biologicamente ativo do sítio FRT é FRT 5 (SEQ ID NO:40), FRT 6 (SEQ ID NO:41), FRT 7 (SEQ ID NO:42), ou FRT 87 (SEQ ID NO: 24).

108. Método de acordo com a reivindicação 102 ou 103, caracterizado pelo fato de que a FLP recombinase ou a recombinase Cre é codificada por um polinucleotídeo tendo códons preferenciais de milho.

109. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que dita primeira, dita segunda, ou dita primeira e dita segunda recombinase compreende uma FLP recombinase.

110. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que dita primeira, dita segunda, ou dita primeira e dita segunda recombinase compreende uma recombinase Cre.

111. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que prover pelo menos uma de dita primeira ou dita segunda recombinase compreende transformação.

112. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que prover pelo menos uma de

dita primeira ou dita segunda recombina-se compreende cruzamento sexuado.

113. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99,
5 caracterizado pelo fato de que introduzir pelo menos um de dito primeiro ou dito segundo cassete de transferência compreende transformação.

114. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99,
10 caracterizado pelo fato de que introduzir pelo menos um de dito primeiro ou dito segundo cassete de transferência compreende cruzamento sexuado.

115. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99,
15 caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro, dito segundo, ou dito terceiro sítios de recombinação compreende SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de que
20 dito variante funcional é substancialmente idêntico a SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

116. Método de acordo com a reivindicação 115,
25 caracterizado pelo fato de que pelo menos um de dito primeiro, dito segundo, ou dito terceiro sítio de recombinação compreende SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

117. Método para inverter um polinucleotídeo de interesse compreendendo:

- 5 a) prover um sítio alvo compreendendo o polinucleotídeo de interesse flanqueado por um primeiro e um segundo sítio de recombinação, dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são recombinogênicos com respeito um ao outro e estão em uma orientação invertida relativo um ao outro; e pelo menos um de dito primeiro e dito
- 10 segundo sítio de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18; e,
- 15 b) prover uma FLP recombinase, caracterizado pelo fato de que dita FLP recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, invertendo, dessa forma,
- 20 o polinucleotídeo de interesse.

118. Método para excisar um polinucleotídeo de interesse compreendendo:

- 25 a) prover um sítio alvo compreendendo um polinucleotídeo de interesse flanqueado por um primeiro e um segundo sítio de recombinação, dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são recombinogênicos com respeito um ao outro e

estão em uma orientação diretamente repetida relativo um ao outro; e pelo menos um de dito primeiro e dito segundo sítio de recombinação compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18;

5
10 b) prover uma FLP recombinase, caracterizado pelo fato de que dita FLP recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, excisando, dessa forma, o polinucleotídeo de interesse.

15 119. Método de acordo com a reivindicação 117 ou 118, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo está em uma célula.

20 120. Método de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo é estavelmente incorporado no genoma da célula.

25 121. Método de acordo com a reivindicação 75, 76, 77, 79, 82, 90, 91, 119 ou 120, caracterizado pelo fato de que dita célula é uma célula vegetal.

122. Método de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que dito método ocorre em uma

célula tendo estavelmente incorporado em seu genoma uma seqüência de nucleotídeos codificando dita FLP recombinase.

123. Método de acordo com a reivindicação 113, 117, 118, ou
5 122, caracterizado pelo fato de que a FLP recombinase é
codificada por um polinucleotídeo tendo códons
preferenciais de milho.

124. Método de acordo com a reivindicação 113, 117 ou 118,
10 caracterizado pelo fato de que dita recombinase compreende
a FLP recombinase.

125. Método de acordo com a reivindicação 119,
caracterizado pelo fato de que prover dito sítio alvo
15 compreende transformação.

126. Método de acordo com a reivindicação 119,
caracterizado pelo fato de que prover dito sítio alvo
compreende cruzamento sexuado.

20

127. Método de acordo com a reivindicação 119,
caracterizado pelo fato de que prover dita FLP recombinase
compreende transformação.

25 128. Método de acordo com a reivindicação 119,
caracterizado pelo fato de que prover dita FLP recombinase
compreende cruzamento sexuado.

129. Método de acordo com a reivindicação 113, 117 ou 118,

caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo
sítios de recombinação compreendem SEQ ID NO:21, 22, 23,
25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38
ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de
5 que dito variante funcional é substancialmente idêntico a
SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,
34, 35, 36, 37, ou 38.

130. Método de acordo com a reivindicação 129,
10 caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo
sítios de recombinação compreendem uma seqüência de
nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID
NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,
35, 36, 37, e 38.

15

131. Método de acordo com a reivindicação 121,
caracterizado pelo fato de que dita célula vegetal é uma
célula de planta monocotiledônea.

20 132. Método de acordo com a reivindicação 131,
caracterizado pelo fato de que dita célula monocotiledônea
é de milho, cevada, milhete, trigo, sorgo, centeio, ou
arroz.

25 133. Método de acordo com a reivindicação 121,
caracterizado pelo fato de que dita célula vegetal é uma
célula de planta dicotiledônea.

134. Método de acordo com a reivindicação 133, caracterizado pelo fato de que dita célula dicotiledônea de soja, canola, alfafa, girassol, cártamo, tabaco, *Arabidopsis*, ou algodão.

5

135. Método de acordo com a reivindicação 72, 117, ou 118, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são correspondentes.

10 136. Método de acordo com a reivindicação 72 ou 135, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreendem SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de
15 que dito variante funcional é substancialmente idêntico a SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

20 137. Método de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação compreendem uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, e 38.

25

138. Método de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que dito sítio alvo é operacionalmente ligado a um primeiro e um segundo promotor convergente; dito cassete de transferência compreendendo, na seguinte ordem,

o primeiro sítio de recombinação funcional, um polinucleotídeo de interesse orientado na direção 5' a 3', um segundo polinucleotídeo de interesse orientado na direção 3' a 5', e o segundo sítio de recombinação funcional; caracterizado pelo fato de que a inserção do cassette de transferência no sítio alvo resulta no primeiro polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao primeiro promotor convergente e o segundo polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao segundo promotor convergente.

139. O polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo compreende um primeiro convergente, o primeiro sítio de recombinação, o segundo sítio de recombinação, e o segundo promotor convergente.

140. O polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo compreende o primeiro promotor convergente, o primeiro sítio de recombinação, uma primeira seqüência de polinucleotídeos de interesse operacionalmente ligada a dito primeiro promotor convergente, um segundo polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado a dito promotor convergente e o segundo promotor convergente.

141. Método de excisar ou inverter um polinucleotídeo de interesse compreendendo:

5 a) prover um polinucleotídeo compreendendo, na seguinte ordem, um primeiro sítio de recombinação funcional compreendendo uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, o polinucleotídeo de interesse, e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são recombinogênicos com respeito um ao outro; e,

10

b) prover uma recombinase ou um variante biologicamente ativo de dita recombinase, caracterizado pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e no segundo sítios de recombinação, caracterizado pelo fato de que a seqüência de polinucleotídeos de interesse é excisada ou invertida.

15

20 142. Método de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que dito primeiro e dito segundo sítios de recombinação são idênticos.

25 143. Método de acordo com a reivindicação 141 ou 142, caracterizado pelo fato de que dito primeiro sítio de recombinação, dito segundo sítio de recombinação, ou ambos, compreendem SEQ ID NO:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, caracterizado pelo fato de que dito variante

funcional é substancialmente idêntico a SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

5 144. Método de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que dito primeiro sítio de recombinação, dito segundo sítio de recombinação, ou ambos, compreendem uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27,
10 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, e 38.

145. Método de acordo com a reivindicação 1 a 11, 46, 48, 52 a 82, 84, 85, 89, 94, 95, 98 a 138 ou 141 a 144, caracterizado pelo fato de que dita recombinase é um
15 variante biologicamente ativo da recombinase nativa.

Várias populações de sítios de recombinação FRT modificados são providas, incluindo, por exemplo, uma biblioteca isolada de moléculas compreendendo uma população
20 de plasmídios onde cada plasmídio na população compreende um marcador de seleção comum; e, cada plasmídio na população compreende um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados. A população pode compreender pelo menos cerca de 5 membros distintos da
25 população de plasmídios. Outras composições incluem, uma biblioteca isolada onde os membros da população de sítios de recombinação FRT modificados compreendem um variante de uma região de espaçamento, como relatado em SEQ ID NO: 43, caracterizado pelo fato de que o variante compreende pelo

menos uma alteração de nucleotídeo em SEQ ID NO: 43. Outras composições incluem uma biblioteca isolada onde os sítios de recombinação FRT modificados compreendem uma população de sítios de recombinação FRT modificados
5 funcionais.

Composições incluem ainda kits compreendendo duas populações de plasmídios. Os plasmídios na primeira população compreendem um primeiro marcador de seleção
10 comum; e, cada dos plasmídios na primeira população compreende um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados. A segunda população de plasmídios compreende um segundo e distinto marcador de seleção comum; e, cada dos plasmídios na segunda população
15 compreende um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados. O kit por compreender, ainda, uma FLP recombinase, um variante biologicamente ativo da FLP recombinase, um polinucleotídeo codificando uma FLP recombinase, ou um polinucleotídeo codificando um variante
20 biologicamente ativo da FLP recombinase.

Métodos para selecionar um sítio de recombinação FRT modificado recombinogênico são também providos. O método compreende prover uma primeira população de plasmídios onde
25 cada dos plasmídios na primeira população compreenda um primeiro marcador de seleção comum; e, cada dos plasmídios na primeira população compreenda um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados. Uma segunda população de plasmídios é provida onde cada dos plasmídios

na segunda população compreende um segundo distinto marcador de seleção comum; e, cada dos plasmídios na segunda população compreende um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados. A primeira 5 população de plasmídios é combinada com a segunda população de plasmídios na presença de uma FLP recombinase ou um variante biologicamente ativo da FLP recombinase, sob condições que permitem a integração mediada por recombinase. Um plasmídio co-integrante compreendendo 10 ambos primeiro e segundo marcadores de seleção é selecionado, caracterizado pelo fato de que o plasmídio co-integrante compreende pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado.

15 Métodos compreendem, ainda, isolar o plasmídio co-integrante e/ou caracterizar o sítio de recombinação FRT modificado do plasmídio co-integrante. Caracterizar o sítio de recombinação FRT modificado pode compreender determinar a eficiência de excisão de recombinação e/ou 20 determinar a seqüência do sítio de recombinação FRT modificado.

Um método para gerar uma biblioteca de moléculas é ainda provido. O método compreende prover uma população de 25 sítios de recombinação FRT modificados; e, promover o contato da população de sítios de recombinação FRT modificados com uma população de plasmídios tendo um marcador de seleção comum sob condições que permitem a inserção da população de sítios de recombinação FRT

modificados na população de plasmídios, de forma que cada dos plasmídios da população compreenda um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados.

5 Composições adicionais incluem um polinucleotídeo isolado compreendendo pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional, onde o sítio de recombinação FRT modificado funcional compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID
10 NOS:1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18. Outras composições incluem um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de nucleotídeos compreendendo pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional compreendendo a seqüência de
15 nucleotídeos relatada em SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas, onde o variante possui identidade de seqüência substancial a SEQ ID NOS:21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou
20 38.

São também providos organismos, incluindo, por exemplo, procariotos, tais como bactérias, e eucariotos, tais como leveduras, mamíferos, insetos, vermes, plantas,
25 células vegetais, e sementes compreendendo os polinucleotídeos citados compreendendo um sítio de recombinação FRT modificado. Em exemplos específicos, os polinucleotídeos são estavelmente integrados no genoma do organismo.

Métodos são também providos, incluindo métodos para produzir recombinação sítio-específica de DNA. Em alguns exemplos, a recombinação sítio-específica é uma reação intramolecular, em outros exemplos a recombinação sítio-específica é uma reação intermolecular. A recombinação sítio-específica pode ser feita *in vitro* ou *in vivo*. A reação de recombinação sítio-específica *in vivo* pode ser feita em qualquer célula, incluindo células procariontes ou eucariontes. Em alguns exemplos, as células são de uma planta. Métodos adicionais empregam vários métodos de recombinação para permitir a inserção direcionada, troca, alteração, expressão, excisão e/ou inversão de qualquer polinucleotídeo(s) de interesse. Em um exemplo, a método para direcionar a inserção de um polinucleotídeo de interesse a um sítio alvo é provido. O método compreende prover o sítio alvo, caracterizado pelo fato de que o sítio alvo compreende um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcionais, o primeiro e o segundo sítios de recombinação funcionais são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro; e pelo menos um do primeiro e segundo sítios de recombinação compreende um sítio de recombinação FRT modificado aqui descrito. Um cassete de transferência é provido, caracterizado pelo fato de que o cassete de transferência compreende o polinucleotídeo de interesse flanqueado pelo primeiro e segundo sítios de recombinação. Pelo menos uma recombinase é provida. A recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação.

O método pode ocorrer *in vitro* ou *in vivo*. Em exemplos específicos, o sítio alvo é estavelmente incorporado no genoma de um organismo.

5 Em outro exemplo, um método para direcionar a inserção de um polinucleotídeo de interesse é provido. O método compreende prover um sítio alvo tendo pelo menos um primeiro sítio de recombinação funcional. Um cassete de transferência é provido compreendendo um polinucleotídeo de
10 interesse e pelo menos um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação funcional é recombinogênico com o primeiro sítio de recombinação funcional, e o primeiro e/ou segundo sítio de recombinação compreendem um sítio FRT modificado
15 aqui descrito. Em alguns exemplos, o primeiro e o segundo sítios de recombinação têm a mesma seqüência. Pelo menos uma recombinase é provida. A recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação. O método pode ocorrer *in vitro* ou *in vivo*.
20 Em exemplos específicos, o primeiro sítio de recombinação funcional é estavelmente incorporado no genoma de um organismo. Em alguns exemplos, o polinucleotídeo de interesse e/ou o alvo pode ser, mais tarde, excisado, invertido, ou modificado de outra forma, por exemplo, pela
25 adição de um segundo polinucleotídeo de interesse no sítio alvo.

Em outros exemplos, métodos para avaliar a atividade promotora, métodos para selecionar diretamente organismos

transformados, métodos para minimizar ou eliminar a expressão resultante de integração randômica no genoma de um organismo, tal como uma planta, métodos para excisar ou inverter um polinucleotídeo de interesse, métodos para combina múltiplos cassetes de transferência, métodos para 5 determinar a eficiência de excisão ou eficiência de co-integração de um grupo de sítios de recombinação FRT, métodos para identificar sítios de recombinação recombinogênicos ou não recombinogênicos, métodos para 10 localizar sítios de integração preferidos no genoma de um organismo, métodos para recombinar moléculas de DNA ambos *in vitro* e *in vivo*, métodos para reduzir impacto agronômico não específico da inserção de um polinucleotídeo de interesse, tais como reduzir a dificuldade de produção, e, 15 métodos para identificar elementos reguladores *cis* em um organismo, tal como uma planta, são também providos.

O sítio de recombinação FRT de tipo selvagem mínimo foi caracterizado e compreende uma série de domínios 20 incluindo a seguinte seqüência de nucleotídeos 5'-AGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACT-3' (SEQ ID NO:39). Os domínios do sítio de recombinação FRT mínimo compreende um par de elementos de simetria de 11 pares de base que são os sítios de ligação FLP (nucleotídeos 1-11 e 20-30 de SEQ ID 25 NO:39); a região núcleo de 8 pares de base, ou região de espaçamento (nucleotídeos 12-19 de SEQ ID NO:39); e, os traços de polipirimidina (nucleotídeos 3-14 e nucleotídeos 16-29 de SEQ ID NO:39). Um sítio de recombinação FRT modificado pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

ou mais alterações que incluem substituições, adições, e/ou deleções em um ou mais desses domínios.

Sítios de recombinação FRT modificados são providos.

5 Um sítio de recombinação FRT modificado é uma seqüência de nucleotídeos que é similar, mas não idêntica ao sítio de recombinação FRT nativo mínimo relatado em SEQ ID NO:39. Enquanto o sítio de recombinação FRT modificado pode ser funcional, um sítio de recombinação FRT modificado não
10 precisa reter atividade. A menos que notado de outra forma, um sítio de recombinação FRT modificado retém a atividade biológica do sítio de recombinação FRT de tipo selvagem e compreende um sítio de recombinação funcional que é reconhecido por uma FLP recombinase e capaz de uma
15 reação de recombinação mediada por recombinase. Assim, um sítio de recombinação FRT modificado pode compreender uma deleção, adição, e/ou substituição de um ou mais nucleotídeos na extremidade 5' ou 3' do sítio de recombinação FRT nativo mínimo, em um ou mais sítios
20 internos no sítio de recombinação FRT nativo mínimo. Geralmente, sítios de recombinação modificados terão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou
25 mais de identidade de seqüência ao sítio de recombinação nativo mínimo pelo seu comprimento completo ou em relação a qualquer domínio aí contido. Por exemplo, um sítio de recombinação FRT modificado terá a % de identidade de seqüência citada em relação à seqüência de nucleotídeos FRT

nativa mínima; em relação aos elementos de simetria da seqüência FRT nativa mínima; em relação à seqüência de espaçamento da seqüência FRT de tipo selvagem; e/ou, em relação ao(s) traço(s) de polipirimidina do sítio FRT nativo mínimo, como determinado por programas de alinhamento de seqüências e parâmetros aqui descritos em outra parte. O sítio de recombinação FRT modificado poderia, portanto, incluir 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29 ou mais substituições, adições, e/ou deleções de nucleotídeos através de todo o comprimento do sítio de recombinação mínimo, ou alternativamente, em cada dos vários domínios do sítio de recombinação como ressaltado acima.

Um fragmento é uma porção de uma seqüência de nucleotídeos, ou de qualquer domínio caracterizado aí contido. Por exemplo, um fragmento de um sítio de recombinação FRT modificado poderia ser uma porção do sítio de recombinação FRT nativo mínimo, uma porção de um ou ambos elementos de simetria, uma porção da região de espaçamento e/ou uma porção do(s) traço(s) de polipirimidina do sítio FRT nativo. Enquanto os fragmentos de um sítio de recombinação modificado não precisam ter atividade biológica, em alguns exemplos, os fragmentos dos sítios de recombinação podem reter a atividade biológica do sítio de recombinação, e dessa forma, os fragmentos podem ser funcionais. A menos que notado de outra forma, um fragmento de sítio de recombinação FRT modificado retém a atividade biológica do sítio de recombinação FRT de tipo

selvagem. Por exemplo, fragmentos de um sítio de recombinação FRT modificado podem variar de pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 5 30 nucleotídeos. Fragmentos de um sítio de elemento de simetria modificado podem variar de pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou 11 nucleotídeos, fragmentos de uma seqüência de espaçamento podem variar de pelo menos cerca de 1, 2, 3, 5, 6, ou 7 de uma região de espaçamento 10 FRT de tipo selvagem mínima, e fragmentos de um traço de polipirimidina podem variar de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 nucleotídeos.

Em outros exemplos, sítios de recombinação FRT 15 modificados possuem mutações, tais como alterações, adições, deleções no domínio de espaçamento de 8 pares de base. Exemplos não limitantes de domínios espaçadores modificados são relatados em SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18. Em exemplos 20 específicos, os sítios FRT modificados são funcionais. Em outros exemplos, sítios de recombinação FRT modificados compreendem as regiões de espaçamento relatadas em SEQ ID NOS:1-18 e compreendem adicionalmente sítios de ligação FLP de elemento de simetria que correspondem àqueles 25 encontrados no sítio de recombinação FRT nativo mínimo. Ver, SEQ ID NOS:19 e 20 mostrando seqüências de elementos de simetria de tipo selvagem. Tais sítios de recombinação FRT modificados são relatados em SEQ ID NOS:21-38. Em exemplos específicos, os sítios FRT modificados são

funcionais. Em outros exemplos, sítios de recombinação FRT modificados podem compreender a seqüência de espaçamento relatada em SEQ ID NOS:1-18 e compreendem, ainda, uma ou mais modificações dos elementos de simetria relatados em 5 SEQ ID NOS:19 e 20. Em exemplos específicos, os sítios FRT modificados são funcionais. Modificações dos elementos de simetria (seqüências de nucleotídeos na posição 1 a 11 e 20 a 30 de SEQ ID NOS:21-38) podem incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais substituições, adições, deleções, ou 10 modificações da seqüência de nucleotídeos dos elementos de simetria de tipo selvagem relatados em SEQ ID NOS:19 e 20. Em outros exemplos, as modificações dos elementos de simetria são substancialmente idênticas a SEQ ID NOS:21-28. Identidade de seqüência substancialmente idêntica ou 15 substancialmente similar refere-se a uma seqüência de nucleotídeos tendo pelo menos uma, duas, ou três substituições, deleções, e/ou adições se comparado a uma reference seqüência. Assim, por um variante substancialmente idêntico de um sítio de recombinação FRT 20 modificado pretende-se um variante de um sítio de recombinação FRT modificado funcional compreendendo a seqüência de nucleotídeos relatada em SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 35, 36, 37, ou 38, caracterizado pelo fato de que o variante funcional 25 compreende A) uma, duas ou três alterações, substituições, adições e/ou deleções entre as posições de nucleotídeo 1 a 11 de SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 35, 36, 37, ou 38; B) uma, duas ou três alterações, substituições, adições e/ou deleções entre as

posições de nucleotídeo 20 a 30 de SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 35, 36, 37, ou 38; e/ou C) qualquer combinação de A e B. Em exemplos específicos, o sítio de recombinação FRT modificado
5 compreende as seqüências de espaçamento de SEQ ID NOS:1-18 e variantes funcionais dos elementos de simetria. Variantes funcionais de FRT elementos de simetria são conhecidos, ver, por exemplo, Senecoff *et al.* (1988) *J Mol Biol* 201:406-421 e Voziyanov *et al.* (2002) *Nucleic Acid Res*
10 30:7. Em certos exemplos, mais de um sítio de recombinação pode ser usado em uma composição ou método.

Como discutido acima, um sítio de recombinação modificado pode ser funcional. Um sítio de recombinação
15 funcional é um sítio de recombinação que é recombinogênico com um sítio de recombinação na presença da recombinase apropriada, a menos que notado ao contrário, um sítio de recombinação é funcional e inclui sítios de tipo selvagem, sítios modificados, variantes, e fragmentos. Métodos para
20 determinar se um sítio de recombinação modificado é recombinogênico são conhecidos. Como aqui usado, um sítio de recombinação variante funcional compreende um sítio de recombinação modificado funcional.

25 Os sítios de recombinação empregados nos métodos podem ser sítios correspondentes ou sítios dissimilares. Sítios de recombinação correspondentes, ou um grupo de sítios de recombinação correspondentes refere-se a sítios de recombinação tendo a mesma seqüência de nucleotídeos. Em

outros exemplos, os sítios de recombinação são dissimilares. Sítios de recombinação dissimilares, ou um grupo de sítios de recombinação dissimilares, são sítios de recombinação que são distintos um do outro por possuírem pelo menos uma diferença de nucleotídeo. Os sítios de recombinação em um grupo de sítios de recombinação dissimilares podem ser tanto recombinogênicos ou não recombinogênicos com respeito um ao outro. Recombinogênico refere-se a sítios de recombinação capazes de se recombinar um com o outro. A menos que declarado ao contrário, sítios de recombinação recombinogênicos ou um grupo de sítios de recombinação recombinogênicos incluem aqueles sítios onde a eficiência relativa de excisão de recombinação entre os sítios é maior do que 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, ou maior. Como aqui definido, a eficiência relativa de excisão de recombinação é a eficiência de excisão na presença da recombinase nativa de um primeiro sítio de recombinação modificado com um segundo sítio de recombinação modificado dividido pela eficiência de excisão de um par dos sítios de recombinação nativos apropriados X 100%. Por exemplo, quando trabalhando com sítios FRT modificados, a eficiência relativa de excisão de recombinação é definida como a eficiência de excisão na presença de FLP nativa (SEQ ID NO:49) de um primeiro sítio FRT modificado com um segundo sítio FRT modificado dividido pela eficiência excisão de um par de sítios FRT nativos (FRT1, SEQ ID NO:39). Não recombinogênico refere-se a sítios de recombinação que na presença da recombinase apropriada não recombinará um com o outro, ou a

recombinação entre os sítios é mínima. A menos que declarado ao contrário, sítios de recombinação não recombinogênicos, ou um grupo de sítios de recombinação recombinogênicos incluem aqueles sítios onde a eficiência
5 relativa de excisão de recombinação entre os sítios é menor do que 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,075, 0,005%, 0,001%. Conseqüentemente, qualquer grupo adequado de sítios de recombinação não recombinogênicos e/ou recombinogênicos pode ser utilizado, incluindo um sítio FRT
10 ou variante funcional desses, um sítio LOX ou variante funcional desse, qualquer combinação desses, ou qualquer outra combinação de não recombinogênicos e/ou sítios de recombinação conhecida.

15 Métodos para identificar sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos são providos. Em um método, um primeiro sítio de recombinação FRT compreendendo uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo
20 consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18 é provido. Um segundo sítio de recombinação FRT dissimilar é provido, junto com uma FLP recombinase sob condições que permitem dita FLP recombinase implementar um evento de recombinação. A recombinação é
25 testada para determinar se o primeiro e o segundo sítios de recombinação são não recombinogênicos com respeito um ao outro. Em exemplos específicos, o primeiro e o segundo sítios de recombinação são providos no mesmo polinucleotídeo, enquanto em outros exemplos, o primeiro e

o segundo sítios de recombinação são providos em polinucleotídeos distintos.

Em um exemplo, um método para determinar a eficiência de recombinação, tal como eficiência relativa de excisão ou eficiência relativa de co-integração de um primeiro e um segundo sítios de recombinação FRT, é provido. Por exemplo, um método para determinar a eficiência de excisão compreende prover um polinucleotídeo compreendendo o primeiro e o segundo sítio de recombinação FRT caracterizado pelo fato de que a seqüência de espaçamento para pelo menos o primeiro e/ou o segundo sítio FRT é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18 ou um variante dessas; e, prover uma FLP recombinase sob condições que permitem à FLP recombinase implementar um evento de excisão mediado por recombinase. A eficiência de excisão de recombinação é determinada. Métodos para testar eficiência de excisão de recombinação são conhecidos. Por exemplo, no Exemplo 3, vetores de excisão compreendendo duas cópias de um sítio de recombinação FRT modificado em orientação direta são usados. Testes *in vivo* ou *in vitro* podem ser usados para determinar se os dois sítios de recombinação FRT modificados são capazes de mediar a excisão na presença de FLP recombinase.

Em outro exemplo, um método para determinar a eficiência relativa de co-integração é provido. O método compreende prover um primeiro polinucleotídeo compreendendo

um primeiro sítio de recombinação FRT e prover um segundo polinucleotídeo compreendendo um segundo sítio de recombinação FRT, caracterizado pelo fato de que a seqüência de espaçamento de um deles ou ambos primeiro e segundo sítios de recombinação é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18 ou uma variante dessas; e, prover uma FLP recombinase sob condições que permitem que a FLP recombinase implemente um evento de integração mediado por recombinase. A eficiência relativa de co-integração é determinada. A eficiência relativa de co-integração de um grupo de sítios FRT é definida como a eficiência de co-integração do primeiro sítio FRT modificado com um segundo sítio FRT comparada à eficiência de co-integração de qualquer dado sítio FRT escolhido como um padrão apropriado, tal como um FRT1 mínimo de tipo selvagem (SEQ ID NO: 39). Um sítio de recombinação FRT modificado funcional pode ter uma eficiência de co-integração de cerca de 2%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou 100%, ou maior para o padrão relativo, mostrado, por exemplo, no Exemplo 4.

Em um exemplo, o primeiro e o segundo sítios de recombinação FRT possuem seqüências de nucleotídeos correspondentes. Ainda em outro exemplo, o primeiro e o segundo sítios de recombinação FRT são dissimilares. Portanto, vários grupos e combinações de sítios de recombinação FRT podem ser identificados, tais como grupos de sítios FRT funcionais, dissimilares, sítios FRT não

recombinogênicos, funcionais, dissimilares, sítios recombinogênicos, e/ou grupos de sítios FRT funcionais recombinogênicos correspondentes.

5 Um ou mais dos sítios de recombinação FRT modificados podem estar contidos em um polinucleotídeo. Em um exemplo, o polinucleotídeo compreende uma ou mais unidades de expressão. Uma unidade de expressão é uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma unidade de DNA caracterizado
10 por ter um único promotor transcricional. Alternativamente, o polinucleotídeo contendo o sítio de recombinação FRT modificado não necessita conter um promotor e/ou seqüências reguladoras abaixo. Em outros exemplos, o polinucleotídeo compreendendo o sítio de
15 recombinação modificado pode ser projetado de forma que com integração no genoma, as seqüências contidas no polinucleotídeo estejam operacionalmente ligadas a um promotor ativo. É reconhecido que um polinucleotídeo pode ter elementos adicionais incluindo, mas não limitando-se a,
20 seqüências de nucleotídeos de interesse, genes marcadores, sítios de recombinação, regiões de terminação, etc. Como ilustrado abaixo, o polinucleotídeo pode compreender cassetes de transferência, sítios alvo, ou quaisquer porções desses.

25

Um polinucleotídeo, ou proteína, isolado ou purificado, ou porção biologicamente ativa desse, é substancialmente ou essencialmente sem componentes que normalmente acompanham ou interagem com o polinucleotídeo

ou proteína, como encontrado em seu ambiente naturalmente
ocorrente. Um polinucleotídeo, ou proteína, isolado ou
purificado é substancialmente livre de outro material
celular, ou meio de cultura quando produzido por técnicas
5 recombinantes, ou substancialmente livre de precursores
químicos ou outros químicos quando quimicamente
sintetizados. Tipicamente, um polinucleotídeo isolado é
livre de seqüências que naturalmente flanqueiam as
extremidades 5' e/ou 3' no DNA genômico do organismo do
10 qual o polinucleotídeo é derivado. Por exemplo, em vários
exemplos, o polinucleotídeo isolado pode conter menos do
que cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ou 0,1
kb de seqüência de nucleotídeos que naturalmente flanqueiam
o polinucleotídeo no DNA genômico da célula do qual o
15 polinucleotídeo é derivado. Uma proteína que é
substancialmente livre de material celular inclui
preparações de proteína tendo menos do que cerca de 30%,
20%, 10%, 5%, ou 1% de peso seco de proteína contaminante.
Quando a proteína ou porção biologicamente ativa dessa é
20 recombinantemente produzida, geralmente o meio de cultura
representa menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, ou 1%
(por peso seco) de precursores químicos ou químicos que não
da proteína de interesse.

25 Polinucleotídeos podem compreender ribonucleotídeos e
combinações de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos.
Tais desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem
ambas moléculas naturalmente ocorrentes e análogas
sintéticas. Polinucleotídeos também englobam todas as

formas de seqüências incluindo, mas não limitando-se a, formas de fita simples, formas de dupla-fita, *hairpins*, estruturas *stem-and-loop*, e similares.

5 Em um exemplo, um polinucleotídeo isolado é provido, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende um sítio de recombinação FRT modificado. Em exemplos específicos, o sítio de recombinação FRT modificado é a seqüência de polinucleotídeos. Por exemplo, é provido um

10 polinucleotídeo isolado pode compreender pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional, onde o sítio de recombinação FRT modificado funcional compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

15 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18. Em exemplos específicos, o sítio de recombinação FRT modificado é heterólogo ao polinucleotídeo.

Heterólogo refere-se a um polipeptídeo ou uma

20 seqüência de nucleotídeos que se origina de uma espécie diferente, ou se da mesma espécie, é substancialmente modificado de sua forma nativa em composição e/ou lócus genômico. Por exemplo, um sítio de recombinação heterólogo é um polinucleotídeo não encontrado no polinucleotídeo

25 nativo ou não é encontrado na mesma localidade no polinucleotídeo nativo, e/ou é modificado de sua composição nativa.

Em outros exemplos, um polinucleotídeo isolado é

provido compreendendo uma seqüência de nucleotídeos relatada em SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas. Em exemplos específicos, o variante funcional compreende pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis ou mais alterações entre as posições de nucleotídeo 1 a 11 e/ou entre as posições de nucleotídeo 20 a 30 de SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, ou 38. Em outros exemplos, o variante funcional é substancialmente idêntico à seqüência relatada em SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38.

Um sítio de recombinação FRT modificado pode ser introduzido em um organismo de interesse. Introduzir compreende apresentar ao organismo pelo menos uma molécula, composição, polinucleotídeo, ou polipeptídeo, de tal maneira que a composição ganhe acesso ao interior de uma célula. Os métodos não dependem de um método em particular para introduzir um polinucleotídeo ou polipeptídeo em um organismo, apenas que o polinucleotídeo ou polipeptídeo ganhe acesso ao interior de pelo menos uma célula do organismo.

Organismos de interesse incluem, mas não são limitados a ambos organismos procariontes e eucariontes incluindo, por exemplo, bactérias, leveduras, insetos, mamíferos incluindo camundongos, humanos, e plantas. Em um exemplo, o organismo é uma planta.

Métodos para prover ou introduzir uma composição em vários organismos são conhecidos e incluem, mas não são limitados a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transiente, métodos mediados por vírus, e cruzamento sexuado. Transformação estável indica que o polinucleotídeo introduzido se integra no genoma do organismo e é capaz de ser herdado pela progênie desse. Transformação transiente indica que a composição introduzida é apenas temporariamente expressada ou presente no organismo.

Protocolos para introduzir polinucleotídeos e polipeptídeos em plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula vegetal visado para transformação, tal como monocotiledônea ou dicotiledônea. Métodos adequados para introduzir polinucleotídeos e polipeptídeos em células vegetais e subsequente inserção no genoma vegetal incluem micro injeção (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334; e U.S. Patent 6.300.543), transformação de meristema (U.S. Patent 5.736.369), eletroporação (Riggs et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5602-5606, transformação mediada por *Agrobacterium* (U.S. Patents 5.563.055; e 5.981.840), transferência direta de gene (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J* 3:2717-2722), e aceleração balística de partículas (U.S. Patents 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; 5.932.782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture:*

Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926; Weissinger et al. (1988) *Ann Rev Genet* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebola); Christou et al. (1988) *Plant Physiol* 87:671-674 (soja); Finer & McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev Biol* 27P:175-182 (soja); Singh et al. (1998) *Theor Appl Genet* 96:319-324 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4305-4309 (milho); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (milho); U.S. Patents 5.240.855; 5.322.783, and 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol* 91:440-444 (milho); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature* 311:763-764; U.S. Patent No. 5.736.369 (cereais); Bytebier et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Rep* 9:415-418 e Kaeppler et al. (1992) *Theor Appl Genet* 84:560-566 (transformação mediada por fios de carbeto de silício); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li et al. (1993) *Plant Cell Rep* 12:250-255; Christou & Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); e, Osjoda et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:745-750 (milho via *Agrobacterium tumefaciens*).

Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser introduzidos em plantas levando as plantas em contato com

um vírus ou ácidos nucleicos virais. Geralmente, tais métodos envolvem incorporar um polinucleotídeo em um DNA viral ou molécula de RNA. É reconhecido que um polipeptídeo de interesse pode ser inicialmente sintetizado
5 como parte de uma poliproteína viral, que mais tarde pode ser processada por proteólise *in vivo* ou *in vitro* para produzir a proteína recombinante desejada. Ainda, é reconhecido que promotores também englobam promotores utilizados para transcrição por RNA polimerases virais.
10 Métodos para introduzir polinucleotídeos em plantas e expressar um proteína aí codificada, envolvendo moléculas de DNA ou RNA viral, são conhecidos, ver, por exemplo, U.S. Patents 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931.

15

Métodos de transformação transiente incluem, mas não são limitados a, a introdução de polipeptídeos, tais como proteína recombinase, diretamente no organismo, a introdução de polinucleotídeos, tais como polinucleotídeos
20 de DNA e/ou RNA, e a introdução do transcrito de RNA, tal como um RNAm codificando uma recombinase, no organismo. Tais métodos incluem, por exemplo, micro injeção ou bombardeamento de partículas. Ver, por exemplo, Crossway *et al.* (1986) *Mol Gen Genet* 202:179-185; Nomura *et al.*
25 (1986) *Plant Sci* 44:53-58; Hepler *et al.* (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2176-2180; e, Hush *et al.* (1994) *J Cell Sci* 107:775-784.

As células tendo a seqüência introduzida podem ser cultivadas em plantas de acordo com meios convencionais, ver, por exemplo, McCormick et al. (1986) Plant Cell Rep 5:81-84. Essas plantas pode ser, então, cultivadas, e tanto polinizadas com a mesma linhagem transformada ou com uma linhagem diferente, e a progênie resultante expressar a característica fenotípica desejada e/ou compreender o polinucleotídeo ou polipeptídeo introduzido identificado. Duas ou mais gerações podem ser cultivadas para assegurar que o polinucleotídeo está estavelmente mantido e herdado, e sementes colhidas. Dessa maneira, são providas sementes transformadas, também referidas como sementes transgênicas, tendo um polinucleotídeo, por exemplo, compreendendo um sítio FRT modificado, estavelmente incorporado em seu genoma.

Exemplos de gêneros e espécies de plantas de interesse incluem, mas não são limitados a, monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (e.g., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquelas espécies de *Brassica* úteis como fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), milhete (e.g., milheto (*Pennisetum glaucum*), painço (*Panicum miliaceum*), painço português (*Setaria italica*), capim (*Eleusine coracana*)), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*),

algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata-
doce (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café
(*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas
5 comosus*), árvores cítricas (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma
cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate
(*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium
guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea
europaea*), mamão papaia (*Carica papaya*), caju (*Anacardium
occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa
10 (*Prunus amygdalus*), beterraba (*Beta vulgaris*), cana-de-
açúcar (*Saccharum* spp.), aveia (*Avena*), cevada (*Hordeum*),
palmeiras, leguminosas incluindo feijões e ervilhas, tais
como guar, alfarrobeira, feno grego, soja, feijões de
jardim, caupi, feijão mungo, feijão manteiga, fava,
15 lentilhas, grão-de-bico, e rícino, *Arabidopsis*, verduras,
ornamentais, gramíneas, coníferas, plantas de cultivo e
grãos que provêm sementes de interesse, plantas de óleo de
sementes, e outras plantas leguminosas. Verduras incluem
tomates (*Lycopersicon esculentum*), alface (e.g., *Lactuca
20 sativa*), feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus limensis*),
ervilhas (*Lathyrus* spp.), e membros do gênero *Cucumis*, tal
como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*), e
melão (*C. melo*). Ornamentais incluem azaléia (*Rhododendron
spp.*), hortênsia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus
rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipas (*Tulipa* spp.),
25 narcisos (*Narcissus* spp.), petúnias (*Petunia hybrida*), cravo
(*Dianthus caryophyllus*), bico-de-papagaio (*Euphorbia
pulcherrima*), e crisântemo. Coníferas incluem, por exemplo,
pinheiros, tais como pinheiro da variedade loblolly (*Pinus*

taeda), pinheiro slash (*Pinus elliotii*), pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro lodgepole (*Pinus contorta*), e pinheiro de Monterey (*Pinus radiata*); Pseudotsuga (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta do oeste (*Tsuga canadensis*); espruce Sitka (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*); abetos verdadeiros, tais como abeto prateado (*Abies amabilis*) e bálsamo (*Abies balsamea*); e cedros, tais como cedro vermelho (*Thuja plicata*) e cedro-amarelo do Alasca (*Chamaecyparis nootkatensis*).

10

O termo planta inclui células vegetais, protoplastos vegetais, culturas de tecidos de células vegetais das quais plantas podem ser regeneradas, calos vegetais, moitas, e células vegetais que são intactas em plantas ou partes de plantas, tais como embriões, pólen, óvulos, sementes, flores, grãos, espigas, sabugos, cascas, caules, raízes, pontas de raízes, anteras, e similares.

Células procariontes podem ser também usadas nos métodos. Procariontes incluem várias linhagens de *E. coli*; contudo, outras linhagens microbianas podem ser também usadas, incluindo, por exemplo, *Bacillus* sp, *Salmonella*, e *Agrobacterium*. Exemplos de linhagens de *Agrobacterium* incluem C58c1 (pGUSINT), Agt121 (pBUSINT), EHA101 (pMTCA23GUSINT), EHA105 (pMT1), LBA4404 (pTOK233), GU2260, BU3600, AGL-1, e LBA4402. Tais linhagens são descritas em detalhe em Chan et al. (1992) *Plant Cell Physiol* 33:577; Smith et al. (1995) *Crop Sci* 35:301; e Hiei et al. (1994) *Plant J* 6:271-282. Exemplos de linhagens bacterianas

incluem, mas não são limitados a, C600 (ATCC 23724), C600hfl, DH1 (ATCC 33849), DH5 α , DH5 α F', ER1727, GM31, GM119 (ATCC 53339), GM2163, HB101 (ATCC 33694), JM83 (ATCC 35607), JM101 (ATCC 33876), JM103 (ATCC 39403), JM105 (ATCC 47016), JM107 (ATCC 47014), JM108, JM109 (ATCC53323), JM110 (ATCC 47013), LE392 (ATCC 33572), K802 (ATCC 33526), NM522 (ATCC 47000), RR1 (ATCC31343), χ 1997 (ATCC 31244), e Y1088 (ATCC 37195). Ver também, Jendrisak et al. (1987) *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, 359-371, Hanahan et al. (1983) *J Mol Biol* 166:557-580, Schatz et al. (1989) *Cell* 59:1035, Bullock et al. (1987) *BioTechniques* 5:376-378, ATCC *Bacteria and Bacteriophages* (1996) 9th Edition, and Palmer et al. (1994) *Gene* 143:7-8.

Exemplos não limitantes de linhagens virais incluem, mas não são, mas não são limitados a, geminivírus, begomovírus, curtovírus, mastrevírus, banda (-) de RNA vírus, banda (+) de RNA vírus, potivírus, potexvírus, tobamovírus, ou outros vírus, nanovírus, viróides, e similares, por exemplo, vírus de mosaico de mandioca africana (ACMV) (Ward et al. (1988) *EMBO J* 7:899-904 e Hayes et al. (1988) *Nature* 334:179-182), vírus de mosaico estriado de cevadas (BSM) (Joshi et al. (1990) *EMBO J* 9:2663-2669), vírus de mosaico de couve-flor (CaMV) (Gronenborn et al. (1981) *Nature* 294:773-776 e Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514), vírus da listra do milho (MSV) (Lazarowitz et al. (1989) *EMBO J* 8:1023-1032 e Shen et al. (1994) *J Gen Virol* 76:965-969), vírus de mosaico de tabaco (TMV) (Takamatsu et al. (1987) *EMBO J* 6:307-311 e

Dawson et al. (1989) *Virology* 172:285-292), vírus de mosaico dourado de tomate (TGMV) (Elmer et al. (1990) *Nucleic Acids Res* 18:2001-2006), e vírus anão do trigo (WDV) (Woolston et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6029-6041) e derivados desses. Ver também, Porat et al. (1996) *Mol Biotechnol* 5:209-221.

Seqüências controle procariontes comumente usadas incluem promotores para iniciação de transcrição, 10 opcionalmente com um operador, junto com seqüências de ligação de ribossomos, incluem tais promotores comumente usados como sistemas promotores de beta lactamase (penicilinase) e lactose (lac) (Chang et al. (1977) *Nature* 198:1056), o sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel 15 et al. (1980) *Nucleic Acids Res* 8:4057) e o promotor P L lambda derivado e o sítio de ligação de ribossomo N-gene (Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128).

O vetor é selecionado para permitir a introdução na 20 célula hospedeira apropriada. Vetores bacterianos são tipicamente de origem de plasmídio ou fago. Células bacterianas apropriadas são infectadas com partículas de vetor de fago ou transfectadas com DNA sem histonas de vetor de fago. Se um vetor de plasmídio é usado, as 25 células bacterianas são transfectadas com o DNA de vetor de plasmídio. Sistemas de expressão procariontes/bacterianos para expressar uma proteína estão disponíveis usando *Bacillus sp.* e *Salmonella* (Palva et al. (1983) *Gene* 22:229-

235; Mosbach et al. (1983) Nature 302:543-545). O operon Tet e o operon Lac podem ser também empregados.

Uma variedade de sistemas de expressão eucariontes, tais como leveduras, linhas celulares de insetos, células vegetais ou de mamíferos, são conhecidas pela expressão de um polinucleotídeo de interesse. Em alguns exemplos, células vegetais transformadas/transfectadas são empregadas como sistemas de expressão. A síntese (introdução/expressão) de seqüências de nucleotídeos heterólogas em leveduras é bem conhecida (Sherman et al. (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory). Duas leveduras largamente utilizadas para produção de proteínas eucariontes são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Vetores, linhagens, e protocolos para expressão em *Saccharomyces* e *Pichia* são conhecidos e disponibilizados pelos fornecedores comerciais (e.g., InVitrogen). Vetores adequados possuem usualmente seqüências de controle de expressão, tais como promotores, incluindo 3-fosfoglicerato quinase ou álcool oxidase, e uma origem de replicação, seqüências de terminação e similares, como desejado.

Bacilovírus recombinantes são gerados inserindo-se as seqüências de interesse particulares no genoma do bacilovírus usando protocolos estabelecidos com vetores e reagentes de fornecedores comerciais (e.g., InVitrogen, Life Technologies Incorporated). Vetores comerciais estão prontamente disponibilizados com vários promotores,

tais como polihedrina e p10, seqüências sinal opcionais para secreção de proteínas, ou marcas de afinidade, tais como 6X histidina. Esses vírus recombinantes são cultivados, mantidos e propagados em linhas celulares comercialmente disponíveis derivadas de diversas espécies de insetos, incluindo *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni*. As células de insetos podem ser cultivadas usando protocolos bem estabelecidos em uma variedade de meios diferentes, por exemplo, com ou sem suplementação de soro bovino. As células cultivadas são infectadas com os vírus recombinantes e a seqüência de interesse é expressada. Proteínas expressadas com o sistema de bacilovírus foram extensivamente caracterizadas e, em vários casos, suas modificações pós tradução, tais como fosforilação, acilação, etc., são idênticas à proteína expressa naturalmente.

Composições compreendem, ainda, populações de sítios de recombinação FRT modificados. Uma população é um grupo ou coleção que compreende dois ou mais (i.e., 5, 10, 100, 300, 500, 700, 900, 1100, 1300, 1500, 1700, 1900, 2100, 2300, 2500, 2700, 2900, 3100, 3300, 3500, 3700, 3900, 4000, 4096, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , ou mais) sítios de recombinação FRT modificados dissimilares. Em exemplos específicos, os sítios de recombinação FRT modificados são heterólogos ao polinucleotídeo. Várias populações de sítios de recombinação FRT modificados são providas, incluindo, por exemplo, uma biblioteca de sítios de recombinação FRT modificados randomizados. A biblioteca de

sítios de recombinação FRT modificados pode ser usada via técnicas de seleção para a identificação de populações de sítios de recombinação FRT modificados funcionais, recombinogênicos e/ou não recombinogênicos.

5

Em um exemplo, a população de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma biblioteca. Uma biblioteca de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma população de plasmídios, caracterizada pelo fato de que cada dos plasmídios na população compreende um marcador de seleção comum. Além disso, cada dos plasmídios na população compreende um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados. Conseqüentemente, cada plasmídio na população da biblioteca tem o potencial de conter um membro dissimilar do sítio de recombinação FRT modificado randomizado. Populações de vários sítios de recombinação FRT modificados diferentes podem ser rastreadas para identificar sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos.

20

Métodos de produzir ou formar uma população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados incluem identificar a região do sítio de recombinação FRT na qual alteração são desejadas, tais como todo o comprimento do sítio FRT, a região de simetria, a região de espaçamento, o traço de polipirimidina, ou qualquer combinação desses, e, por exemplo, gerar uma população de oligonucleotídeos que possui os nucleotídeos randomicamente modificados na região desejada. As seqüências randomizadas na biblioteca de

sítios de recombinação FRT modificados podem ser de vários comprimentos e compreendem vários domínios. As reações enzimáticas pelas quais segmentos de seqüência aleatórios são feitos podem não produzir matematicamente seqüências aleatórias devido a tendências desconhecidas ou preferências de nucleotídeos que possam existir. O termo randomizado, ou aleatório, reflete a possibilidade de tais desvios de não idealidade. Conseqüentemente, o termo randomizado é usado para descrever um segmento de ácido

5 nucleico tendo, em princípio, qualquer seqüência de nucleotídeos possível contendo bases naturais ou modificadas por um dado comprimento. Além disso, uma tendência pode ser deliberadamente introduzidas na seqüência randomizada, por exemplo, alterando-se as razões

15 molares de nucleosídeos precursores ou desoxinucleosídeos trifosfatos da reação de síntese. Uma tendência deliberada pode ser desejada, por exemplo, para aproximar as proporções de bases individuais em um dado organismo, ou para afetar a estrutura secundária. Ver, Hermes *et al.*

20 (1998) *Gene* 84:143-151 e Barril *et al.* (1991) *Cell* 67:529-536. Ver também, Davis *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci.USA* 99:11616-11621, que geraram uma população randomizada tendo uma tendência compreendendo uma estrutura desejada. Portanto, uma população randomizada de sítios de

25 recombinação FRT modificados pode ser gerada para conter uma tendência desejável na estrutura primária e/ou secundária do sítio, ou vários domínios do sítio.

Não é necessário que a biblioteca inclua todas seqüências variantes possíveis. A biblioteca pode incluir tanto quanto um número possível de variante de seqüência como é pratico para seleção, para assegurar que um número
5 suficiente de sítios de recombinação FRT modificados funcionais potenciais sejam identificados. Por exemplo, se a seqüência randomizada no sítio de recombinação FRT modificado inclui os resíduos internos de espaçamento 6 (ver, Tabela 1), ela conteria aproximadamente 4^6 (ou 4096)
10 permutações de seqüência usando as 4 bases naturalmente ocorrentes. Contudo, não é necessário para a biblioteca incluir todas seqüências possíveis para permitir a seleção de sítios de recombinação FRT modificados funcionais.

15 Uma vez que os membros da população dos sítios de recombinação FRT modificados randomizados são gerados, as seqüências são empacotadas em plasmídios usando métodos padrão. Em alguns exemplos, a população de plasmídios pode ser introduzida em células adequadas tanto para
20 amplificação como armazenamento. Apesar de clonagem e amplificação serem tipicamente conseguidas usando células bacterianas, qualquer combinação funcional de plasmídio e célula pode ser usada. As células clonadas podem ser congeladas para futura amplificação e uso, ou a biblioteca
25 de plasmídio empacotada pode ser isolada e ela própria armazenada em qualquer forma que preserve viabilidade.

Plasmídios de interesse típicos incluem vetores tendo sítios de clonagem definidos, origens de replicação e

marcadores de seleção. O plasmídeo pode incluir ainda seqüências de iniciação de transcrição e tradução, terminadores de transcrição e tradução, e promotores úteis para a regulação da expressão do ácido nucléico em particular. Plasmídios podem incluir também cassetes de expressão genéricos contendo pelo menos uma seqüência de terminação independente, seqüências permitindo a replicação do cassete em eucariotos, ou procariotos, ou ambos, tais como vetores de embaralhamento, e marcadores de seleção para ambos sistemas procariotos e eucariotos. Vetores podem ser adequados para replicação e integração em eucariotos, ou procariotos, ou ambos. Para descrições gerais de clonagem, empacotamento, e sistemas de expressão e métodos, ver Giliman & Smith (1979) *Gene* 8:81-97; Roberts et al. (1987) *Nature* 328:731-734; Berger & Kimmel (1989) *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif, (Berger); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); e F. M. Ausubel et al. (eds.) (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1994 Supplement) (Ausubel).

25

Em um exemplo, os membros da população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados são introduzidos em uma população de plasmídios, caracterizado pelo fato de que cada dos plasmídios na população compreende um marcador

de seleção comum. Nesse exemplo, uma população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados é colocada em contato com uma população de plasmídios sob condições que permitem a inserção da população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados em cada plasmídio da população de plasmídios, tal como cada dos plasmídios de dita população compreendem um único membro da população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados. Em um exemplo, o marcador de seleção é operacionalmente ligado a um promotor ativo em uma célula hospedeira de interesse. Vários marcadores de seleção podem ser usados no método.

Um marcador selecionável ou rastreável compreende um segmento de DNA que permite que se identifique ou selecione para ou contra uma molécula ou uma célula que o contenha, freqüentemente sob condições em particular. Qualquer marcador de seleção pode ser usado. Esses marcadores podem codificar uma atividade, tal como, mas não limitando-se a, produção de RNA, peptídeo, ou proteína, ou pode prover um sítio de ligação para RNA, peptídeos, proteínas, compostos inorgânicos e orgânicos ou composições e similares. Exemplos de marcadores de seleção incluem, mas não são limitados a, segmentos de DNA que compreendem sítios de enzimas de restrição; segmentos de DNA que codificam produtos que provêm resistência contra compostos tóxicos incluindo antibióticos, tais como, espectinomicina, ampicilina, canamicina, tetraciclina, Basta, neomincina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT); segmentos de DNA que codificam produtos que são,

pelo contrário, sem a célula recipiente (e.g., genes de RNAt, marcadores auxotróficos); segmentos de DNA que codificam produtos que podem ser prontamente identificados (e.g., marcadores fenotípicos, tais como β -galactosidase, GUS; proteína fluorescentes, tais como proteína verde fluorescente (GFP), ciano (CFP), amarela (YFP), vermelha (RFP), e proteína de superfície celular); a geração de novos sítios de *primer* para PCR (e.g., a justaposição de duas seqüências de DNA não justapostas previamente), a inclusão de seqüências de DNA não acionadas ou acionadas por uma endonuclease de restrição ou outra enzima modificadora de DNA, químico, etc.; e, a inclusão de seqüências de DNA requeridas para uma modificação específica (e.g., metilação) que permite sua identificação.

15

Marcadores de seleção adicionais incluem genes que conferem resistência a compostos herbicidas, tais como amônio glufosinato, bromoxinil, imidazolinonas, e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Ver, em geral, Yarranton (1992) *Curr Opin Biotech* 3:506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol Microbiol* 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48:555-566; Brown et al. (1987) *Cell* 49:603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2549-2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al.

(1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:1917-1921; Labow et al.
(1990) Mol Cell Biol 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992)
Proc Natl Acad Sci USA 89:3952-3956; Baim et al. (1991)
Proc Natl Acad Sci USA 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991)
5 Nucleic Acids Res 19:4647-4653; Hillen & Wissman (1989)
Topics Mol Struc Biol 10:143-162; Degenkolb et al. (1991)
Antimicrob Agents Chemother 35:1591-1595; Kleinschmidt et
al. (1988) Biochemistry 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D.
Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc
10 Natl Acad Sci USA 89:5547-5551; Oliva et al. (1992)
Antimicrob Agents Chemother 36:913-919; Hlavka et al.
(1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78
(Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) Nature
334:721-724.

15

Os sítios de recombinação FRT modificados, sítios de
recombinação FRT modificados funcionais, e as várias
populações de tais moléculas incluindo as bibliotecas e
populações plasmídios podem ser usadas, também, como
20 reagentes em kits. Por exemplo, kits que podem ser
empregados nos vários métodos aqui descritos são providos.
Em um exemplo, o kit compreende uma primeira população de
plasmídios caracterizada pelo fato de que cada dos
plasmídios na primeira população compreende um primeiro
25 marcador de seleção comum; e, cada dos plasmídios na
primeira população compreende um membro de uma população de
sítios de recombinação FRT modificados. O kit pode incluir
ainda uma segunda população de plasmídios caracterizada
pelo fato de que cada dos plasmídios em dita segunda

população compreende um segundo marcador de seleção comum, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo marcadores de seleção são distintos; e, cada de ditos plasmídios na segunda população compreende um membro da
5 população de sítios de recombinação FRT modificados. Em outros exemplos, os kits podem compreender ainda uma FLP recombinase. Ainda em outros exemplos, o kit podem compreender um polinucleotídeo, opcionalmente integrado no genoma de um organismo, tendo pelo menos um sítio alvo
10 flanqueado por sítio de recombinação FRT modificado funcional, dissimilares, não recombinogênico. Qualquer kit pode ser ainda acompanhado por instruções para uso.

Adicionalmente, providos são kits tendo um
15 polinucleotídeo compreendendo pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional heterólogo, dito sítio de recombinação FRT modificado funcional compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
20 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18. Kits tendo qualquer dos outros polinucleotídeos aqui descritos são ainda providos, Em exemplos específicos, o polinucleotídeo no kit compreende, ainda, pelo menos um sítio de recombinação adicional. Em exemplos específicos, os sítios de
25 recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, dissimilares e recombinogênicos com respeito um ao outro, ou correspondentes e recombinogênicos. Kits podem incluir, ainda, um ou mais

das recombinases apropriadas ou um polinucleotídeo codificando a mesma.

Populações de plasmídios compreendendo um membro de
5 uma população de sítios de recombinação FRT modificados
podem ser geradas. São providos métodos para selecionar,
identificar e/ou caracterizar sítios de recombinação FRT
modificados recombinogênicos da população de sítios de
recombinação FRT modificados. Em um exemplo, a seleção de
10 um sítio de recombinação FRT recombinogênico compreende
prover uma primeira população de plasmídios, caracterizado
pelo fato de que cada dos plasmídios na primeira população
compreende um primeiro marcador de seleção comum; e, cada
dos plasmídios na primeira população compreende um membro
15 heterólogo de uma população de sítios de recombinação FRT
modificados. Uma segunda população de plasmídios é
provida. A segunda população de plasmídios compreende um
segundo marcador de seleção comum, caracterizado pelo fato
de que o primeiro e o segundo marcadores de seleção são
20 distintos; e, cada dos plasmídios na segunda população
compreende um membro da população de sítios de recombinação
FRT modificados. Um marcador de seleção distinto indica
que o marcador presente na primeira população de plasmídios
emprega um esquema de seleção diferente ou agente do que o
25 marcador de seleção presente na segunda população de
plasmídios. Em outras palavras, a presença de um marcador
de seleção distinto nas duas populações de plasmídios
permitirá o rastreamento de populações de plasmídios para

determinar se nenhum, um, ou ambos marcadores de seleção estão presentes.

Em um método, a primeira população de plasmídios é combinada com a segunda população de plasmídios na presença de uma FLP recombinase. Os componentes são combinados *in vivo* ou *in vitro* sob condições que permitem que ocorra a integração mediada por recombinase. A integração mediada por recombinase resulta em um evento de recombinação entre um sítio FRT recombinogênico modificado em um plasmídio e um sítio FRT recombinogênico modificado em um segundo plasmídio. O evento de recombinação resulta na geração de um plasmídio co-integrante. Um co-integrante é uma molécula de ácido nucléico que contém ambas moléculas parentais, o plasmídio da primeira biblioteca e o plasmídio da segunda biblioteca. Isto seria usualmente circular, mas pode ser também linear. Um co-integrante pode compreender plasmídios da primeira e segunda bibliotecas e, portanto, ter dois marcadores de seleção distintos. Plasmídios co-integrantes adicionais podem se formar entre plasmídios da mesma população. Esses co-integrantes compreendem marcadores de seleção comuns. Esquemas de seleção que permitem a seleção de co-integrantes gerados via um evento mediado por recombinase entre plasmídios da primeira e segunda populações de plasmídios são discutidos em detalhe abaixo.

As condições nas quais as duas populações de plasmídios são combinadas permitirão que FLP recombinase

medie um evento de recombinação entre um sítio de recombinação FRT recombinogênico modificado contido em um plasmídio da primeira população com um sítio de recombinação FRT recombinogênico modificado contido em um plasmídio da segunda população e, portanto, formem um plasmídio co-integrante. Condições que permitem a o evento de integração mediada por recombinase podem variar. Por exemplo, a quantidade de recombinase adicionada para dirigir a reação integração mediada por recombinase pode ser determinada usando testes conhecidos, tais como testes de titulação, para determinar a quantidade apropriada de recombinase sob dadas condições. Similarmente, a concentração de ambas populações de plasmídios pode ser variada, junto com o tempo, temperatura e outras condições de reação para permitir uma reação desejada. Em um exemplo, as populações de plasmídios são adicionadas em uma razão equimolar.

Qualquer método que permita a seleção, enriquecimento, ou identificação de um plasmídio co-integrante pode ser usado nos métodos. Em um exemplo, o co-integrante compreenderá dois marcadores de seleção distintos. Conseqüentemente, métodos para selecionar co-integrantes fora dos plasmídios que tanto falharam tanto para sujeitar um evento de integração mediado por recombinase ou sujeitar um evento entre plasmídios da mesma população podem introduzir a mistura compreendendo os co-integrantes e os outros plasmídios que não reagiram em uma célula hospedeira e selecionar células hospedeiras tendo ambos marcadores.

Após a formação do co-integrante, a etapa de seleção pode ser conduzida tanto *in vivo* ou *in vitro* dependendo do esquema de seleção em particular sendo empregado, ver por exemplo, U.S. Patent 6.277.608. Os esquemas de seleção que podem ser empregados nos métodos e composições irão variar dependendo do marcador de seleção empregado nas populações de plasmídios.

10 Esquemas de seleção *in vivo* podem ser usados com uma variedade de células hospedeiras incluindo, por exemplo, *E. coli*. Segue um exemplo não limitante de um plasmídio co-integrante junto com um esquema de seleção não limitante *in vivo*. Nesse exemplo, um plasmídio A compreende um marcador de seleção de ampicilina e um sítio FRT modificado e

15 plasmídio B compreende um marcador de seleção de espectinomicina e um sítio de recombinação FRT modificado correspondente. Com a adição de FLP recombinase, ocorre um evento de recombinação entre o sítio FRT modificado de plasmídio A e plasmídio B. O plasmídio co-integrante resultante compreende ambos marcador de ampicilina do plasmídio A e o marcador espectinomicina de plasmídio B. Os plasmídios da mistura de reação são introduzidos em *E. coli* competente. *E. coli* contendo co-integrantes são

20 resistentes a ambas ampicilina e espectinomicina. Seguindo a seleção de co-integrantes, os sítios de recombinação FRT modificados contidos no co-integrante podem ser caracterizados, e os sítios de recombinação FRT modificados contidos nos plasmídios A e B podem ser, então,

25

determinados. Por exemplo, os sítios podem ser seqüenciados. Além disso, a eficiência de excisão de recombinação pode ser também determinada. Em alguns exemplos, o sitio FRT modificado de plasmídio A e de plasmídio B pode ser também dissimilares e recombino-
5 gênicos. Em tais instâncias, os sítios de recombinação aparecendo no plasmídio co-integrante podem ser seqüenciados para determinar os sítios dissimilares/recombino-
10 gênicos aparecendo no plasmídio A e plasmídio B.

Outros esquemas para seleção incluem testes *in vitro* que testam para a seleção dos co-integrantes através da geração de novos sítios de *primer* para PCR; inclusão de
15 seqüências de DNA acionadas ou não acionadas por uma endonuclease de restrição ou outras enzima modificadora de DNA, químicos, etc.; a seleção do produto desejado por tamanho ou outra propriedade física da molécula; e a inclusão de uma seqüência de DNA requerida para uma
20 modificação específica (e.g., metilação).

Sítios de recombinação FRT modificados recombino-
gênicos podem ser usados em vários métodos de recombinação sítio específicos *in vitro* e *in vivo* que
25 permitem a integração direcionada, troca, modificação, alteração, excisão, inversão, e/ou expressão de uma seqüência de nucleotídeos de interesse, ver, por exemplo, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, e
WO99/25853.

Os métodos empregam um sistema de recombinação sítio específico. Uma recombinase sítio específica, também referida como uma recombinase, é um polipeptídeo que catalisa a recombinação conservativa sítio específica entre seus sítios de recombinação compatíveis, portanto, uma recombinase inclui polipeptídeos nativos, assim como variantes e/ou fragmentos que retêm atividade, e polinucleotídeos nativos e variantes e/ou fragmentos que codificam uma recombinase que retém atividade. A recombinase usada nos métodos podem ser uma recombinase nativa ou um fragmento biologicamente ativo ou variante da recombinase. Um polipeptídeo ou polinucleotídeo nativo compreende uma seqüência de aminoácidos ou seqüência de nucleotídeos naturalmente ocorrente. Para revisões de recombinases sítio específicas, ver Sauer (1994) *Curr Op Biotechnol* 5:521-527; e Sadowski (1993) *FASEB* 7:760-767. Recombinases úteis nos métodos e composições incluem recombinases das famílias Integrase e Resolvase, variantes biologicamente ativos e fragmentos dessas, e qualquer outra enzima naturalmente ocorrente ou produzida recombinantemente ou variante dessa, que catalisam recombinação conservativa sítio específica entre sítios de recombinação de DNA especificados.

25

A família de recombinases Integrase possui mais de cem membros e inclui, por exemplo, FLP, Cre, lambda integrase, e R. Para outros membros da família Integrase, ver, por exemplo, Esposito et al. (1997) *Nucleic Acids Res* 25:3605-

3614 e Abremski et al. (1992) Protein Eng 5:87-91. Outros sistemas de recombinação incluem, por exemplo, phi C31 estrepomiceto bacteriófago (Kuhstoss et al. (1991) J Mol Biol 20:897-908); o sistema de recombinação SSV1 sítio específico de *Sulfolobus shibatae* (Maskhelishvili et al. (1993) Mol Gen Genet 237:334-342); e um sistema de integração retroviral baseado em integrase (Tanaka et al. (1998) Gene 17:67-76). Em outros exemplos, a recombinase é uma que não requer cofatores ou um substrato super helicoidal. Tais recombinases incluem a Cre nativa (SEQ ID NOS:45 e 46), a FLP nativa (SEQ ID NOS:48 e 49), ou variantes ou fragmentos ativos dessas (SEQ ID NOS:47 e 50).

A FLP recombinase é uma proteína que catalisa uma reação sítio específica que é envolvida em amplificar o número de cópias do plasmídio de dois micron de *S. cerevisiae* durante a replicação de DNA. FLP recombinase catalisa a recombinação sítio específica entre dois sítios FRT. A proteína FLP foi clonada e expressada (Cox (1993) Proc Natl Acad Sci USA 80:4223-4227). A FLP recombinase para uso nos métodos e com as composições pode ser derivada do gênero *Saccharomyces*. Pode-se também sintetizar um polinucleotídeo compreendendo a recombinase usando códons preferenciais de planta para ótima expressão em uma planta de interesse. Uma enzima FLP recombinante codificada por uma seqüência de nucleotídeos compreendendo códons preferenciais de milho (FLPm) que catalisam eventos de recombinação sítio específicos é conhecida (SEQ ID NO:50, e US Patent 5.929.301). Variantes funcionais adicionais e

fragmentos de FLP são conhecidos (Buchholz *et al.* (1998) Nat Biotechnol 16:617-618, Hartung *et al.* (1998) J Biol Chem 273:22884-22891, Saxena *et al.* (1997) Biochim Biophys Acta 1340:187-204, e Hartley *et al.* (1980) Nature 286:860-
5 864).

A recombinase Cre de bacteriófago catalisa a recombinação sítio específica entre dois sítios lox. A Cre recombinase é conhecida (Guo *et al.* (1997) Nature 389:40-
10 46; Abremski *et al.* (1984) J Biol Chem 259:1509-1514; Chen *et al.* (1996) Somat Cell Mol Genet 22:477-488; Shaikh *et al.* (1977) J Biol Chem 272:5695-5702; e, Buchholz *et al.* (1998) Nat Biotechnol 16:617-618. Sequências de nucleotídeos Cre podem ser também sintetizadas usando
15 códons preferenciais de plantas, por exemplo tais sequências (moCre) são descritas em WO 99/25840 e relatadas em SEQ ID NO:47.

É ainda reconhecido que uma recombinase quimérica pode
20 ser usada nos métodos. Uma recombinase quimérica é uma proteína de fusão recombinante que é capaz de catalisar a recombinação sítio específica entre sítios de recombinação que se originam de diferentes sistemas de recombinação. Por exemplo, se um grupo de sítios de recombinação
25 funcionais, caracterizada como sendo dissimilares e não recombinogênicos com respeito uma à outra, é utilizado nos métodos e composições, e o grupo compreende um sítio FRT e um sítio LoxP, uma FLP/Cre recombinase quimérica ou variante ou fragmento ativo dessa será necessário ou ambas

recombinases podem ser providas separadamente. Métodos para a produção e uso de tais recombinases quiméricas ou variantes ou fragmentos ativos dessas são descritos em WO 99/25840.

5

Fragmentos e variantes dos polinucleotídeos codificando recombinases e fragmentos e variantes das proteínas recombinase são também englobados. Um fragmento é uma porção do polinucleotídeo e/ou qualquer proteína codificada dessa forma ou uma porção do polipeptídeo. Fragmentos de um polinucleotídeo podem codificar fragmentos de proteína que retém a atividade biológica da proteína nativa e, assim, implementar um evento de recombinação. Assim, fragmentos de um polinucleotídeo podem variar de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos, a cerca de 50 nucleotídeos, a cerca de 100 nucleotídeos, e até o polinucleotídeo de comprimento total codificando uma recombinase.

20

Um fragmento de um polinucleotídeo que codifica uma porção biologicamente ativa de uma proteína recombinase codificará pelo menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 320, 350, 375, 400, ou 420 aminoácidos contíguos, ou até o número total de aminoácidos presentes em uma proteína recombinase de comprimento total (i.e., 423 aminoácidos para a FLP recombinase e 338 aminoácidos para a Cre recombinase) usada nos métodos.

25

Uma porção biologicamente ativa de uma proteína recombinase pode ser preparada isolando uma porção de um dos polinucleotídeos codificando a porção do polipeptídeo recombinase e expressando a porção codificada da proteína recombinase, e avaliando a atividade da porção da recombinase. Polinucleotídeos que codificam fragmentos de um polipeptídeo recombinase podem compreender seqüências de nucleotídeos compreendendo pelo menos 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, ou 1.200 nucleotídeos, ou até o número total de nucleotídeos presentes em uma seqüência de nucleotídeos de recombinase de comprimento total (i.e., 1032 nucleotídeos para a FLP recombinase e 1260 nucleotídeos para a Cre recombinase) aqui descrita.

15

Seqüências variantes possuem um alto grau de similaridade de seqüência. Para polinucleotídeos, variantes conservativos incluem aquelas seqüências que, por causa da degeneração do código genético, codificam a seqüência de aminoácidos de um dos polipeptídeos recombinase nativos. Variantes, tais como esses, podem ser identificado com o uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas, como, por exemplo, com reação de cadeia de polimerase (PCR) e técnicas de hibridização. Polinucleotídeos variantes também incluem seqüências de nucleotídeos sinteticamente derivadas, tais como aquelas geradas, por exemplo, usando mutagênese sítio-direcionada, mas que ainda codificam uma proteína recombinase. Geralmente, variantes de um polinucleotídeo em particular

25

terão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência àquele polinucleotídeo em particular, como determinado por programas de alinhamento de seqüências e parâmetros conhecidos.

Variantes de um polinucleotídeo em particular (a seqüência de nucleotídeos referência) pode ser também avaliada por comparação da identidade de seqüência percentual entre o polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo variante e o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo referência. Assim, por exemplo, polinucleotídeos isolados que codificam um polipeptídeo com uma dada identidade de seqüência percentual à recombinase são conhecidos. A identidade de seqüência percentual entre dois polipeptídeos pode ser calculada usando programas de alinhamento de seqüências e parâmetros descritos. Onde qualquer par de polinucleotídeos é avaliada por comparação da identidade de seqüência percentual compartilhada pelos dois polipeptídeos que codificam, a identidade de seqüência percentual entre os dois polipeptídeos é pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência.

Uma proteína variante deve significar uma proteína derivada da proteína nativa por deleção, adição, e/ou substituição de um ou mais aminoácidos à(s) região(ões) N-

terminal, interna , e/ou extremidade C-terminal da proteína nativa. Proteínas variantes são biologicamente ativas, isto é, continuam a possuir a atividade biológica desejada da proteína nativa, por exemplo, uma recombinase variante
5 implementará um evento de recombinação entre sítios de recombinação apropriados. Tais variantes podem resultar de, por exemplo, polimorfismo genético ou de manipulação humana. Variantes biologicamente ativos de uma proteína recombinase nativa terá pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%,
10 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência à seqüência de aminoácidos para a proteína nativa, como determinado por programas de alinhamento de seqüências e parâmetros conhecidos. Um variante biologicamente ativo de
15 uma proteína pode diferir daquela proteína por tão pouco quanto 1-15 resíduos de aminoácidos, tão pouco quanto 1-10, tal como 6-10, tão pouco quanto 5, tão pouco quanto 4, 3, 2, ou até 1 resíduo de aminoácido.

20 Relações de seqüência podem ser analisadas e descritas usando algoritmos implementados por computador. A relação de seqüência entre dois ou mais polinucleotídeos, ou dois ou mais polipeptídeos, pode ser determinada gerando o alinhamento ótimos das seqüências, e pontuando as
25 correspondências e os espaços no alinhamento, que resulta na identidade de seqüência percentual, e a similaridade de seqüência percentual. Relações de polinucleotídeo pode ser também descritas baseadas em uma comparação dos polipeptídeos que cada um codifica. Vários programas e

algoritmos para a comparação e análise de seqüências estão disponíveis.

A menos que declarado ao contrário, os valores
5 identidade/similaridade de seqüência aqui providos referem-se ao valor usando GAP Version 10 (GCG, Accelrys, San Diego, CA) usando os seguintes parâmetros: % identidade e % similaridade para uma seqüência de nucleotídeos usando um peso de penalidade de criação de espaço de 50 e um peso de penalidade de extensão de espaço de 3, e a matriz de pontuação nwsgapdna.cmp; % identidade e % similaridade para uma seqüência de aminoácidos usando um peso de penalidade de criação de espaço de 8 e um peso de penalidade de extensão de espaço de 2, e a matriz de pontuação BLOSUM62
10 (Henikoff & Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915).

GAP usa o algoritmo de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, para encontrar o alinhamento de
20 duas seqüências completas que maximiza o número de correspondências e minimiza o número de espaços. GAP considera todos alinhamentos possíveis e posições de espaço possíveis e cria o alinhamento com o maior número de bases com correspondência e o menor de espaços. Isto permite a
25 provisão de uma penalidade por criação de espaços e uma penalidade por extensão de espaços em unidades de bases com correspondência. GAP deve fazer um saldo de número de penalidade de criação de espaços de correspondências para cada espaço que insere. Se uma penalidade por extensão de

espaço maior que zero é escolhida, GAP deve, adicionalmente, fazer um saldo para cada espaço inserido do comprimento do espaço vezes a penalidade por extensão de espaço. GAP apresenta um membro da família de alinhamentos
5 ótimos.

Identidade de seqüência, ou identidade, é uma medida dos resíduos nas duas seqüências que são a mesma quando alinhadas para máxima correspondência. Seqüências,
10 particularmente polipeptídeos, que diferem por substituições conservativas são ditas por ter similaridade de seqüência ou similaridade. Meios para fazer esse ajuste são conhecidos, e tipicamente envolvem pontuar uma substituição conservativa como uma parcial, ao invés de uma
15 falta de correspondência completa. Por exemplo, onde um aminoácido idêntico recebe uma pontuação de 1 e uma substituição não conservativa recebe uma pontuação de zero, uma substituição conservativa recebe uma pontuação entre zero e 1. A pontuação de substituições conservativas é
20 calculada, usando a matriz de pontuação selecionada (BLOSUM62 por padrão para GAP).

Proteínas podem ser alteradas em vários meios incluindo substituições, deleções, trunicações, e inserções
25 de aminoácidos. Métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos. Por exemplo, variantes de seqüências de aminoácidos das proteínas recombinase podem ser preparados por mutações no DNA. Métodos para mutagênese e alterações de seqüências de nucleotídeos

incluem, por exemplo, Kunkel (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol 154:367-382; U.S. Patent 4,873,192; Walker & Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) e as referências aí citadas. 5 Direções como para substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica da proteína de interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl Biomed Res Found, Washington, D.C.). Substituições conservativas, 10 tais como permuta de um aminoácido por outro tendo propriedades similares, podem ser preferíveis.

Os polinucleotídeos recombinase usados incluem ambas 15 seqüências nativas naturalmente ocorrentes, assim como formas mutantes ou modificadas. Da mesma maneira, as proteínas usadas nos métodos englobam ambas proteínas naturalmente ocorrentes, assim como variações e formas modificadas dessas. Tais variantes continuam a possuir a 20 habilidade de implementar um evento de recombinação. Geralmente, as mutações feitas no polinucleotídeo codificando o polipeptídeo variante não posicionam a seqüência fora do quadro de leitura ou criam regiões complementares que poderiam produzir estrutura de RNA 25 secundária. Ver, EP Patent Application Publication No. 75.444.

Não espera-se que as deleções, inserções, e substituições das seqüências de proteínas aqui englobadas

produzam mudanças radicais nas características da proteína. Contudo, quando é difícil prever o efeito exato da substituição, deleção, ou inserção antes de fazê-la, o efeito será avaliado por testes de rastreamento de rotina.

5 Testes para atividade de recombinase são conhecidos e geralmente medem a atividade total da enzima em substratos de DNA contendo sítios de recombinação. Por exemplo, para testar atividade FLP, inversão de uma seqüência de DNA em um plasmídio circular contendo dois sítios FRT invertidos

10 podem ser detectados como uma mudança em posição de sítios de enzima de restrição. Esse teste é descrito em Vetter et al. (1983) PNAS 80:7284. Alternativamente, a excisão de DNA de uma molécula ou freqüência de recombinação intermolecular induzida pela enzima podem ser testadas,

15 como descrito, por exemplo, em Babineau et al. (1985) J Biol Chem 260:12313; Meyer-Leon et al. (1987) Nucleic Acid Res 15:6469; e Gronostajski et al. (1985) J Biol Chem 260:12328. Alternativamente, atividade de recombinase pode ser também testada por excisão de uma seqüência flanqueada

20 por sítios FRT recombinogênicos que com remoção ativarão um gene marcador testável. Estratégias de teste similares podem ser usadas pra Cre ou outras enzimas recombinase.

Polinucleotídeos e proteínas variantes também englobam

25 seqüências e proteínas derivadas de um procedimento mutagênico e/ou recombinogênico, tal como embaralhamento de DNA. Com tal procedimento, uma ou mais seqüências codificadoras de recombinase diferentes podem ser manipuladas para criar uma nova proteína recombinase

possuindo as propriedades desejadas. Dessa maneira, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeos relacionados compreendendo regiões de seqüência que possuem identidade de seqüência substancial e podem ser homologamente recombinadas *in vitro* ou *in vivo*. Estratégias para tal embaralhamento de DNA são conhecidas e incluem, por exemplo, Stemmer (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nat Biotech 15:436-438; Moore et al. (1997) J Mol Biol 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; e U.S. Patents 5.605.793 e 5.837.458.

Os métodos e composições podem empregar, ainda, sítios de recombinação que não os sítios FRT modificados aqui providos. Um sítio de recombinação é qualquer polinucleotídeo nativo ou sintético/artificial que é reconhecido pela enzima recombinase de interesse. Vários sistemas de recombinação são conhecidos, como é o sítio(s) de recombinação apropriado a ser usado com o sistema de recombinação de interesse, incluindo variantes biologicamente ativos e fragmentos de sítios de recombinação. Exemplos de sítios de recombinação para uso são conhecidos e incluem sítios FRT incluindo o sítio FRT nativo (FRT1, SEQ ID NO:39), e vários variantes funcionais de FRT, incluindo mas não limitando-se a, FRT5 (SEQ ID NO:40), FRT6 (SEQ ID NO:41), FRT7 (SEQ ID NO:42), FRT87 (SEQ ID NO:24), e outros sítios FRT modificados funcionais

aqui descritos. Ver, por exemplo, WO 03/054189, WO 02/00900, WO 01/23545, e, Schlake et al. (1994) *Biochemistry* 33:12745-12751.

5 Sítios de recombinação do sistema de recombinação Cre/Lox sítio específico podem ser também usados. Tais sítios de recombinação incluem, por exemplo, sítios LOX nativos e vários variantes funcionais de LOX. Uma análise da atividade de recombinação de sítios LOX variantes é

10 apresentada em Lee et al. (1998) *Gene* 216:55-65 e em U.S. Patent 6.465.254. Também, ver por exemplo, Schlake & Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751; Huang et al. (1991) *Nucleic Acids Res* 19:443-448; Sadowski (1995) *In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* Vol. 51, pp.

15 53-91; U.S. Patent 6.465.254; Cox (1989) *In Mobile DNA*, Berg and Howe (eds) American Society of Microbiology, Washington D.C., pp. 116-670; Dixon et al. (1995) *Mol Microbiol* 18:449-458; Umlauf & Cox (1988) *EMBO J* 7:1845-1852; Buchholz et al. (1996) *Nucleic Acids Res* 24:3118-

20 3119; Kilby et al. (1993) *Trends Genet* 9:413-421; Rossant & Geagy (1995) *Nat Med* 1:592-594; Albert et al. (1995) *Plant J* 7:649-659; Bayley et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:353-361; Odell et al. (1990) *Mol Gen Genet* 223:369-378; Dale & Ow (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10558-10562; Qui et al.

25 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1706-1710; Stuurman et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32:901-913; Dale et al. (1990) *Gene* 91:79-85; e WO 01/111058.

Qualquer sítio de recombinação adequado ou grupo de

sítios de recombinação podem ser utilizado nos métodos e composições, incluindo um sítio FRT, um variante funcional de um sítio FRT, um sítio LOX, e variante funcional de um sítio LOX, qualquer combinação desses, ou qualquer outra
5 combinação de sítios de recombinação conhecidos.

Diretamente repetido indica que os sítios de recombinação em um grupo de sítios de recombinação recombinogênicos são arranjados na mesma orientação, de
10 forma que a recombinação entre esses sítios resulte em excisão, ao invés de inversão, da seqüência de DNA interveniente. Sítio(s) de recombinação invertido(s) indica que o os sítios de recombinação em um grupo de sítios de recombinação recombinogênicos são arranjados na
15 orientação oposta, de forma que a recombinação entre esses sítios resulta em inversão, ao invés de excisão, da seqüência de DNA interveniente.

O sítio alvo e cassete de transferência compreendem
20 pelo menos um sítio de recombinação. A(s) recombinase(s) sítio-específica(s) usada(s) dependerá dos sítios de recombinação presentes no sítio alvo e no cassete de transferência, por exemplo se sítios FRT são utilizados, uma FLP recombinase ou variante ativo dessa será provida.
25 Da mesma maneira, onde sítios Lox são utilizados, uma Cre recombinase ou variante ativo dessa é provido. Se o grupo de sítios de recombinação funcionais compreende ambos sítio FRT e um sítio Lox, serão providos tanto uma FLP/Cre recombinase quimérica ou um variante ativo ou ambas FLP e

Cre recombinases ou variantes ativos dessas. Em um exemplo, pelo menos um dos sítios de recombinação empregados no sítio alvo, cassete de transferência, ou ambos compreenderão pelo menos um sítio de recombinação FRT
5 modificado funcional aqui descrito.

Prover inclui qualquer método que permite que um polipeptídeo e/ou a polinucleotídeo, tal como uma recombinase, sítio alvo, cassete de transferência,
10 polinucleotídeo de interesse, sejam trazidos juntos com os componentes citados. Por exemplo, uma célula pode ser provida com esses vários componentes via uma variedade de métodos incluindo métodos de transformação transiente e estável; co-introduzir um DNA de recombinase, RNAm ou
15 proteína diretamente na célula; empregar um organismo, célula, linhagem ou linha que expresse a recombinase para a transformação inicial; ou cultivar o organismo carregando o sítio alvo e cruzando-o a um organismo que expresse uma proteína recombinase ativa e selecionar eventos na
20 progênie. Qualquer promotor incluindo promotor constitutivo, induzido, regulado por desenvolvimento/temporal, ou espacialmente regulado, capaz de regular a expressão no organismo de interesse pode ser usado para expressar a recombinase apropriada.

25

Composições compreendendo sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos são providas, junto com variantes biologicamente ativos e fragmentos dos sítios FRT recombinantes modificados recombinogênicos. O sítio de

recombinação FRT modificado recombinogênico pode ser usado em vários métodos de recombinação sítio específicos.

Os métodos podem empregar sítios alvo e cassetes de
5 transferência para permitir a manipulação, troca, excisão,
alteração, inversão e/ou introdução de uma seqüência de
nucleotídeos *in vivo* ou *in vitro*. Um sítio alvo compreende
pelo menos um sítio de recombinação. Em exemplos
específicos, o sítio alvo compreende um polinucleotídeo que
10 é imediatamente flanqueado por pelo menos dois sítios de
recombinação, incluindo grupos de sítios de recombinação
funcionais que são dissimilares e não recombinogênicos com
respeito um ao outro; correspondentes e recombinogênicos
respeito um ao outro; ou dissimilares e recombinogênicos
15 respeito um ao outro. Uma ou mais seqüências
intervenientes podem estar presentes entre os sítios de
recombinação do sítio alvo. Seqüências intervenientes de
particular interesse incluem ligantes, adaptadoras, regiões
reguladoras, íntrons, sítios de restrição,
20 intensificadores, isolantes, marcadores de seleção,
seqüências de nucleotídeos de interesse, promotores, e/ou
outros sítios que auxiliam na construção ou análise de
vetor. É ainda reconhecido que um sítio de recombinação
pode estar contido na seqüência de nucleotídeos de
25 interesse incluindo íntrons, seqüência codificadora, UTRs
5', UTRs 3', e/ou regiões reguladoras.

Em exemplos específicos, o sítio alvo está em uma
célula ou um organismo de interesse. Em outros exemplos, o

sítio alvo está estavelmente integrado no genoma da célula ou no organismo de interesse. É reconhecido que a célula ou o organismo podem compreender múltiplos sítios alvo, os quais podem ser localizados em um ou múltiplos loci nos cromossomos ou através dos cromossomos. Múltiplas manipulações independentes de cada sítio alvo no organismo estão disponibilizadas. Adicionalmente, o sítio alvo pode compreender, também, um cassete de expressão compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando uma recombinase apropriada. Em outro exemplo, a seqüência de nucleotídeos codificando a recombinase é estavelmente integrada no genoma do organismo.

Os métodos empregam, ainda, cassetes de transferência. Um cassete de transferência compreende pelo menos um sítio de recombinação. Em exemplos específicos, o cassete de transferência compreendendo um polinucleotídeo flanqueado por pelo menos um primeiro sítio de recombinação e um segundo sítio de recombinação, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação correspondem aos sítios de recombinação no sítio alvo. O primeiro e o segundo sítios de recombinação funcionais do cassete de transferência podem ser dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro. Quando um sítio alvo e um cassete de transferência compreendendo sítios de recombinação compatíveis e a recombinase são combinados, a seqüência de nucleotídeos entre os sítios de recombinação do sítio alvo será trocada com a seqüência de nucleotídeos entre os sítios de recombinação do cassete de

transferência. Flanqueado por, quando usado em referência à posição dos sítios de recombinação do sítio alvo ou o cassete de transferência, refere-se a uma posição imediatamente adjacente à seqüência que pretende ser
5 trocada ou inserida.

O cassete de transferência pode ainda compreender um polinucleotídeo de interesse. Os sítios de recombinação podem ser diretamente contíguos com o polinucleotídeo de
10 interesse ou pode existir uma ou mais seqüências intervenientes presentes entre uma ou ambas extremidades do polinucleotídeo de interesse e os sítios de recombinação. Seqüências intervenientes de particular interesse incluem ligantes, adaptadores, intensificadores, íntrons,
15 isolantes, sítios de restrição, marcadores de seleção, polinucleotídeos de interesse, promotores, e/ou outros sítios que auxiliam na construção ou análise de vetor. Os sítios de recombinação podem estar contidos no polinucleotídeo de interesse incluídos nos íntrons,
20 seqüência codificadora, e/ou regiões 5' e 3' não traduzidas.

Em um exemplo, o cassete de transferência e/ou o sítio alvo compreendem pelo menos um sítio de recombinação FRT
25 modificado funcional, onde o de recombinação FRT modificado funcional compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18. Em outros exemplos, o cassete de transferência e/ou sítio alvo

compreende pelo menos um sítio de recombinação FRT modificado funcional compreendendo SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38 ou um variante funcional dessas. O variante funcional
5 podem compreender uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais alterações entre as posições de nucleotídeo 1 a 11 e/ou entre as posições de nucleotídeo 20 a 30 de SEQ ID NO:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 38. Ainda em outros exemplos, o variante
10 funcional é substancialmente idêntico à seqüência de SEQ ID NOS:21-38.

Quaisquer meios podem ser usados para juntar os vários componentes do sistema de recombinação. Por exemplo, em
15 sistemas *in vitro*, a recombinase e o(s) polinucleotídeo(s) compreendendo os sítios de recombinação podem ser providos promovendo o contato dos componentes sob condições apropriadas para permitir um evento de recombinação. Alternativamente uma variedade de métodos é conhecida para
20 a introdução de seqüências de nucleotídeos e polipeptídeos em um organismo, incluindo, por exemplo, transformação, cruzamento sexuado, e a introdução do polipeptídeo, DNA, ou RNAm na célula. Ver, também, WO99/25884.

25 Os métodos são úteis em várias aplicações. Por exemplo, os métodos podem empregar o uso de dois sítios de recombinação FRT modificados funcionais e permitir troca, inserção, inversão, ou excisão *in vivo* e *in vitro* de uma seqüência de nucleotídeos de interesse. Por exemplo, a

célula ou o organismo de interesse pode compreender um primeiro polinucleotídeo compreendendo um sítio alvo compreendendo um primeiro sítio de recombinação funcional FRT modificado. A célula, ou o organismo, é provida com um
5 segundo polinucleotídeo compreendendo um cassete de transferência compreendendo tanto um segundo sítio de recombinação FRT correspondente e funcional ou um segundo sítio FRT dissimilar que é recombinogênico com respeito ao primeiro sítio. Uma FLP recombinase é provida sob
10 condições que permitem um evento de recombinação. O evento de recombinação entre os dois sítios de recombinação recombinogênicos resulta na inserção do cassete de transferência junto com todo o segundo polinucleotídeo que está contido no primeiro polinucleotídeo. Em alguns
15 exemplos, o primeiro polinucleotídeo está estavelmente integrado no genoma do organismo. O método podem ser também empregado em um contexto *in vitro*. Por exemplo, p primeiro e o segundo polinucleotídeos podem compreender polinucleotídeos, tais como plasmídios combinados *in vitro*
20 na presença de uma recombinase apropriada. Nesse exemplo, um evento de recombinação produzirá um plasmídio co-integrante. Tais métodos são úteis, por exemplo, em várias tecnologias de clonagem, incluindo amplificação de fragmentos por PCR (Sadowski et al. (2003) BMC Biotechnol
25 18:9), vetores de clonagem (Snaith et al. (1995) Gene 166:173-174 e U.S. Patents 6.140.129, 6.410.317, 6.355.412, 5.888.732, 6.143.557, 6.171.861, 6.270.969, e 6.277.608) e vetores virais (U.S. Patent 6.541.245).

Em outros exemplos, o método compreende prover um sítio alvo tendo um primeiro e um segundo sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um do primeiro ou segundo sítios de recombinação compreendem um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui descrito; prover um cassete de transferência compreendendo um polinucleotídeo de interesse flanqueado pelo primeiro e segundo sítio de recombinação; e, prover uma recombinase. A recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação.

Em exemplos específicos, o sítio alvo está em uma célula ou organismo hospedeiro; e, em outros exemplos, o sítio alvo está estavelmente integrado no genoma da célula ou do organismo hospedeiro. Ainda em outros exemplos, o sítio alvo compreende um polinucleotídeo de interesse. Nesse exemplo, se o sítio alvo e cassete de transferência compreendem o primeiro e o segundo sítios de recombinação que são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, a seqüência de interesse no sítio alvo é trocada por um segundo polinucleotídeo de interesse contido no cassete de transferência.

Em outros exemplos, as composições aqui providas são usadas em métodos para reduzir a complexidade de integração de transgenes no genoma de uma célula ou organismo, tal

como uma célula vegetal ou uma planta. Nesse método, organismos tendo padrões de integração simples em seus genomas são selecionados. Um padrão de integração simples indica que o cassete de transferência se integra predominantemente apenas no sítio alvo, e a menos do que cerca de 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 posição(ões) randômica(s) que não o sítio alvo no genoma. Métodos para determinar os padrões de integração são conhecidos na arte e incluem, por exemplo, análise de *Southern blot* e análise RFLP.

É provido um método para selecionar diretamente uma célula transformada ou um organismo, tal como uma planta ou célula vegetal. O método compreende prover uma população de células ou organismos tendo um polinucleotídeo compreendendo um sítio alvo. O polinucleotídeo compreende, na seguinte ordem, um promotor e um sítio alvo compreendendo um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcionais, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um do primeiro ou o segundo sítios de recombinação compreendem um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido. Um cassete de transferência é introduzido na população de células ou organismos, onde o cassete de transferência compreende, na seguinte ordem, o primeiro sítio de recombinação, um polinucleotídeo compreendendo um marcador de seleção não operacionalmente ligado a um promotor, e o segundo sítio de

recombinação. Uma recombinase, ou um fragmento biologicamente ativo, é provida, que reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação, e, dessa forma, liga operacionalmente o marcador de seleção ao promotor. A população de células ou organismos é então cultivada no agente seletivo apropriado para recuperar o organismo que sofreu com de forma bem-sucedida a integração do cassete de transferência no sítio alvo. Em outros exemplos, a população de células ou organismos foi estavelmente incorporada em seus genomas no sítio alvo.

A atividade de vários promotores em uma localidade caracterizada no genoma de uma célula ou organismo podem ser determinadas. Assim, a atividade e/ou nível de expressão desejados de uma seqüência de nucleotídeos de interesse podem ser alcançados, assim como, a caracterização de promotores para expressão na célula ou organismo de interesse. Em um exemplo, o método para avaliar a atividade promotora em uma célula ou um organismo compreende prover uma célula ou um organismo compreendendo em seu genoma um polinucleotídeo compreendendo um sítio alvo tendo um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, caracterizado pelo fato de que pelo menos um do primeiro ou segundo sítios de recombinação funcionais compreende um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido. Um cassete de transferência é introduzido na célula ou

organismo, onde o cassete de transferência compreende um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo compreendendo um marcador de seleção e o cassete de transferência é flanqueado pelo primeiro e o segundo sítios de recombinação funcionais. Uma recombinase é provida, caracterizada pelo fato de que dita recombinase reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação. A atividade promotora é avaliada monitorando-se a expressão do marcador de seleção. Dessa maneira, promotores diferentes podem ser integrado na mesma posição no genoma e sua atividade comparada.

Em alguns exemplos, o cassete de transferência compreende na seguinte ordem: o primeiro sítio de recombinação, um promotor operacionalmente ligado a um terceiro sítio de recombinação operacionalmente ligado a um polinucleotídeo compreendendo um marcador de seleção, e o segundo sítio de recombinação, onde o primeiro, o segundo e o terceiro sítios de recombinação funcionais são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ou outro. Esse cassete de transferência pode ser genericamente representado como $RSa-P1::RSc::S1-RSb$. Após a introdução do cassete de transferência no sítio alvo, a atividade do promotor (P1) pode ser analisada usando métodos conhecidos na arte. Uma vez que a atividade do promotor é caracterizada, cassetes de transferência adicionais compreendendo um polinucleotídeo de interesse flanqueado pelo segundo e pelo terceiro sítio de recombinação pode ser introduzido no organismo. Com

recombinação, a expressão do polinucleotídeo de interesse será regulada pelo promotor caracterizado. Conseqüentemente, organismos, tais como linhas de plantas, tendo promotores que alcançam os níveis de expressão 5 desejados nos tecidos desejados podem ser construídos de forma que seqüências de nucleotídeos de interesse possam ser prontamente inseridas abaixo do promotor e operacionalmente ligadas ao promotor e, dessa forma, expressadas de uma maneira previsível.

10

Em alguns exemplos, múltiplos promotores podem ser empregados para regular a transcrição em um único sítio alvo. Nesse método, o sítio alvo compreendendo o primeiro e o segundo sítios de recombinação é flanqueado por dois 15 promotores convergentes. Promotores convergentes refere-se a promotores que são orientados em ambos terminais do sítio alvo. O mesmo promotor, ou promotores diferentes podem ser usados no sítio alvo. Cada dos promotores convergentes é operacionalmente ligado tanto ao primeiro ou o segundo 20 sítio de recombinação. Por exemplo, o sítio alvo flanqueado pelos promotores convergentes pode compreender $P_1 \rightarrow : R_1 - R_2 : \leftarrow P_2$, onde P é um promotor, a seta indica a direção de transcrição, R é um sítio de recombinação, e o cólon indica que os componentes estão operacionalmente 25 ligados.

O cassete de transferência empregado com o sítio alvo tendo os promotores convergentes pode compreender, na seguinte ordem, o primeiro sítio de recombinação, um

primeiro polinucleotídeo de interesse orientado na direção 5' a 3', um segundo polinucleotídeo de interesse orientado na direção 3' a 5', e um segundo sítio de recombinação. A inserção do cassete de transferência no sítio alvo resulta no primeiro polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao primeiro promotor convergente, e o segundo polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao segundo promotor convergente. A expressão do primeiro e/ou segundo polinucleotídeo de interesse pode ser aumentada ou diminuída na célula ou organismo. A expressão do primeiro e/ou segundo polinucleotídeo de interesse pode ser também independentemente regulada dependendo de quais promotores são usados. É reconhecido que sítios alvo podem ser flanqueados por outros elementos que influenciam a transcrição. Por exemplo, elementos isolantes podem flanquear o sítio alvo para minimizar efeitos de posição. Ver, por exemplo, U.S. Publication No. 2005/0144665.

Qualquer promotor pode ser usado, e é tipicamente selecionado baseado no resultado desejado. Um promotor é uma região de DNA envolvida no reconhecimento e ligação de RNA polimerase e outras proteínas para iniciar a transcrição. Um promotor vegetal é um promotor capaz de iniciar a transcrição em uma célula vegetal, para uma revisão de promotores vegetais, ver Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol* 40:1-22.

Promotores constitutivos incluem, por exemplo, o promotor núcleo do promotor Rsyn7 e outros promotores

constitutivos descritos em WO 99/43838 e U.S. Patent 6.072.050; o promotor núcleo CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812); actina de arroz (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989) Plant Mol Biol 12:619-632 e Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) Theor Appl Genet 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) EMBO J 3:2723-2730); promotor ALS (U.S. Patent 5.659.026), e similares. Outros promotores constitutivos são descritos em, por exemplo, U.S. Patents 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; e 6.177.611.

Em alguns exemplos um promotor induzido pode ser usado. Promotores induzidos por patógenos induzidos após a infecção por um patógeno incluem, mas não são limitados àqueles regulando a expressão de proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanase, quitinase, etc. Ver, por exemplo, Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Virol 4:111-116; WO 99/43819; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1989) Mol Plant-Microbe Interact 2:325-331; Somsisch et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) Mol Gen Genet 2:93-98; Yang (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:14972-14977; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968; U.S. Patent No. 5.750.386

(induzido por nematódeo); e as referências aí citadas; e Cordero et al. (1992) *Physiol Mol Plant Path* 41:189-200 (induzido por *Fusarium*). Promotores induzidos por ferimento incluem gene proteinase inibidora de batata (pin II) (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:494-498); *wun1* e *wun2* (U.S. Patent 5.428.148); *win1* e *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208); *sistemina* (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573); *WIP1* (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Lett* 323:73-76); *MPI* gene (Corderok et al. (1994) *Plant J* 6:141-150); e similares. Promotores regulados quimicamente podem ser usados para modular a expressão de um gene em uma planta através da aplicação de um regulador químico exógeno. O promotor pode ser um promotor induzido por químico, onde a aplicação do químico induz a expressão gênica, ou um promotor reprimido por químico, onde a aplicação do químico reprime a expressão gênica. Promotores induzidos por químicos incluem, mas não são limitados a, promotor *In2-2* de milho, defensores herbicidas ativados por benzenosulfonamida (De Veylder et al. (1997) *Plant Cell Physiol* 38:568-77), promotor *GST* de milho (*GST-II-27*, WO 93/01294) ativado por compostos hidrofóbicos eletrofílicos usados como herbicidas pré-emergentes, e promotor *PR-1a* de tabaco (Ono et al. (2004) *Biosci Biotechnol Biochem* 68:803-7) ativado por ácido salicílico. Outros promotores regulados por químicos de interesse incluem promotores de resposta a esteróides (ver, por exemplo, promotor induzido por glucocorticóide em Schena et al. (1991) *Proc Natl Acad*

Sci USA 88:10421-10425; e McNellis et al. (1998) Plant J 14:247-257); promotores induzidos por tetraciclina e reprimidos por tetraciclina (Gatz et al. (1991) Mol Gen Genet 227:229-237; U.S. Patents 5.814.618, e 5.789.156).

5

Promotores preferenciais de tecido podem ser utilizados para direciona expressão intensificada de uma seqüência de interesse em um tecido vegetal em particular. Promotores preferenciais de tecidos incluem Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol 38:792-803; Hansen et al. (1997) Mol Gen Genet 254:337-343; Russell et al. (1997) Transgenic Res 6:157-168; Rinehart et al. (1996) Plant Physiol 112:1331-1341; Van Camp et al. (1996) Plant Physiol 112:525-535; Canevascini et al. (1996) Plant Physiol 112:513-524; Lam (1994) Results Probl Cell Differ 20:181-196; e Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J 4:495-505.

Promotores preferenciais de folhas são conhecidos e incluem, por exemplo, Yamamoto et al. (1997) Plant J 12:255-265; Kwon et al. (1994) Plant Physiol 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol 35:773-778; Gotor et al. (1993) Plant J 3:509-18; Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol 23:1129-1138; Matsuoka et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90(20):9586-9590; e promotores cab e rubisco (Simpson et al. (1958) EMBO J 4:2723-2729; Timko et al. (1988) Nature 318:57-58).

Promotores preferenciais de raiz são conhecidos e incluem, por exemplo, Hire et al. (1992) Plant Mol Biol

20:207-218 (gene de glutamina sintase específico de raiz de soja); Miao et al. (1991) Plant Cell 3:11-22 (glutamina sintase citosólico (GS) expressado em raízes e nódulos de raiz de soja; Keller & Baumgartner (1991) Plant Cell 5 3:1051-1061 (elemento controle específico de raiz de gene GRP 1.8 de feijão francês); Sanger et al. (1990) Plant Mol Biol 14:433-443 (promotor específico de raiz de A manopina sintase de *. tumefaciens* (MAS)); Bogusz et al. (1990) Plant Cell 2:633-641 (promotores específicos de raiz isolados a 10 partir de *Parasponia andersonii* e *Trema tomentosa*); Leach & Aoyagi (1991) Plant Sci 79:69-76 (genes indutores de raiz rolC e rolD de *A. rhizogenes*); Teeri et al. (1989) EMBO J 8:343-350 (genes TR1' e TR2' induzidos por ferimento de *Agrobacterium*); gene promotor VfENOD-GRP3 (Kuster et al. 15 (1995) Plant Mol Biol 29:759-772); e promotor rolB (Capana et al. (1994) Plant Mol Biol 25(4):681-691; gene de faseolina (Murai et al. (1983) Science 23:476-482; Sengopta-Gopalen et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 82:3320-3324). Ver também U.S. Patents 5.837.876; 20 5.750.386; 5.633.363; 5.459.252; 5.401.836; 5.110.732; e 5.023.179.

Promotores preferenciais de sementes incluem ambos promotores específicos de sementes ativos durante o 25 desenvolvimento de sementes, assim como promotores de germinação de sementes ativos durante a germinação da semente. Ver Thompson et al. (1989) BioEssays 10:108. Promotores preferenciais de semente incluem, mas não são limitados a, Cim1 (mensagem induzida por citocinina);

cZ19B1 (zeina de 19 kDa de milho); e milps (mio-inositol-1-fosfato sintase); (ver WO 00/11177 e U.S. Patent 6.225.529). Para dicotiledôneas, promotores preferenciais de semente incluem, mas não são limitados a, β -faseolina de feijão, napina, β -conglucina, lectina de soja, cruciferina, e similares. Para monocotiledôneas, promotores de sementes incluem, mas não são limitados a, zeina de 15 kDa de milho, zeina de 22 kDa, gama zeina de 27 kDa, waxy, shrunken 1, shrunken 2, globulina 1, oleosina, e nucl. Ver também WO 00/12733, onde promotores preferenciais de semente de genes *end1* e *end2* são descritos.

Em exemplos adicionais, métodos são providos para to identificar uma região reguladora transcricional *cis* em um organismo. Uma região reguladora transcricional é qualquer elemento *cis* atuante que modula o nível de um RNA. Tais elementos incluem, mas não são limitados a, um promotor, um elemento de um promotor, um intensificador, um isolante, um íntron, ou uma região de terminação que é capaz de modular o nível de RNA em uma célula. Os métodos podem ser usados para gerar aparatos intensificadores ou promotores. Em um exemplo, o gene repórter ou marcador do sítio alvo é expressado apenas quando insere outro gene próximo a (aparato intensificador) ou (aparato promotor). O padrão de expressão do gene repórter dependerá dos elementos intensificadores do gene próximo ou no qual o gene repórter se insere. Nesse exemplo, o sítio alvo introduzido na célula ou organismo pode compreender um gene marcador operacionalmente ligado a um sítio de recombinação. Em

exemplos específicos, o gene marcador é flanqueado por sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos. O gene marcador é tanto não operacionalmente ligado a um promotor (aparato promotor) ou o gene marcador é

5 operacionalmente ligado a um promotor que não possui elementos intensificadores (aparato intensificador). Após a inserção do sítio alvo no genoma da célula ou organismo, o padrão de expressão do gene marcador é determinado para cada transformante. Quando um transformante com um padrão

10 de expressão de gene marcador de interesse é encontrado, as seqüências aparato intensificadora/promotora podem ser usadas como uma sonda para clonar o gene que possui aquele padrão de expressão, ou alternativamente para identificar o promotor ou intensificador regulando a expressão. Além

15 disso, uma vez que um sítio alvo é integrado sob controle transcricional de um elemento regulador transcricional, os métodos podem ser ainda empregados para introduzir um cassete de transferência tendo um polinucleotídeo de interesse naquele alvo na célula ou organismo. Um evento

20 de recombinação entre o sítio alvo e o cassete de transferência permitirão à seqüência de nucleotídeos de interesse a vir sob o controle transcricional do elemento promotor e/ou intensificado. Ver, por exemplo, Geisler et al. (2002) *Plant Physiol* 130:1747-1753; Topping et al. (1997) *Plant Cell* 10:1713-245; Friedrich et al. (1991) *Genes Dev* 5:1513-23; Dunn et al. (2003) *Appl Environ Microbiol* 1197-1205; e von Melchner et al. (1992) *Genes Dev* 6:919-27.

Em outros exemplos, o sítio alvo é construído para ter múltiplos grupos funcionais de sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos. Assim, múltiplos genes ou polinucleotídeos podem ser arranjados ou ordenados. Em exemplos específicos, esse método permite o arranjo de seqüências de interesse nas localidades precisas no genoma de uma célula ou organismo. Da mesma forma, uma vez que um sítio alvo foi estabelecido em uma célula ou organismo, sítios de recombinação adicionais podem ser introduzidos incorporando tais sítios no cassete de transferência. Assim, uma vez que um sítio alvo tenha se estabelecido, é possível, subsequente, adicionar sítios ou alterar sítios através de recombinação. Tais métodos são descritos em detalhe em WO 99/25821.

15

Em um exemplo, métodos para combinar múltiplos cassetes de transferência são providos. O método compreende prover um sítio alvo compreendendo pelo menos um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o primeiro e segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro. Um primeiro cassete de transferência compreendendo, na seguinte ordem, pelo menos o primeiro, um terceiro, e o segundo sítio de recombinação funcional é provido, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o terceiro sítios de recombinação do primeiro cassete de transferência flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, e caracterizado pelo fato de que o primeiro, o segundo, e o terceiro sítios de recombinação são

25

dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e uma primeira recombinase é provida, onde o primeiro cassete de transferência está integrado no sítio alvo. Pelo menos um do primeiro, segundo, ou terceiro
5 sítios de recombinação compreendem um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido.

Um segundo cassete de transferência compreendendo pelo menos o segundo e o terceiro sítios de recombinação é
10 provido, caracterizado pelo fato de que o segundo e o terceiro sítios de recombinação do segundo cassete de transferência flanqueia um segundo polinucleotídeo de interesse e uma segunda é provida. A segunda recombinase reconhece e implementa recombinação no segundo e no
15 terceiro sítios de recombinação e o segundo cassete de transferência é inserido no sítio alvo, de forma que, agora, o primeiro e o segundo cassetes de transferência seja combinados no sítio alvo. Em alguns exemplos, o sítio alvo está em um organismo. Em outros exemplos, o sítio
20 alvo está estavelmente incorporado no genoma do organismo, por exemplo uma planta. Nesse exemplo, múltiplos polinucleotídeos de interesse são arranjadas na posição alvo pré-determinada no genoma do organismo.

25 Várias alterações podem ser feitas ao método de arranjar para alcançar o resultado desejado tendo as seqüências de nucleotídeos de interesse arranjadas. Por exemplo, é provido um sítio alvo compreendendo, na seguinte ordem, pelo menos um primeiro, um segundo e um terceiro

sítio de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que os sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro. Um primeiro cassete de transferência compreendendo pelo menos o primeiro e segundo sítios de recombinação é provido, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação do primeiro cassete de transferência flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse e uma primeira recombinase é provida e reconhece e implementa recombinação no primeiro e segundo sítios de recombinação. Pelo menos um do primeiro, segundo, ou terceiro sítios de recombinação compreende um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido.

Um segundo cassete de transferência compreendendo pelo menos o segundo e o terceiro sítios de recombinação é provido, onde o segundo e o terceiro sítios de recombinação do segundo cassete de transferência flanqueia um segundo polinucleotídeo de interesse. Uma segunda recombinase é provida. A recombinase reconhece e implementa recombinação no segundo e no terceiro sítios de recombinação.

Em outros exemplos, métodos são providos para minimizar ou eliminar a expressão resultante de integração randômica de seqüências de DNA no genoma de uma célula ou organismo, tais como uma planta. Esse método compreende prover a uma célula ou organismo tendo estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo compreendendo o seguintes componentes, na seguinte ordem: um promotor ativo na

célula ou organismo operacionalmente ligado a uma seqüência ATG de início de tradução operacionalmente ligada a um sítio alvo compreendendo um primeiro e um segundo sítios de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o primeiro e segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um do primeiro ou segundo sítios de recombinação compreende um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido. Um cassete de transferência compreendendo um polinucleotídeo de interesse e o primeiro e o segundo sítios de recombinação é introduzido na célula ou organismo. A seqüência de início de tradução da seqüência de nucleotídeos de interesse no cassete de transferência foi substituída com o primeiro sítio de recombinação. Uma recombinase é provida que reconhece e implementa recombinação nos sítios de recombinação. A recombinação com o sítio alvo resulta no polinucleotídeo de interesse sendo operacionalmente ligado ao sítio ATG de início de tradução do sítio alvo contido no polinucleotídeo. Operacionalmente ligado indica uma fusão funcional entre elementos adjacentes, por exemplo a ligação entre o início de tradução, um promotor, e/ou um sítio de recombinação indica que as seqüências são colocadas juntas para gerar uma fusão em quadro que resulta em um produto gênico corretamente expressado e funcional.

Em um exemplo, um cassete de transferência compreendendo RSc::S3(noATG)-RSd, onde RS representa um sítio de recombinação e S representa um polinucleotídeo de

interesse, é introduzido em uma planta tendo estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo compreendendo P1-RSa-S1-T1-RSb-P2-ATG::RSc-S2(no ATG)-T2-RSd, onde P representa um promotor, T representa um terminador, RS representa um sítio de recombinação, e o símbolo :: indica elementos adjacentes operacionalmente ligados. ATG::RS indica que as seqüências geram uma fusão em quadro que resulta em um produto gênico corretamente expressado e funcional. Uma recombinase apropriada é provida e a recombinação ocorre nos sítios de recombinação, do forma que a seqüência entre os sítios de recombinação do cassete de transferência substitua a seqüência entre os sítios de recombinação do sítio alvo, produzindo, dessa forma, uma nova seqüência direcionalmente direcionada e reintegrada. O novo gene (S3) é agora dirigido para fora do promotor P2 no sítio alvo. Projetar construtos sem um códon ATG de início na seqüência de nucleotídeos de interesse resulta em uma probabilidade de expressão da seqüência introduzida extremamente baixa se a integração aleatória ocorre, já que o cassete de transferência necessitaria se integrar atrás de uma região promotora endógena no quadro de leitura correto.

Os sítios de recombinação FRT aqui providos podem ser usados para excisar ou inverte um polinucleotídeo de interesse. Nesse método, um polinucleotídeo é provido compreendendo, na seguinte ordem, um primeiro sítio de recombinação funcional, um polinucleotídeo de interesse, e um segundo sítio de recombinação funcional, onde o primeiro

e segundo sítios de recombinação são recombinogênicos com respeito um ao outro. Dependendo da orientação dos sítios de recombinação, o polinucleotídeo de interesse será excisado ou invertido quando a recombinase apropriada é
5 provida. Por exemplo, sítios de recombinação diretamente repetidos permitirão a excisão do polinucleotídeo de interesse e repetições invertidas permitirão uma inversão do polinucleotídeo de interesse. Tais métodos podem ser empregados tanto *in vivo* ou *in vitro*.

10

Métodos são também providos para a alteração dos sítios de recombinação. O método provê conversão entre sítios de recombinação diferentes e é baseado em estratégias mediadas por oligonucleotídeo previamente
15 descritas para fazer modificações de nucleotídeos específicas direcionadas em uma seqüência alvo especificada extracromosômica ou genômica (Yoon et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:2071-2076; Cole-Strauss et al. (1996) Science 273:1386-1389; WO99/25853; WO99/25821; e WO
20 03/076574). Usando esses métodos, os sítios de recombinação podem ser direcionados e modificados de vários meios. Por exemplo, um sítio de recombinação poderia ser modificado de forma que o par funcional de sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos é alterado
25 para gerar dois sítios de recombinação correspondentes e recombinogênicos. A expressão subsequente ou concomitante da recombinase apropriada em células com os sítios modificados correspondentes/recombinogênicos levariam a excisão ou inversão das seqüências entre esses novos sítios

de recombinação, dependendo da orientação dos sítios, dessa forma, especificamente removendo ou desligando a expressão das seqüências de DNA indesejáveis do construto previamente criados contendo essas seqüências. Uma aplicação não limitante dessa abordagem seria, por exemplo, no caso de um marcador de seleção que é requerido durante etapas iniciais de um programa de melhoramento ou cruzamento reverso para manter e selecionar plantas individuais preferidas, mas que não é desejado no produto final. Várias moléculas de oligonucleotídeos para modificação direcionada de sítios de recombinação podem ser projetadas e irão variar dependendo do sítio de recombinação sendo direcionado. Oligonucleotídeos exemplares projetados para modificar sítios de recombinação são descritos em WO99/25821 e WO 03/076574.

A conversão de sítios de recombinação podem ser também empregada nos métodos para arranjar vários polinucleotídeos no genoma de um organismo, tal como uma planta. Por exemplo, as capacidades do sistema podem ser estendidas por conversão *in vivo* de sítios de recombinação para criar novos sítios, ao invés de re-introduzir novos sítios de recombinação no organismo. Por exemplo, a conversão de sítios de recombinação dissimilares e não recombinogênicos flanqueando um marcador de seleção para sítios de recombinação correspondentes facilitaria a remoção de um marcador de seleção, ou para permitir a re-utilização do mesmo marcador de seleção em transformações futuras, provendo meios para reciclar marcadores de seleção. Um

sítio de recombinação dissimilar com uma frequência de recombinação conhecida poderia ser também modificado *in situ* para um sítio de recombinação diferente com uma frequência de recombinação similar ou alterada. Outras 5 modificações para alterar a função, similaridade, ou recombinogenicidade podem ser conseguidas.

Em outros exemplos, métodos para localizar sítios de integração preferidos no genoma de uma célula ou organismo 10 são providos. O método compreende introduzir, em uma célula ou organismo, um sítio alvo compreendendo uma sequência de nucleotídeos operacionalmente ligada a um promotor ativo no organismo. Em exemplos específicos, o sítio alvo é flanqueado por um primeiro e um segundo sítios 15 de recombinação funcional, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e pelo menos um do primeiro e segundo sítios de recombinação compreende um sítio FRT modificado aqui 20 provido. O nível de expressão do polinucleotídeo é determinado e o organismo expressando o polinucleotídeo é selecionado. A célula ou organismo ancorando esse construto de DNA pode ser então caracterizado para potencial de integração sítio-específica, potencial 25 agronômico, e número de cópias. Em outros exemplos, um cassete de transferência com o(s) sítio(s) de recombinação apropriado(s) é introduzido na célula ou organismo tendo o sítio alvo descrito acima. Uma recombinase que reconhece e

implementa recombinação nos sítios de recombinação é provida.

Em outro exemplo, uma pluralidade de cópias do polinucleotídeo de interesse é provida ao organismo, tal como uma planta. Em alguns exemplos isso é conseguido pela incorporação de um *replicon* extracromossômico no cassete de transferência (ver WO 99/25855). Em exemplos específicos, o cassete de transferência compreende um *replicon* e um polinucleotídeo de interesse flanqueado por um primeiro e segundo sítios de recombinação diretamente repetidos, caracterizado pelo fato de que os sítios de recombinação são recombinogênicos com respeito um ao outro. Quando uma recombinase apropriada é provida, o cassete de transferência flanqueado pelos primeiro e segundo sítios de recombinação diretamente repetidos é excisado do genoma do organismo, por exemplo uma planta, produzindo um *replicon* viável contendo o polinucleotídeo de interesse. A replicação desse *replicon* resulta em um alto número de cópias do *replicon*, o polinucleotídeo de interesse, e/ou prolonga a disponibilidade do cassete de transferência na célula. Em outros exemplos, um terceiro sítio de recombinação funcional é presente entre o *replicon* e o polinucleotídeo de interesse, caracterizado pelo fato de que o terceiro e o primeiro sítios de recombinação são sítios funcionais e dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro, e a presença da recombinase apropriada permite a integração do polinucleotídeo de interesse em um sítio alvo flanqueado pelo terceiro e

primeiro sítios de recombinação. Em um exemplo, pelo menos um dos sítios de recombinação usados no método compreende um sítio de recombinação FRT modificado funcional aqui provido.

5

Um *replicon* compreende uma unidade autoreplicativa extracromossômica. O *replicon* pode se originar de um vírus, plasmídio ou célula e possui a capacidade de autoreplicação. Nesse exemplo, o cassete de transferência

10 compreende ambos um *replicon* e o polinucleotídeo de interesse. Em um exemplo, um organismo tendo um sítio alvo estavelmente incorporado em seu genoma é provido. Um cassete de transferência compreendendo em uma direção 5' a 3' ou 3' a 5': um primeiro sítio de recombinação funcional,

15 um *replicon*, um segundo sítio de recombinação funcional, o polinucleotídeo de interesse, e um terceiro sítio de recombinação funcional é provido. O primeiro e terceiro sítios de recombinação desse cassete de transferência são repetidos diretamente, correspondentes e recombinogênicos

20 com respeito a cada um, e o segundo sítio de recombinação é dissimilar e não recombinogênico com respeito ao primeiro e terceiro sítios de recombinação, caracterizado pelo fato de que pelo menos um do primeiro, segundo, ou terceiro sítios de recombinação compreende um sítio de recombinação FRT

25 modificado funcional compreendendo uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, e 18. O cassete de transferência pode estar contido em um T-DNA. Em um exemplo, o *replicon* é um *replicon* viral.

Um replicon viral é qualquer DNA ou RNA derivado de um vírus que passa por replicação episomal em uma célula hospedeira. Ele contém viral seqüências virais cis atuantes necessárias para replicação, por exemplo a origem de replicação. Ele pode conter ou não conter trans-
5 atuantes seqüências virais necessárias para replicação. O DNA viral excisado é capaz de atuar como um replicon ou intermediário de replicação, tanto independentemente, ou com fatores fornecidos *in trans*. O DNA viral pode
10 codificar ou não codificar partículas virais infecciosas e adicionalmente pode conter inserções, deleções, substituições, rearranjos ou outras modificações. O DNA viral pode conter DNA heterólogo. Nesse caso, DNA heterólogo refere-se a qualquer DNA não viral ou DNA de um
15 vírus diferente. Por exemplo, o DNA heterólogo pode compreender um cassete de expressão para uma proteína ou RNA de interesse.

Replicons virais adequados para uso nos métodos e
20 composições incluem aqueles de geminivírus, begomovírus, curtovírus, ou mastrevírus, vírus de banda de RNA (-), vírus de banda de RNA (+), potivírus, potexvírus, e tobamovírus. *Replicons* virais podem incluir, também, aqueles de vírus tendo um genoma de DNA circular ou intermediário de
25 replicação, tais como: vírus de mosaico de Abutilon (AbMV), vírus de mosaico de mandioca africana (ACMV), banana vírus da listra (BSV), mosaico anão de feijão (BDMV), vírus de mosaico de feijão dourado (BGMV), vírus curly top de beterraba (BCTV), vírus western amarelo de

beterraba (BWYV) o outros luteovírus, vírus latente de
mandioca (CLV), vírus etch de cravo (CERV), vírus de
mosaico de couve-flor (CaMV), vírus de mosaico cloris
estriado (CSMV), vírus da mancha amarela de *commelina*
5 (CoYMV), vírus de mosaico de pepino (CMV), vírus de mosaico
de dália (DaMV), vírus da listra de *digitaria* (DSV), vírus
de mosaico de erva-de-São Pedro (FMV), viróide de
crescimento (HSV), vírus da listra de milho (MSV), vírus de
mosaico de *mirabilias* (MMV), vírus da listra de *miscanthus*
10 (MiSV), vírus de crescimento de tubérculo de batata (PSTV),
vírus da listra de panicum (PSV), vírus de mosaico amarelo
de batata (PYMV), vírus X de batata (PVX), vírus tungro
baciliforme de arroz (RTBV), vírus da mancha clorótica de
soja (SoyCMV), Vírus da folha enrolada de abóbora (SqLCV),
15 Vírus das bandas de vasos de morango (SVBV), vírus da
listra da cana-de-açúcar (SSV), vírus da mancha de thistle
(ThMV), vírus de mosaico de tabaco (TMV), vírus de mosaico
dourado de tomate (TGMV), vírus da mancha de tomate (TMoV),
vírus da mancha anelada de tabaco (TobRV), vírus anão
20 amarelo de tabaco (TobYDV), vírus da folha enrolada de
tomate (TLCV), vírus da folha enrolada amarela de tomate
(TYLCV), vírus da folha enrolada amarela de tomate-*Thailand*
(TYLCV-t) e vírus anão de trigo (WDV) e derivados desses.
Em alguns exemplos, o replicon viral pode ser de ACMV, MSV,
25 WDV, TGMV ou TMV.

Em outros exemplos, a inserção de um polinucleotídeo
de interesse no genoma do organismo ocorre via um único
evento de *cross over*. Por exemplo, o cassete de

transferência pode compreender um primeiro sítio de recombinação, um *replicon*, um polinucleotídeo de interesse, e um segundo sítio de recombinação. O primeiro e segundo sítios de recombinação do cassete de transferência são recombino-
5 recombino-
gênicos dissimilares ou correspondentes, e diretamente repetidos com respeito um ao outro. O sítio alvo pode compreender um único sítio de recombinação que é recombino-
gênico para um dos sítios de recombinação do cassete de transferência. Tais sítios de recombinação recombino-
10 recombino-
gênico podem ser projetado de forma que eventos de recombinação integrativo são favorecidos por uma reação de excisão. Tais sítios de recombinação recombino-
gênico são conhecidos, por exemplo, Albert et al. introduziu mudanças de nucleotídeo no elemento da esquerda de 13 pb (LE sítio
15 lox mutante) ou elemento da direita de 13 pb (RE sítio lox mutante) do sítio lox. A recombinação entre o sítio lox LE mutante e o sítio lox RE mutante produz o sítio loxP de tipo selvagem e um sítio mutante LE + RE que é pobremente reconhecido pela recombinase Cre, resultando em um evento
20 de integração estável (Albert et al. (1995) Plant J 7:649-659). Ver também, por exemplo, Araki et al. (1997) Nucleic Acids Res 25:868-872.

O cassete de transferência é introduzido no organismo compreendendo o sítio alvo. Quando uma recombinase
25 apropriada é provida, um evento de recombinação entre os sítios de recombinação recombino-
gênicos do cassete de transferência ocorre. Esse evento resulta em excisão do *replicon*, o que pode assumir uma forma circular. A

replicação da unidade *replicon* resulta em um alto número de cópias do *replicon* no organismo e prolonga a disponibilidade do cassete de transferência na célula. Um segundo evento de recombinação entre os sítios de recombinação recombinogênicos do sítio alvo e o cassete de transferência permite a integração estável da unidade *replicon* e do polinucleotídeo de interesse no sítio alvo do organismo.

10 Os métodos provêm inserção direcionada de um polinucleotídeo de interesse. Se o polinucleotídeo de interesse é introduzido em um organismo, ele pode provocar várias mudanças no organismo, particularmente plantas, incluindo, mas não limitando-se a, modificação da
15 composição de ácidos graxos na planta, alterar o conteúdo de aminoácidos da planta, alterando a resistência a patógenos, e similares. Esses resultados podem ser alcançados provendo a expressão de produtos heterólogos, expressão aumentada de produtos endógenos em plantas, ou
20 expressão suprimida de produtos endógenos em plantas.

Categorias gerais de polinucleotídeos de interesse incluem por exemplo, aqueles genes envolvidos em informação, tais como dedos de zinco, aqueles envolvidos em
25 comunicação, tais como quinases, e aqueles envolvidos em manutenção, tais como proteína de choque de calor. Categorias mais específicas de transgenes incluem por exemplo, seqüências codificando traços para agronomia, resistência a insetos, resistência a doenças, resistência a

herbicidas, esterilidade, característica de grãos, óleo, amido, carboidratos, fitato, proteínas, nutrientes, metabolismo, digestibilidade, tamanho de grão, carregamento de sacarose, e produtos comerciais. Traços, tais como

5 conteúdo de óleo, amido e proteína podem ser geneticamente alterados. Modificações incluem aumentar o conteúdo de ácido oléico, óleos saturados e insaturados, aumentar os níveis de lisina e enxofre, prover aminoácidos essenciais, e também modificação de amido. Modificações em proteína

10 hordotionina para alterar os níveis de aminoácidos são descritas em U.S. Patents 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802, 5.990.389. Outros exemplos são uma proteína de semente rica em lisina e/ou enxofre codificada pela albumina 2S de soja descrita em U.S. Patent 5.850.016, e o inibidor de

15 quimotripsina de cevada, descrito em Williamson et al. (1987) Eur J Biochem 165:99-106.

Derivados das seqüências codificadoras podem ser feitos para aumentar o nível de aminoácidos pré-

20 selecionados no polipeptídeo codificado. Por exemplo, polinucleotídeos codificando um polipeptídeo de alta lisina de cevada (BHL) são derivados do inibidor de quimotripsina de cevada (WO 98/20133). Outras proteínas incluem proteínas vegetais ricas em metionina, tais como de

25 sementes de girassol (Lilley et al. (1989) *Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*, ed. Applewhite (American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois), pp. 497-502); milho (Pedersen et al. (1986) J Biol Chem 261:6279;

Kirihara et al. (1988) Gene 71:3); e arroz (Musumura et al. (1989) Plant Mol Biol 12:123).

Polinucleotídeos de resistência a insetos podem
5 codificar resistência a pestes, tais como larva da raiz,
broca, larva de traça européia, e similares. Tais
polinucleotídeos incluem, por exemplo, genes de proteína
tóxica de *Bacillus thuringiensis* (U.S. Patents 5.366.892;
5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser et al.
10 (1986) Gene 48:109); e similares.

Polinucleotídeos codificando traços de resistência a
doenças incluem genes de desintoxicação, tais como contra
fumonosina (U.S. Patent 5.792.931); avirulência (avr) e
15 genes de resistência a doenças (R) (Jones et al. (1994)
Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; e
Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); e similares.

Traços de resistência a herbicidas podem incluir genes
20 codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir
a ação de acetolactato sintase (ALS), em particular os
herbicidas tipo sulfoniluréia, tais como clorosulfuron
(e.g., as mutações S4 e/ou Hra em ALS); genes codificando
resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de
25 glutamina sintase, tais como fosfinotricina ou basta (e.g.,
o gene bar); glifosato (e.g., o gene EPSPS ou o gene GAT;
ver, por exemplo, publicações de patente US20040082770 e WO
03/092360) ou outros genes conhecidos. Resistência a
antibióticos pode ser também provida, por exemplo o gene

nptII codifica resistência aos antibióticos canamicina e geneticina.

Genes de esterilidade podem ser também codificados em um cassete de expressão e provêm uma alternativa para a retirada de pendão física. Exemplos de genes usado em tais meios incluem genes preferenciais de tecido masculino e genes com fenótipos de esterilidade masculina, tais como QM, descrito em U.S. Patent 5.583.210. Outros genes incluem quinases e aqueles codificando compostos tóxicos a tanto desenvolvimento de gametófito masculino ou feminino.

Traços comerciais podem ser também codificados em um gene ou genes que poderiam, por exemplo aumentar o amido para produção de etanol, ou prover a expressão de proteínas. Outro uso comercial de plantas transformadas é a produção de polímeros e bioplásticos, tal como descrito em U.S. Patent 5.602.321. Genes, tais como β -Ketotiolase, PHBase (polihidroxiburirato sintase), e acetoacetyl-CoA redutase (ver Schubert *et al.* (1988) *J Bacteriol* 170:5837-5847) facilitam a expressão de polihidroxialcanoatos (PHAs).

A redução da atividade de genes específicos (também conhecidos como silenciamento gênico, ou supressão gênica) é desejável para diversos aspectos de engenharia genética em plantas. Várias técnicas para silenciamento de genes são bem conhecidas, incluindo, mas não limitando-se a, tecnologia antisense (ver, *e.g.*, Sheehy *et al.* (1988) *Proc*

Natl Acad Sci USA 85:8805-8809; e U.S. Patents 5.107.065; 5.453.566; e 5.759.829); co-supressão (e.g., Taylor (1997) Plant Cell 9:1245; Jorgensen (1990) Trends Biotech 8:340-344; Flavell (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:3490-3496; 5 Finnegan et al. (1994) Bio/Technology 12: 883-888; e Neuhuber et al. (1994) Mol Gen Genet 244:230-241); interferência de RNA (Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; U.S. Patent 5.034.323; Sharp (1999) Genes Dev 13:139-141; Zamore et al. (2000) Cell 101:25-33; Javier 10 (2003) Nature 425:257-263; e, Montgomery et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:15502-15507), silenciamento gênico induzido por vírus (Burton, et al. (2000) Plant Cell 12:691-705; e Baulcombe (1999) Curr Op Plant Bio 2:109-113); ribozimas de direcionamento de RNA específico 15 (Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); estruturas (Smith et al. (2000) Nature 407:319-320; WO 99/53050; WO 02/00904; e WO 98/53083); ribozimas (Steinecke et al. (1992) EMBO J 11:1525; U.S. Patent 4.987.071; e, Perriman et al. (1993) Antisense Res Dev 3:253); modificação 20 direcionada mediada por oligonucleotídeo (e.g., WO 03/076574 e WO 99/25853); moléculas dedo de zinco direcionadas (e.g., WO 01/52620; WO 03/048345; e WO 00/42219); e outros métodos ou combinações conhecidas dos métodos acima.

25

Os polinucleotídeos podem ser providos em um construto de DNA. Além disso, em exemplos específicos sítios de recombinação e/ou o polinucleotídeo codificando uma recombinase apropriada é também contido no construto de

DNA. O cassete pode incluir seqüências reguladoras 5' e 3' operacionalmente ligadas ao polinucleotídeo de interesse. Alternativamente, o construto de DNA flanqueado pelo sítio de recombinação apropriado pode não possuir os elementos reguladores 5' e/ou 3'. Nessa instância, o construto de DNA é projetado de forma que, na presença da recombinase apropriada, um evento de recombinação no sítio alvo resulte nas regiões reguladoras 5' e/ou 3' sendo operacionalmente ligadas às seqüências do construto de DNA. Seqüências intervenientes podem estar presentes entre elementos operacionalmente ligados e não rompem a ligação funcional. O cassete pode conter, adicionalmente, pelo menos um gene adicional a ser introduzido no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(is) pode ser provido em múltiplos construtos de DNA. Tal construto de DNA pode ser provido com uma pluralidade de sítios de restrição ou sítios de recombinação para inserção da seqüência de interesse a estar sob regulação transcricional das regiões reguladoras. O cassete de expressão pode conter, adicionalmente, genes marcadores de seleção e/ou rastreáveis.

Em alguns exemplos, o construto de DNA pode incluir na direção 5' a 3' de transcrição, uma região de início de transcrição e tradução, um polinucleotídeo de interesse, e uma região de terminação de transcrição e tradução transcricional funcional no organismo de interesse. Em outros exemplos, o construto de DNA compreende um polinucleotídeo de interesse 3' a um sítio de recombinação.

Nesse exemplo, o sítio alvo pode compreender um promotor 5' para o sítio de recombinação correspondente, dessa forma, com a recombinação, a seqüência de nucleotídeos de interesse é operacionalmente ligada à seqüência promotora.

5 Os vários sítios de recombinação aqui providos podem ser posicionados em qualquer lugar no construto de DNA, incluindo 5' UTR, 3' UTR, regiões reguladoras, introns e/ou seqüência codificadora.

10 A região de iniciação transcricional, o promotor, pode ser nativa, análoga, estrangeira, ou heteróloga para o organismo hospedeiro ou para o polinucleotídeo de interesse. Adicionalmente, o promotor pode ser a seqüência natural ou, alternativamente, uma seqüência sintética.

15 Tais construtos podem mudar os níveis de expressão do polinucleotídeo de interesse no organismo. A região de terminação pode ser nativa ou heteróloga para a região de iniciação transcricional, pode ser nativa ou heteróloga para o polinucleotídeo operacionalmente ligado de

20 interesse, ou pode ser nativa ou heteróloga para o organismo hospedeiro. Regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, tais como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Ver também Guerineau et al.

25 (1991) Mol Gen Genet 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res 17:7891-7903; e Joshi et al. (1987) Nucleic Acids Res

15:9627-9639. A seqüência de nucleotídeos de interesse pode ser também nativa ou análoga ou estrangeira ou heteróloga para o organismo hospedeiro.

5 Quando apropriado, o uso de códon na seqüência de nucleotídeos de interesse ou na recombinase pode ser modificado para expressão no organismo transformado. Por exemplo, os genes podem ser sintetizados usando códons preferenciais de plantas para expressão melhorada. Ver, por
10 exemplo, Campbell & Gowri (1990) Plant Physiol 92:1-11 para uma discussão de uso de códon preferencial de hospedeiro. Métodos estão disponíveis para genes sintetizados preferenciais de plantas. Ver, por exemplo, U.S. Patents 5.380.831, e 5.436.391, WO 99/25841, e Murray et al. (1989)
15 Nucleic Acids Res 17:477-498.

Modificações adicionais de seqüências são conhecidas para intensificar a expressão gênica em um hospedeiro celular. Essas incluem a eliminação de seqüências
20 codificando sinais espúrios de poliadenilação, sinais de sítio de *splice* éxon-intron, repetições tipo *transposon*, e outras tais seqüências bem caracterizadas que podem ser deletérias à expressão gênica. O conteúdo G-C da seqüência pode ser ajustada para níveis médios para um dado
25 hospedeiro celular, como calculado por referência a genes conhecidos expressados na célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas *hairpin* de RNAm secundário previstas.

O construto de DNA pode adicionalmente conter seqüências líder 5'. Tais seqüências líder podem atuar para intensificar a tradução. Líderes de tradução são conhecidos e incluem líderes de picornavírus, por exemplo, líder EMCV (região 5' não codificadora de encefalomiocardite) (Elroy-Stein et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:6126-6130); líderes de potivírus, por exemplo, líder TEV (Vírus Etch de tabaco) (Gallie et al. (1995) Gene 165:233-238), líder MDMV (Vírus de mosaico anão do milho) (Allison et al. (1986) Virology 154:9-20; e Kong et al. (1988) Arch Virol 143:1791-1799), e proteína imunoglobulina de cadeia pesada humana (BiP) (Macejak et al. (1991) Nature 353:90-94); líder não traduzido de capa de proteína de RNAm de vírus de mosaico de alfafa (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) Nature 325:622-625); líder de vírus de mosaico de tabaco (TMV) (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); e líder de vírus clorótico de milho (MCMV) (Lommel et al. (1991) Virology 81:382-385). Ver também, Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol 84:965-968. Outros métodos ou seqüências conhecidas por intensificar a tradução também podem ser utilizados, por exemplo, introns, e similares.

Na preparação do construto de DNA, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados para posicionar as seqüências na orientação correta, se apropriado, no quadro de leitura correto. Nessa direção, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para juntar os fragmentos de DNA ou

outras manipulações podem ser envolvidas para prover sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, ou similares. Para esse propósito, mutagênese *in vitro*, reparo de primer, restrição, anelamento, re-substituições, transições e/ou transversões, podem ser envolvidas.

Geralmente, o construto de DNA compreenderá um gene marcador de seleção para a seleção de células transformadas.

10 Genes marcadores de seleção são utilizados para a seleção de células transformadas ou tecidos e foram discutidos em detalhe aqui em outra parte, assim como, promotores de interesse exemplares.

15 Os seguintes exemplos são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

EXPERIMENTAL

20 **Exemplo 1. Geração de bibliotecas compreendendo sítios de recombinação FRT modificados.**

Dois oligonucleotídeos complementares degenerados contendo seqüências FRT, com as 6 posições centrais de espaçamento sendo randomicamente mutagenizadas, foram sintetizados na Synthetic Genetics (San Diego, CA):

Oligo 1:5'-
gccagcatgcaagcttgaattccgaagttcctatactNNNNNNagaataggaacttcga

gatctggatccgcggaacg-3' (SEQ ID NO:52); e Oligo2: 5'-
cgttccgcggatccagatctcgaagttcctattctNNNNNNNagtataggaacttcggaa
ttcaagcttgcatgctggc-3' (SEQ ID NO:53).

5 A região de espaçamento é de 8 pb. Nesse experimento,
a região central de 6 pb foi visada para modificação, e
assim, os outros dois nucleotídeos são mantidos sem
mudança. Um pmol de oligo 1 e um pmol de oligo 2 foram
anelados por desnaturação por calor a 95°C por 2 minutos,
10 seguido por resfriamento gradual a temperatura ambiente.
Os oligonucleotídeos anelados foram digeridos com *EcoRI* e
BamHI e ligados nos sítios *EcoRI/BamHI* de um vetor derivado
de pSportI, a qual 3 bases adicionais criaram um sítio de
restrição *HpaI* (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) e
15 o vetor PHP13273 contendo um gene de resistência
espectinomicina para criar duas bibliotecas de plasmídios
FRT modificados. Uma razão molar de 10:1 e 4:1 de
oligonucleotídeo anelado para pSport e PHP13273 foi usada
para as respectivas reações de ligação. Sob essas
20 condições de ligação, 10 de 10 colônias randomicamente
escolhidas foram encontradas contendo uma inserção
monomérica de um sítio FRT modificado. A biblioteca de FRT
modificado referida como "biblioteca A" está no vetor
pSport e carrega o marcador resistente a antibiótico
25 ampicilina. A biblioteca de FRT modificado, referida como
"biblioteca B" está no vetor PHP13273 e carrega o marcador
resistente a antibiótico espectinomicina. Um número total
de 15.904 colônias foi coletado para fazer uma biblioteca A
FRT e 19.600 colônias foram coletadas para fazer uma

biblioteca B FRT. Isso representou uma cobertura de 4x das 6 posições centrais ($4^6=4096$) no sítio FRT. DNA de plasmídio foi isolado dessas duas bibliotecas e usado para o rastreamento na escala de biblioteca.

5

Exemplo 2. Rastreamento na escala de biblioteca para identificar sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos.

10 Uma quantidade molar igual de DNA de cada das bibliotecas FRT modificadas A e B foi misturada em um tubo contendo tampão de reação para recombinação *in vitro* mediada por FLP. Uma reação de recombinação típica de 20 μ l compreende 25mM Tris·Cl a pH 7,5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT,
15 50fmol DNA de biblioteca A, 50fmol DNA de biblioteca B, e 2 μ l FLP (0,07 μ g/ μ l final). A reação é conduzida a 30°C, e alíquotas tomadas em vários pontos do tempo. Em cada momento, alíquotas de 2 μ l foram tomadas e a reação cessou
20 fervendo-se por 1 min com resfriamento gradual a temperatura ambiente. Tipicamente, amostras foram tomadas a 0, 2, 5, 10, 30, 60, e 90 minutos e poderiam ser usadas para avaliar sítios FRT reativos rápidos vs lentos. Se apenas um ponto do tempo foi tomado, o ponto dos 90 minutos foi usado.

25

Amostras de reação foram transferidas em células de *E. coli* DH5 α de acordo com procedimentos padrão. Alíquotas iguais de cada mistura de transformação foram espalhadas em uma placa cada contendo tanto apenas ampicilina, apenas

espectinomicina, ou contendo ambas ampicilina e espectinomicina. O DNA co-integrante recombinado com sucesso carregará ambos marcadores de seleção e, assim, após transferência em *E. coli*, irá conferir resistência a
5 ambas ampicilina e espectinomicina.

Aquelas colônias com resistência a ambos antibióticos foram escolhidas e o DNA de plasmídio foi preparado usando o kit de preparação de DNA de plasmídio *Montage 96-well HTP*
10 (Millipore, Billerica, MA USA). Sítios FRT candidatos foram obtidos por PCR usando *primers* flanqueando sítios FRT recombinados no DNA co-integrante. Os *primers* de PCR usado foram *primer Forward*: 5'-gcacatacaaatggacgaacgga-3 (SEQ ID NO:54) e *primer Reverso*: 5'-cctcttcgctattacgccagct-3' (SEQ
15 ID NO:55). As condições de PCR foram como se segue: um ciclo: 95°C, 1 min; 20 ciclos: 95°C, 30 seg; 61°C, 2 min; um ciclo: 67°C, 3 min; Espera: 4°C. A seqüência dos sítios FRT candidatos amplificados foi determinada por seqüenciamento
20 *Cycle* (essencialmente como descrito em Slatko et al. (1993) *DNA Sequencing*. In, *Current Protocols in Molecular Biology*, (ed. By Ausubel et al.) Ch. 7, pp 7.0.1-7.6.13. New York: John Wiley & Sons).

**Exemplo 3. Métodos para testar a eficiência de
25 excisão de sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos.**

Para testar a eficiência de excisão mediada por recombinase de um sítio FRT candidato, vetores de excisão

foram feitos, nos quais duas cópias de um sitio FRT modificado recombinogênico candidato foram clonadas em orientação direta flanqueando a seqüência promotora de ubiquitina de milho em pSport (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD). Uma reação de excisão foi conduzida sob as seguintes condições: 3µl de minipreparado de DNA vetor de excisão (2mg/ml), 1µl 10x tampão (250mM Tris·Cl a pH 7,5, 100mM MgCl₂, 50mM DTT), 5µl ddH₂O, e 1µl FLP (0,72 mg/ml). A mistura de reação foi incubada a 30°C por 30 min, fervida por 2 min, resfriada a temperatura ambiente, digerida com *EcoRV* e *XhoI*, e, então sujeita a eletroforese de gel de agarose.

EcoRV gera um único corte na espinha dorsal do vetor pSport, enquanto *XhoI* gera um único corte na seqüência de promotor de ubiquitina de milho. A dupla digestão do vetor de excisão não recombinado produz dois fragmentos de 4332 pb e 769 pb. A dupla digestão do vetor produto, após a excisão ocorrer, produz um fragmento adicional de 952pb. Os fragmentos de DNA foram quantificados usando software Quantity One da Bio-Rad Laboratories. A medida que a excisão ocorre, uma quantidade aumentada do fragmento de 952 pb é produzida e menos do fragmento de 769 pb é produzido. Assim, a razão do fragmento de 952 pb para o fragmento de 769 pb mede a eficiência absoluta de excisão. Nesse experimento, eficiência relativa de excisão de recombinação (% eficiência de excisão) de um sitio FRT é calculada como a eficiência de excisão na presença de FLP nativa de levedura de um primeiro sitio FRT modificado com

um segundo sitio FRT modificado divida pela eficiência de excisão de um par de sítios FRT de tipo selvagem (SEQ ID NO:39) X 100%.

5 Vários sítios de recombinação FRT modificados identificados nos métodos do Exemplo 2 foram analisados para sua habilidade de reter atividade biológica. A Tabela 1 apresenta vários sítios de recombinação FRT modificados funcionais e sua eficiência relativa de recombinação
10 determinada como destacado acima.

Tabela 1

Sítios FRT	SEQ ID NO para sitio FRT modificado mínimo	Seqüência de Espaçamento	SEQ ID No para seqüência de espaçamento modificada	Eficiência de excisão (%)
FRT1	39	TTTCTAGA	43	100
FRT12	21	TCTATGTA	1	102
FRT57	22	TTTTCTAA	2	82
FRT85	23	TTTCTTGA	3	116
FRT87	24	TTTCTGGA	4	93
FRT53	25	TGTA AAAA	5	64
FRT62	26	TTTAGGTA	6	72
FRT78	27	TGAAAAGA	7	60
FRT34	28	TGTAATGA	8	34
FRT70	29	TATACAAA	9	25

FRT76	30	TTCCATAA	10	30
FRT89	31	TCTCTAGA	11	39
FRT43	32	TTCCGAGA	12	14
FRT45	33	TCTCTTGA	13	5
FRT55	34	TCCACAGA	14	7
FRT65	35	TGATTGGA	15	18
FRT69	36	TTTTGTGA	16	9
FRT74	37	TGAGAGAA	17	5
FRT86	38	TTTCTCGA	18	12
FRT5	40	CTTTTGAA	44	15

*As seqüências de espaçamento foram flanqueadas pelo elemento simétrico de tipo selvagem de 13 pares de base relatado na Figura 1.

5 **Exemplo 4. Métodos para testar a eficiência de co-integração sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos.**

10 O experimento foi conduzido como descrito no Exemplo 2. Resumidamente, FRT1, 5, a 6 (SEQ ID NOS:39, 40, e 41) foram individualmente clonados em sítios *EcoRI/BamHI* de PHP13273 e modificaram o vetor pSport1. 50 fmol de DNA de FRT1 em PHP13273 (Spec^r) foi misturado com 50 fmol de DNA de FRT1 em pSport1 modificado (Ap^r) em 20µl de tampão de
15 reação contendo 25mM Tris·Cl a pH 7,5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, e 2µl FLP (0,07µg/µl final). A cada ponto de tempo, alíquotas de 2µl foram tomadas e a reação cessou fervendo-se por 1 min com resfriamento gradual a temperatura ambiente. Amostras de reação foram transferidas em células

de *E. coli* DH5 α de acordo com procedimentos padrão. Aliquotas iguais de cada mistura de transformação foram espalhadas em uma placa cada contendo ampicilina apenas, espectinomicina apenas, ou contendo ambas ampicilina e
 5 espectinomicina. O DNA co-integrado recombinado com sucesso via sítios FRT1 carregará ambos marcadores de seleção e, assim, após a transferência em *E. coli*, irá conferir resistência a ambas ampicilina e espectinomicina. Aquelas colônias com resistência a ambos antibióticos foram
 10 escolhidas e DNA de plasmídio co-integrado foi preparado para análise adicional. Clones que são resistentes a ambos antibióticos, mas não abrigam DNA de plasmídio co-integrado foram subtraídos no cálculo da frequência de co-integração.

15 A frequência de co-integração de FRT1 foi determinada calculando-se a porcentagem de colônias abrigando DNA de plasmídio co-integrado dentre as colônias resistentes a uma das drogas antibióticas. Similarmente, a integração *in vitro* de FRT5 ou FRT6 foi efetuadas e a frequência de co-
 20 integração de FRT5 ou FRT6 foi determinada conseqüentemente. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

25 Tabela 2. Porcentagem de co-integrantes recuperados a partir de recombinação *in vitro* mediada por FLP (%)

Tempo (h)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
FRT1 + FRT1	0,01	0,32	0,70	0,98	1,03
FRT5 + FRT5	0,00	0,04	0,04	0,08	0,09

FRT6 + FRT6	0,02	0,20	0,18	0,28	0,27
-------------	------	------	------	------	------

Recombinação *in vitro* mediada por FLP foi efetuada como descrito anteriormente. Quando o DNA contendo sítios FRT dissimilares é misturado na reação, tal como no rastreamento em escala de biblioteca previamente descrito, a recombinação intermolecular entre dois sítios FRT correspondentes é adicionalmente reduzida. Em reações contendo sítios FRT1 apenas, sítios FRT5 apenas, ou sítios FRT6 apenas, a recombinação entre sítios FRT1 é de aproximadamente 10 vezes mais eficiente do que entre sítios FRT5 e aproximadamente 4 vezes mais eficiente do que entre sítios FRT6 (Tabela 2).

Nesse exemplo, DNA de plasmídio contendo três sítios FRT diferentes (FRT1, FRT5, e FRT6), cada um residindo em pSport1 modificado carregando marcador de seleção Ap^r e PHP13273 carregando Spec^r, foram misturados na reação. Dentre FRT1, FRT5, e FRT6, dois sítios FRT diferentes não recombina um com o outro. Na reação tendo quantidade equimolar de DNA contendo sítios FRT de FRT1, FRT5, e FRT6, a eficiência de recombinação entre quaisquer dois sítios FRT correspondentes é reduzida. Os resultados são apresentados na Tabela 3. A frequência de co-integração combinada entre dois sítios FRT1, dois sítios FRT5, e dois sítios FRT6 foi de 0,09% após 90 minutos, aproximadamente 10 vezes menos do que da reação tendo apenas o sítio FRT1. A maioria dos co-integrantes é de recombinação via os sítios FRT mais eficientes, FRT1, na reação como indicado

pelo fato de que todos os 10 co-integrantes randomicamente escolhidos foram produtos de recombinação de sítios FRT1. Na reação tendo menos quantidade molar de DNA contendo sítio FRT1 (razão molar dentre FRT1, FRT5, e FRT6 é: 5 0,04:1,00:1,00), a recombinação total foi adicionalmente reduzida. Ainda, nenhum dos 10 co-integrantes randomicamente escolhidos foi produto de recombinação de sítios FRT1.

10

Tabela 3

Sítios FRT *	Co-integrante (%)	FRT1 co-integrante/Total co-integrante analisado
FRT1 (Ap ^r , 50fmol) + FRT1 (Spec ^r , 50fmol)	0,98	10/10
FRT5 (Ap ^r , 50fmol) + FRT5 (Spec ^r , 50fmol)	0,08	NA
FRT6 (Ap ^r , 50fmol) + FRT6 (Spec ^r , 50fmol)	0,28	NA
FRT1 (Ap ^r , 16fmol) + FRT1 (Spec ^r , 16fmol) + FRT5 (Ap ^r , 16fmol) + FRT5 (Spec ^r , 16fmol) + FRT6 (Ap ^r , 16fmol) + FRT6 (Spec ^r , 16fmol)	0,09	10/10

Sítios FRT *	Co- integrante (%)	FRT1 co- integrante/Total co- integrante analisado
FRT1 (Ap ^r , 0,8fmol) + FRT1 (Spec ^r , 0,8fmol) + FRT5 (Ap ^r , 20fmol) + FRT5 (Spec ^r , 20fmol) + FRT6 (Ap ^r , 20fmol) + FRT6 (Spec ^r , 20fmol)	0,07	0/10

* O Marcador de seleção e a quantidade molar de DNA usado na reação estão incluídos nos parênteses.

Exemplo 5: Transformação vegetal

5

A. Transformação por Bombardeamento de Partículas e Regeneração de Calo de Milho

Embriões imaturos de milho oriundos de estufa ou
10 cultivados no campo de plantas doadoras do tipo High type
II (HiII) são bombardeados com um polinucleotídeo isolado
compreendendo um sítio de recombinação, cassete de
transferência, sítio alvo, e/ou recombinase aqui providos.
Se o polinucleotídeo não inclui um marcador de seleção,
15 outro polinucleotídeo contendo um gene marcador de seleção
pode ser co-precipitado nas partículas usadas para
bombardeamento. Por exemplo, um plasmídeo o gene PAT
(Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37) que confere

resistência ao herbicida Bialaphos pode ser usado. A transformação é efetuada com se segue.

As espigas são esterilizadas na sua superfície em 50%
5 alvejante Chlorox mais 0,5% Micro detergente por 20 minutos, e enxaguado duas vezes com água estéril. Os embriões imaturos são excisados e colocado com o eixo do embrião para baixo (lado do escutelo para cima), 25 embriões por placa. Esses são cultivados em meio de ágar
10 560L, 4 dias antes do bombardeamento no escuro. O meio 560L é um meio baseado em N6 contendo vitaminas Eriksson's, tiamina, sacarose, 2,4-D, e nitrato de prata. No dia de bombardeamento, os embriões são transferidos para meio 560Y por 4 horas e são arranjados na zona alvo de 2,5 cm. Meio
15 560Y é um meio altamente osmótico (560L com alta concentração de sacarose).

Um vetor de plasmídio compreendendo um polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao promotor
20 selecionado é construído. Esse DNA de plasmídio, mas DNA de plasmídio contendo um marcador de seleção PAT se necessário, é precipitado em pelotas de ouro de 1,0 μm (diâmetro médio) usando um procedimento de precipitação com CaCl_2 com se segue: 100 μl preparado de partículas de ouro
25 (0,6 mg) em água, 20 μl (2 μg) DNA em tampão TrisEDTA (1 μg total), 100 μl 2,5 M CaCl_2 , 40 μl 0,1 M espermidina.

Cada reagente é adicionado seqüencialmente à suspensão de partículas de ouro. A mistura final é brevemente

sonicada. Após o período de precipitação, os tubos são centrifugados brevemente, o líquido removido, lavados com 500 µl 100% etanol, e centrifugados novamente por 30 segundos. Novamente, o líquido é removido, e 60 µl 100% etanol é adicionado à pelota de partículas de ouro final. Para o bombardeamento de partículas com pistola, as partículas ouro/DNA são brevemente sonicadas e 5 µl colocadas no centro de cada macrocarregador e deixadas secando por cerca de 2 minutos antes do bombardeamento.

10

As placas de amostras são bombardeadas a uma distância de 8 cm a partir da tela de parada ao tecido, usando uma pistola biolística *DuPont* de partículas de hélio. Todas as amostras recebem um único tiro a 650 PSI, com um total de dez alíquotas tiradas de cada tubo de preparado partículas/DNA.

De quatro a 12 horas após o bombardeamento, os embriões são movidos para 560P (um meio de iniciação de calo pouco osmótico similar a 560L mas com menos nitrato de prata), por 3-7 dias, então transferidos a meio de seleção 560R, um meio baseado em N6 similar a 560P contendo Bialaphos a 3 mg/litro, e subcultivado a cada 2 semanas. Após aproximadamente 10 semanas de seleção, clones de calos são amostrados para PCR e/ou atividade do polinucleotídeo de interesse. Linhas positivas são transferidas para meio 288J, um meio baseado em MS com menos sacarose e níveis de hormônio, para iniciar a regeneração vegetal. Seguindo o amadurecimento de embrião somático (2-4 semanas), embriões

somáticos bem desenvolvidos são transferidos para meio para germinação e transferidos para a sala de cultura iluminada. Aproximadamente 7-10 dias depois, as plântulas em desenvolvimento são transferidas para meio em tubos por 7-10 dias até que as plântulas estejam bem estabelecidas. As plantas são, então, transferidas para inserções em recipientes (equivalente a pote de 2,5") contendo solo de pote e cultivadas por 1 semana em uma câmara de crescimento, subseqüentemente cultivadas por 1-2 semanas adicionais na estufa, então transferidas para potes Classic™ 600 (1,6 galão) e cultivadas para maturidade. As plantas são monitoradas para expressão do polinucleotídeo de interesse.

15 B. Transformação mediada por *Agrobacterium* e Regeneração de Calos de Milho

Para transformação de milho mediada por *Agrobacterium*, um polinucleotídeo compreendendo um sítio de recombinação, cassete de transferência, sítio alvo, e/ou recombinase aqui providos é usado com o método de Zhao (U.S. Patent 5.981.840).

Resumidamente, embriões imaturos são isolados de milho e os embriões contatados com uma suspensão de *Agrobacterium* contendo um polinucleotídeo de interesse, onde as bactérias são capazes de transferir a seqüência de nucleotídeos de interesse a pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nessa

etapa, os embriões imaturos são imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para o início da inoculação. Os embriões são co-cultivados por um tempo com as *Agrobacterium* (etapa 2: a etapa de co-cultivo). Seguindo esse período de co-cultivo, uma etapa ótima de "descanso" pode ser efetuada (etapa 3: etapa de descanso). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção, para eliminação de *Agrobacterium* e por uma fase de descanso para as células infectadas. Em seguida, os embriões inoculados são cultivados em meio contendo um agente seletivo e o cultivo de calos transformados é recuperado (etapa 4: a etapa de seleção). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com um agente seletivo resultando no crescimento seletivo de células transformadas. O calo é, então, regenerado em plantas (etapa 5: a etapa de regeneração), e os calos cultivados em meio seletivo são cultivados em meio sólido para regenerar as plantas.

C. Transformação de Dicotiledôneas

20

Um polinucleotídeo compreendendo um sítio de recombinação, cassete de transferência, sítio alvo, e/ou recombinase aqui providos, pode ser introduzido em culturas embriogênicas em suspensão de soja por bombardeamento de partículas usando essencialmente os métodos descritos em Parrott, et al. (1989) *Plant Cell Rep.* 7:615-617. Esse método, com modificações, é descrito abaixo.

As sementes são removidas de vagens quando os cotilédones são de 3 a 5 mm em comprimento. As sementes são esterilizadas em uma solução alvejante (0,5%) por 15 minutos, o que após esse tempo, as sementes são enxaguadas com água destilada estéril. Os cotilédones imaturos são excisados, primeiro contando-se a porção da semente que contém o eixo do embrião. Os cotilédones são, então, removidos das cobertura da semente gentilmente empurrando a extremidade distal da semente com a extremidade rombuda da lâmina do bisturi. Os cotilédones são, então, colocados em placas de Petri (lado plano para cima) com meio de iniciação SB1 (sais MS, vitaminas B5, 20 mg/L 2,4-D, 31,5 g/L sacarose, 8 g/L TC Agar, pH 5,8). As placas de Petri são incubadas no claro (dia de 16 hrs; 75-80 μ E) a 26°C.

Após 4 semanas de incubação, os cotilédones são transferidos para meio SB1 fresco. Após duas semanas adicionais, embriões somáticos de estágio globular que exibem áreas proliferativas são excisado e transferidos para meio líquido FN Lite (Samoylov, et al. (1998) *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant* 34:8-13). Cerca de 10 a 12 pequenos agrupamentos de embriões somáticos são colocados em frascos de 250 ml contendo 35 ml de meios SB172. As culturas em suspensão embriogênicas de soja são mantidas em 35 mL de meio líquido em um misturados rotativo, 150 rpm, a 26°C com luzes fluorescentes (20 μ E) em um período de 16:8 horas dia/noite. As culturas são sub-cultivadas a cada duas semanas inoculando-se aproximadamente 35 mg de tecido em 35 mL de meio líquido.

As culturas em suspensão embriogênicas de soja são, então, transformadas usando bombardeamento de partículas por pistola (Klein et al. (1987) *Nature* 327:70; U.S. Patent No. 4.945.050). Um instrumento *BioRad Biolisticã* 5 *PDS1000/HE* pode ser usado para essas transformações. Um gene marcador de seleção, que é usado para facilitar transformação de soja, é um gene quimérico composto de promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-Flor (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812), o gene de higromicina 10 fosfotransferase de plasmídio pJR225 (de *E. coli*; Gritz et al. (1983) *Gene* 25:179-188) e a região 3' do gene de nopalina sintase de T-DNA do plasmídio Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

15 Para 50 µL de uma suspensão de partículas de ouro de 1 µm a 60 mg/mL, é adicionado (em ordem): 5 µL DNA (1 µg/µL), 20 µl espermidina (0,1 M), e 50 µL CaCl₂ (2,5 M). A preparação de partículas é agitada por três minutos, girada em uma centrífuga por 10 segundos e o sobrenadante 20 removido. As partículas cobertas por DNA são lavadas uma vez em 400 µL 70% etanol e ressuspendida em 40 µL de etanol anidro. A suspensão DNA/partículas é sonicadas três vezes por um segundo cada. Cinco µL das partículas de ouro cobertas por DNA são, então, carregadas em um disco 25 macrocarregador.

Aproximadamente 300-400 mg de uma cultura em suspensão de duas semanas de idade são posicionados em uma placa de petri vazia de 60x15 mm e o líquido residual removido do

tecido com uma pipeta. A pressão de ruptura de membrana é determinada a 1100 psi e a câmara é evacuada a um vácuo de 28 polegadas mercúrio. O tecido é posicionado a aproximadamente 8 cm da tela de retenção, e é bombardeado 5 três vezes. Após o bombardeamento, o tecido é dividido ao meio e colocado de volta em 35 ml de meio FN Lite.

De cinco a sete dias após o bombardeamento, o meio líquido é trocado por meio fresco. Onze dias após o 10 bombardeamento, o meio é trocado com meio fresco contendo 50 mg/mL higromicina. Esse meio seletivo é refrescado semanalmente. De sete a oito semanas após o bombardeamento, o tecido verde transformado será observado crescendo a partir de agrupamentos embriogênicos necróticos 15 não transformados. Tecido verde isolado é removido e inoculado em frascos individuais para gerar novas culturas em suspensão embriogênicas clonalmente propagadas. Cada nova linha é tratada como um evento de transformação independente. Essas suspensões são, então, subcultivadas e 20 mantidas como agrupamentos de embriões imaturos, ou o tecido é regenerado em plantas inteiras por amadurecimento e germinação de embriões individuais.

D. Isolamento de DNA de Tecidos de Calo e Folha

25

Eventos de transformação putativos podem ser rastreados para a presença do transgene. DNA genômico é extraído de calos ou folhas usando uma modificação do método de CTAB (brometo de cetiltriethylamônio, Sigma H5882)

descrito por Stacey and Isaac (1994 In Methods in Molecular Biology Vol. 28, pp. 9-15, Ed. P.G. Isaac, Humana Press, Totowa, NJ). Aproximadamente 100-200 mg de tecido congelado sujo com pólvora em nitrogênio líquido e
5 homogeneizado em 1 ml de tampão de extração CTAB (2% CTAB, 0,02 M EDTA, 0,1 M Tris-Cl pH 8, 1,4 M NaCl, 25 mM DTT) por 30 min a 65°C. As amostras homogeneizadas são deixadas resfriando a temperatura ambiente por 15 min antes de ser feita uma extração de proteína simples com aproximadamente
10 1 ml 24:1 v/v de clorofórmio:octanol. As amostras são centrifugadas por 7 min a 13.000 rpm e a camada superior de sobrenadante coletada usando pontas de pipetas de boca larga. DNA é precipitado a partir do sobrenadante por incubação em 95% etanol em gelo por 1 h. Filetes de DNA
15 são enroladas em um gancho de vidro, lavadas em 75% etanol contendo 0,2 M acetato de sódio por 10 min, secadas com ar por 5 min e ressuspensas em tampão TE. Cinco µl de RNase A é adicionado às amostras e incubado a 37° C por 1 h. Para quantificação do DNA genômico, eletroforese de gel é
20 efetuada usando um gel de agarose 0,8% em 1x tampão TBE. Um microlitro de cada das amostras é fracionado junto com 200, 400, 600 e 800 ng µl⁻¹ λ de marcadores de DNA não cortados.

25 **Exemplo 6. Comparando a eficiência relativa de recombinação de seqüências FRT dissimilares em células de milho.**

Dois testes são provido que medem as taxas relativas de ativação de transgenes como um resultado da excisão mediada por FLP, que traz um promotor e transgene em proximidade funcional. O método pode ser usado para caracterizar a eficiência de recombinação de tanto sítios de recombinação correspondentes e/ou dissimilares e, dessa forma, determinar se os sítios são recombinogênicos ou não recombinogênicos um ao outro.

10 Dois testes são discutidos abaixo: (A) pontuação de ativação de Proteína Amarela Fluorescente (YFP) em células individuais e (B) pontuação de atividade de luciferase.

15 A. Teste de Fluorescência

Três cassetes de expressão transgênicos (destacados na Tabela 4) são introduzidos tanto em um tratamento de FRT teste ou um tratamento controle.

20

Tabela 4

Construto FRT teste	Construto Controle
CPN60:FRTx:GUS:FRTx:YFP:termo 35s	CPN60:FRTx:YFP:termo 35s
Actina::CFP::nos	Actina::CFP::nos
Ubi::FLP::pinII	Ubi::FLP::pinII

YFP = proteína de fluorescência amarela ; CFP = proteína de fluorescência ciano; CPN60 = promotor de chaparonina 60 de milho (Close (1993) Master's Thesis, Iowa State University).

Em ambos tratamentos controle e FRT teste, os três cassetes de expressão relevantes (ou apropriados) são misturados em razões equimolares, e introduzidos em células escutelares de embriões Hi-II imaturos usando métodos de 5 distribuição de partículas padrão. Após dois dias, os números de células ciano e amarelo fluorescentes são contados usando um estereomicroscópio epifluorescente Leica. O número de células ciano fluorescentes é usado para normalizar entre os tratamentos provendo uma medida 10 relativa de quantas células receberam DNA suficiente para expressar os transgenes. Para validar esse sistema de teste, FRT1 é usado para o primeiro experimento. Como um tratamento controle, uma mistura dos seguintes três plasmídios é usada: Actina::Ciano FP::nos, 15 CPN60:FRT1:YFP:termo 35s, e Ubi::FLP::pinII. No tratamento controle, quando esses três plasmídios são co-introduzidos e os números de células ciano e amarelas são pontuados dois dias mais tarde, os números de células ciano e amarelas na população é esperado de ser aproximadamente equivalente 20 (1:1).

No tratamento FRT teste, quando FRT1 é usado no cassete ativado por excisão (CPN60:FRT1:GUS:FRT1:YFP:termo 35s), espera-se que aproximadamente 90-95% das células 25 expressando fluorescência ciano também expresse fluorescência amarela, i.e. a excisão da região flanqueada por FRT1 é relativamente eficiente. Baseado em estudo prévios com FRT5, quando FRT5 é usado no cassete de excisão, a frequência de células ciano fluorescentes que

também expressam a proteína fluorescente amarela é esperada por cair a aproximadamente 15% daquela observada no tratamento com FRT1.

5 O cassete ativado por excisão pode ser também usado para determinar se dois sítios de recombinação FRT dissimilares são recombinogênicos ou não recombinogênicos. Para determinar se FRT1 e FRT5 são recombinogênicos ou não recombinogênicos com respeito um ao outro, um cassete
10 ativado por excisão compreendendo CPN60:FRT1:GUS:FRT5:YFP:termo 35s é construído. Como destacado na Tabela 4, os três cassetes de expressão são misturado em razões equimolares, e introduzidos em células escutelares de embriões Hi-II imaturos usando métodos de
15 distribuição de partículas padrão. Após dois dias, os números de células fluorescentes ciano e amarelas são contados usando um estereomicroscópio epifluorescente Leica. O número de células fluorescentes ciano é usado para normalizar entre os tratamentos, provendo uma medida
20 relativa de quantas células receberam DNA suficiente para expressar os transgenes.

Quando o cassete de excisão compreende um sítio de recombinação FRT1 e um sítio de recombinação FRT5, a
25 frequência de células ciano fluorescentes que também expressam a proteína fluorescente amarela é esperada por cair a aproximadamente menos do que 1% daquela observada quando um cassete de excisão compreendendo dois sítios de

recombinação FRT1 é empregado. Os sítios são, portanto, determinados por serem não recombinogênicos.

B. Teste baseado na ativação de atividade enzimática
5 de luciferase

O segundo sistema de teste usa, novamente, uma mistura de plasmídios em quantidades equimolares, co-bombardeadas em células escutelares de embriões Hi-II imaturos. Para
10 esse teste, três plasmídios são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5

Tratamento FRT Teste	Controle
Actina::FRTx:GUS:FRTx:FF-luciferase::nos *	Actina::FRTx:FF-luciferase::nos *
Nos::luciferase de <i>Renilla</i> ::termo 35S	Nos:: luciferase de <i>Renilla</i> :: termo 35S
Ubi::FLP::pinII	Ubi::FLP::pinII

* FF = luciferase de vaga-lume; luciferase de *Renilla*
15 (Minko et al. (1999) *Mol. Gen. Genet.* 262:421-425)

Novamente, FRT1 é usado para validar o sistema de teste. No tratamento controle, Actina:FRT1:FF-luciferase::nos, Nos::luciferase de *Renilla*::termo 35S, e
20 Ubi::FLP::pinII, são introduzidos em células escutelares e após 2 dias, o tecido é extraído usando métodos e soluções providos no Kit *Promega Dual-luciferase Assay Kit* (Promega, Madison, WI 53711). Múltiplos escutelos são

individualmente extraídos, e os extratos seqüencialmente testados para atividade de luciferase de vaga-lume e, então, de *Renilla* usando um Fluoroscan. Com essa mistura de construtos, é esperado que a proteína luciferase de vaga-lume expressada produza aproximadamente 5000 unidades de luz relativas e a luciferase de *Renilla* produza cerca de 15.000. Quando FRT1 é usado no cassete ativado por excisão (Actina:FRT1:GUS:FRT1:luci de vaga-lume:termo 35s), a luciferase de vaga-lume é esperada por produzir cerca de 4500 unidades de luz (cerca de 90% do tratamento controle). Quando FRT 5 é usado no cassete de excisão, a atividade de luciferase de vaga-lume é esperada por cair a aproximadamente 670 unidades de luz (~15% de FRT1).

Exemplo 7. Direcionando a inserção de um polinucleotídeo de interesse em milho

A. Estabelecendo uma Linha Alvo

Para avaliação de seqüências FRT para integração sítio específica, um sítio alvo é primeiro criado integrando-se estavelmente um polinucleotídeo compreendendo um sítio alvo tendo dois sítios de recombinação FRT funcionais, onde os sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro. Essa transformação inicial é conseguida em germoplasma Hi-II (ou linhas intercruzadas) usando métodos padrão de transformação por *Agrobacterium* para milho (ver Exemplo 5B). Por exemplo, para comparar a eficiência relativa de

FRT5 e FRT87 no sistema de integração sítio específico, os seguintes construtos são introduzidos separadamente em germoplasma Hi-II:

5 PHP20807:

RB- Ubi:Ubi-íntron:FRT1:Proteína Fluorescente

Amarela::pinII/Ubi:Ubi-íntron:

GAT::pinII/termo In2-1:GUS:FRT5:Os-Actina-íntron:Os-Actina

Pro -LB

10

PHP20705:

RB- Ubi:Ubi-íntron:FRT1:Proteína Fluorescente

Amarela::pinII/Ubi:Ubi-íntron:

GAT::pinII/termo In2-1:GUS:FRT87:Os-Actina-íntron:Os-Actina

15 Pro -LB

Transformantes estáveis são selecionados procurando-se calos amarelos fluorescentes crescendo em meio contendo glifosato. Plantas são regeneradas e enviadas par a
 20 estufa. Amostras foliares são tomadas para análise *Southern*. Cópias únicas de plantas transgênicas são cultivadas até a maturidade e cruzadas para Hi-II de tipo selvagem (ou linhas intercruzadas). Esses eventos transgênicos agora contêm o sítio alvo FRT1-5 ou FRT1-87, e
 25 estão prontos para recombinação sítio específica mediada por recombinase.

B. Introdução do cassete de transferência usando bombardeamento de partículas.

5 Embriões imaturos da linha tendo os sítios alvo como evidenciado por expressão de fluorescência amarela são usados para a re-transformação subsequente. Durante o processo de re-transformação, cassetes de transferência são introduzidos usando métodos padrão de bombardeamento de
10 partículas (e.g., ver Exemplo 5A). Para plantas descendentes que contêm o T-DNA integrado de PHP20705 (o sítio alvo FRT1-FRT87), a seguinte inserção compreendendo o cassete de transferência é usada para re-transformação usando pistola de partículas:

15

PHP20915:

RB-Termo CaMV35S /FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-íntron:luciferase
de Renilla::pinII/ termo In2-1:Am-Cyan1:FRT87/Termo
CaMV35S-LB.

20

Embriões imaturos descendentes que contêm o T-DNA integrado de PHP20807 (o sítio alvo FRT1-FRT5) são re-transformadas usando a pistola de partículas com o seguinte plasmídeo:

25

PHP20954:

RB- Termo CaMV35S /FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-
íntron:luciferase de Renilla::pinII/ termo In2-1:Am-
Cyan1:FRT5/ Termo CaMV35S-LB.

Para ambos plasmídios compreendendo o cassette de transferência (PHP20915 e PHP20954), os genes bar e Cyan FP não possuem promotor. Para reduzir a probabilidade de que a
5 integração randômica resulte em expressão espúria de qualquer gene, o terminador CaMV35S foi colocado acima do sítio FRT1. Cada desses plasmídios é co-transformado em embriões imaturos a partir de suas respectivas linhas alvo junto com o plasmídio PHP5096 (Ubi:Ubi-
10 íntron::FLPm::pinII). Tanto PHP20915 ou PHP20954 são misturado com o plasmídio contendo FLP (PHP5096), usando 100 ng do plasmídios contendo FRT e 10 ng do plasmídio FLP por bombardeamento.

15 Para preparar o DNA para distribuição, soluções de DNA são adicionadas a 50 μ l de uma solução de estoque de partículas de ouro (0,1 μ g/ μ l de partículas de ouro de 0,6 μ m). Por exemplo, 10 μ l de uma solução de PHP20915 ou PHP20954 a 0,1 μ g/ μ l, e 10 μ l de uma solução de PHP5096 a
20 0,1 μ g/ μ l são adicionados primeiro a 30 μ l de água. Para essa mistura de DNA, 50 μ l da solução de estoque de ouro é adicionado e a mistura é brevemente sonicada. Em seguida, 5 μ l de TFX-50 (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711) é adicionado e a mistura é colocada em um
25 agitador de rotação a 100 rpm por 10 minutos. A mistura é brevemente centrifugada para empelotar as partículas de ouro e remover o sobrenadante. Após a remoção do excesso de solução de DNA/TFX, 120 μ l de EtOH absoluto é adicionado, e 10 μ l alíquotas são dispendidas nos

macrocarregadores tipicamente usados com a pistola de partículas de hélio Dupont PDS-1000 Helium Particle Gun. As partículas de ouro com DNA aderido são deixadas secando nos carregadores e, então, essas são usadas para 5 bombardeamento de partículas padrão. Após a distribuição de re-transformação do plasmídeo tendo o cassete de transferência mais o plasmídeo contendo FLP, os embriões imaturos são colocados em meio 560P por duas semanas para recuperar, e, então, movidos para meio contendo 3 mg/l 10 bialaphos para seleção. A recombinação bem-sucedida em ambos recombinação sítios alvo 5' (FRT1) e 3' (FRT87 ou 5) resultará na ativação de ambos gene bar e o gene de Proteína Fluorescente Ciano, quando esses genes estruturais são trazidos em proximidade funcional com os promotores de 15 Ubi ou Actina, respectivamente. Assim, os eventos corretos de integração sítio-específica serão selecionados baseado nos fenótipos recém ativados. Quando esses calos estão grandes o suficiente para amostragem, DNA genômico é extraído do tecido, e é analisado usando PCR para a 20 presença de produtos que resultam de amplificação de fragmentos usando primers que atravessam as junções promotor-gene recém formadas. Finalmente, amostras foliares são tiradas a partir de plantas regeneradas para análise Southern, para verificar a recombinação correta 25 para transferência do cassete doador no locus genômico alvo. Uma vez que loci recombinantes bem-sucedidos foram verificados, plantas são cultivadas até a maturidade e cruzadas ou autocruzadas.

C. Introdução do cassete de transferência por cruzamento

Cassetes de transferência podem ser providos por cruzamento sexuado. Nesse exemplo, eventos transgênicos estáveis de cópia única de alvo são novamente usados contendo uma única cópia dos cassetes de T-DNA originalmente distribuídos de *Agrobacterium* contendo PHP20705 ou PHP20807. Contudo, nesse método, eventos doadores transgênicos estáveis são produzidos usando qualquer dos dois vetores de T-DNA de *Agrobacterium* apresentados abaixo.

1. O vetor doador que complementa PHP20705:

15

RB-Axig1::LEC1::pinII/Ubi Pro: Ubi-íntron::YFP::pinII/-LB e
 RB- In2::FLP::pinII- Termo CaMV35S
 /FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-íntron: luciferase de
 Renilla::pinII/ termo In2-1:Am-Cyan1:FRT87/ Termo CaMV35S -
 20 LB

2. O vetor doador que complementa PHP20807:

RB-Axig1::LEC1::pinII/Ubi Pro: Ubi-íntron::YFP::pinII/-LB e
 25 RB-In2::FLP::pinII- Termo CaMV35S /FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-
 íntron: luciferase de Renilla::pinII/ termo In2-1:Am-
 Cyan1:FRT5/ Termo CaMV35S-LB

Para ambos plasmídios acima, os cassetes de expressão
 30 no primeiro T-DNA provêm meios de selecionar as linhas

transgênicas doadoras após transformação mediada por *Agrobacterium*. O segundo T-DNA provê os componentes para troca de cassete mediada por cruzamento. Note que para ambos construtos, o cassete de expressão induzido por FLP está for a dos sítios FRT e, assim, não é transferido para o sítio alvo com troca bem-sucedida.

Os eventos de recombinação tendo o cassete de transferência são selecionados por seleção visual para crescimento vigoroso, calos amarelos fluorescentes, regenerados, cultivados até a maturidade e cruzados para produzir sementes doadoras tendo o cassete de transferência. Sementes de um evento alvo contendo o fragmento de T-DNA de PHP20705, assim como sementes de um evento doador contendo o T-DNA de plasmídeo doador #1 acima são plantadas e cultivadas até a maturidade. Com a florada, cruzamentos recíprocos são feitos entre as plantas alvo e doadoras. As sementes resultantes são plantadas e rastreadas para fenótipos recém ativados que indicam recombinação bem-sucedida nos dois sítios FRT dissimilares, nesse caso ativação de resistência a bialaphos indicativa de recombinação correta em FRT5 e ativação de fluorescência ciano indicativa de recombinação correta em FRT87. Cruzamentos similares são feitos usando linhas alvo e de transferência geradas com PHP20807 e Plasmídeo Doador #2, respectivamente.

Exemplo 8. Transformação de Células Bacterianas

Os novos sítios de recombinação aqui providos pode ser, também, avaliados e usados em células bacterianas, tais como *E. coli*. Várias linhas de células competentes comercialmente disponíveis e plasmídios bacterianos são bem conhecidas e prontamente disponíveis. Polinucleotídeos isolados para transformação e transformação de células bacterianas podem ser feitos por qualquer método conhecido na arte. Por exemplo, métodos de *E. coli* e outra célula bacteriana de transformação, preparação de plasmídio, e o uso de fagos são detalhados, por exemplo, em *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. (eds.) (1994) a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.). Por exemplo, um protocolo de eletroporação eficiente (Tung & Chow, *Current Protocols in Molecular Biology*, Supplement 32, Fall 1995) é sumarizado abaixo.

Inocular 100ml de meio LB com 1 ml de cultura de *E. coli* de um dia para o outro. Incubar a 37°C com agitação vigoroso até que a cultura alcance OD600 = 0,6. Chill cultura em gelo 30 min, células de pelotas por centrifugação 4.000 x g por 15 min a 4°C. Lavar as células de pelotas duas vezes com 50 ml de 10% glicerol frio como gelo. Após a lavagem final, ressuspender a pelota de células a um volume final de 0,2 ml em meio GYT frio como gelo (10% v/v glicerol; 0,125% w/v extrato de leveduras; 0,25% w/v tritona). Eletroporar em cuvetes pré-resfriado usando as condições do fabricante, por exemplo 0,5 ng de DNA de plasmídio/transformação usando *Gene Pulser* (BioRad)

ajustado a 25 μ F, 200 ohms, 2,5 kV. Imediatamente após a eletroporação, adicionar 1 ml de meio SOC e transferir as células para um tubo de cultura. Incubar a 37°C por 1 hr. Colocar as alíquotas em placas de células em placas de ágar seletivo e incubar de um dia para o outro a 37°C.

Exemplo 9. Transformação de Leveduras

Os novos sítios de recombinação aqui providos podem ser avaliados e usados em células de leveduras, das quais a FLP recombinase e sítios FRT foram inicialmente isoladas. Várias linhagens disponíveis comercialmente e/ou publicamente de *S. cerevisiae* estão disponíveis, assim como estão os plasmídios usados para transformar essas células. Por exemplo, linhagens são disponibilizadas a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e inclui o inventário do Yeast Genetic Stock Center, que foi para a ATCC em 1998. Outras linhas de leveduras, tais como *S. pombe* e *P. pastoris*, e similares estão também disponíveis. Por exemplo, métodos de transformação de leveduras, preparação de plasmídios, e similares são detalhados, por exemplo, em *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. (eds.) (1994) a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., ver Unit 13 em particular). Métodos de transformação para leveduras incluem transformação por esferoplasto, eletroporação, e métodos de acetato de lítio. Um método de transformação versátil de alta eficiência para leveduras é descrito por Gietz & Woods ((2002) *Methods*

Enzymol. 350:87-96) usando acetato de lítio, PEG 3500 e DNA carregador.

Exemplo 10. Transformação de células de mamíferos

5

Os novos sítios de recombinação aqui providos podem ser avaliados e usados em células de mamíferos, tais como CHO, HeLa, BALB/c, fibroblastos, células troncos de camundongos embriônicos e similares. Várias linhas de

10 células competentes comercialmente disponíveis e plasmídios são bem conhecidas e prontamente disponíveis, por exemplo da ATCC (Manassas, VA). Polinucleotídeos isolados para transformação e transformação de células de mamíferos pode ser feita por qualquer método conhecido na arte. Por

15 exemplo, métodos de transformação de células de mamíferos e outras células eucariontes, preparação de plasmídios, e o uso de vírus estão detalhados, por exemplo, em *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. (eds.) (1994) a joint venture between Greene Publishing

20 Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., ver Unit 9 em particular). Por exemplo, vários métodos estão disponíveis, tais como transfecção por fosfato de cálcio, eletroporação, transfecção por DEAE-dextran, transfecção mediada por lipossomo, microinjeção, assim como técnicas

25 virais.

Exemplo 11. Métodos para clonagem de recombinação *in vitro*

5 Nos exemplos A, B, e C abaixo, as duas moléculas de ácido nucléico parentais (e.g., plasmídios) são chamadas de "inserção doadora" "vetor doador." A inserção doadora contém um segmento que se tornará unido a uma nova seqüência contribuída pelo vetor doador. O evento de

10 recombinação produz duas moléculas filhas: o primeiro referido como o produto (o novo clone desejado) e o segundo referido como o subproduto.

Nos exemplos abaixo, dois pares de plasmídios são

15 construídos para realizar o método de clonagem de recombinação *in vitro* em duas vias diferentes. Um par de plasmídios, Plasmídio A e plasmídio B, são construídos com um sítio FRT e um sítio lox, a ser usado com Cre e FLP recombinase. O outro par de plasmídios, Plasmídio D e

20 Plasmídio E, são construídos para conter o sítio FRT (tipo selvagem) para FLP, e um segundo sítio FRT mutante (SEQ ID NO:40), que difere do sítio FRT de tipo selvagem em 3 de 30 bases no total. Nesse exemplo, cada plasmídio compreende um grupo de sítios de recombinação funcionais

25 caracterizados pelo fato de que os sítios de recombinação são dissimilares e não recombinogênicos com respeito um ao outro.

Tampões:

Vários tampões conhecidos podem ser usados nas reações. Para enzimas de restrição, é recomendável usar os tampões recomendados pelo fabricante. Tampões alternativos podem ser prontamente encontrados na literatura ou podem ser arquitetados por aqueles de conhecimento ordinário na arte. Um tampão exemplar para lambda integrase compreende 50 mM Tris-HCl, a pH 7,5-7,8, 70 mM KCl, 5 mM espermidina, 0,5 mM EDTA, e 0,25 mg/ml albumina de soro bovino, e opcionalmente, 10% glicerol. Um tampão exemplar para Pl Cre recombinase compreende 50 mM Tris-HCl a pH 7,5, 33 mM NaCl, 5 mM espermidina, e 0,5 mg/ml albumina de soro bovino e um tampão exemplar para FLP é discutido acima no Exemplo 2. Um tampão exemplar para Cre e FLP recombinases compreende 50 mM Tris-HCl a pH 7,5, 70 mM NaCl, 2mM MgCl₂, e 0,1 mg/ml BSA, (Buchholz et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:4256-4262). O tampão para outras recombinases sítio específicas é tanto conhecido na arte ou pode ser determinado empiricamente pelos especialistas, particularmente à luz dos tampões acima descritos.

A. Clonagem de Recombinação Usando FLP recombinase

Dois plasmídios são construídos. O plasmídio doador (plasmídio A) compreende na seguinte ordem: um sítio FRT de tipo selvagem, uma marcador constitutivo tipo droga (resistência a cloramfenicol), uma origem de replicação, um gene constitutivamente expressado para a proteína tet repressora (tetR), um sítio FRT 5, e um marcador.

condicional tipo droga (resistência a canamicina, cuja expressão é controlada pelo operador/promotor do operon de resistência a tetraciclina de *transposon* Tn10). Células de *E. coli* contendo plasmídeo A são resistentes a cloramfenicol a 30 µg/ml, mas sensíveis a canamicina a 100 µg/ml.

O plasmídeo doador de inserção (plasmídeo B) compreende na seguinte ordem: o sítio FRT de tipo selvagem, um marcador diferente tipo droga (resistência a ampicilina), o sítio FRT 5, uma origem, e um sítio de clonagem múltipla.

Cerca de 75 ng de cada plasmídeo A e B são misturadas em um volume total de 30 µl de tampão de reação FLP. Duas alíquotas de 10 µl são transferidas para novos tubos. Um tubo recebe proteína FLP. Ambos tubos são incubados a 37° C por 30 minutos, então 70° C por 10 minutos. Alíquotas de cada reação são diluídas e transformadas em DH5α. Após a expressão, alíquotas são colocadas em placas em 30 µg/ml cloramfenicol; 100 µg/ml ampicilina mais 200 µg/ml metecilina; ou 100 µg/ml canamicina.

Colônias que são resistentes a cloramfenicol, resistentes a ampicilina, e sensíveis a canamicina passaram pela reação de recombinação e compreendem o vetor produto recém gerado (plasmídeo C). O plasmídeo C compreende na seguinte ordem: o sítio FRT de tipo selvagem, o marcador constitutivo tipo droga (resistência a cloramfenicol), a

origem de replicação, o gene constitutivamente expressado para a proteína tet repressora (tetR), o sítio FRT 5, e o marcador de resistência a ampicilina.

5 Para confirmar a estrutura do vetor produto (plasmídio C), colônias que são resistentes a cloramfenicol, resistentes a ampicilina, e sensíveis a canamicina são escolhidas e inoculadas em meio contendo 100 µg/ml canamicina. Minipreparados são realizados e os DNAs
10 minipreparados são cortados com as enzimas de restrição apropriadas e eletroforisados. O plasmídio C pode ser identificado baseado no tamanho previsto para o plasmídio produto e os fragmentos resultantes da digestão por enzima de restrição.

15

B. Clonagem de Recombinação Usando FLP recombinase e Cre Recombinase

Os plasmídios desse método são análogos àqueles acima,
20 exceto o Plasmídio D, o plasmídio vetor doador, contém um sítio loxP no lugar do sítio FRT de tipo, e o Plasmídio E, o plasmídio doador de inserção, contém o sítio loxP no lugar do sítio FRT de tipo selvagem.

25 Cerca de 500 ng de Plasmídio E e Plasmídio D são precipitados por etanol e ressuspensos em 40 µl de tampão Cre/FLP tampão de reação (descrito acima). As reações são incubadas a 37° C por 30 minutos e, então, a 70° C por 10 minutos. Tampão TE (90 µl; TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1

mM EDTA) é adicionado a cada reação, e 1 µl cada é transformado em *E. coli* DH5α. As misturas de transformação são colocadas em placas em 100 µg/ml ampicilina mais 200 µg/ml metecilina; 30 µg/ml cloramfenicol; ou 100 µg/ml
5 canamicina.

As colônias que são resistentes a cloramfenicol, resistentes a ampicilina, e sensíveis a canamicina passaram pela reação de recombinação e compreendem o vetor produto recém gerado (plasmídio F). O Plasmídio F compreende na
10 seguinte ordem: o sítio loxP de tipo selvagem, o marcador constitutivo tipo droga (resistência a cloramfenicol), a origem de replicação, o gene constitutivamente expressado para a proteína tet repressora (tetR), o sítio FRT 5, e o
15 marcador de resistência a ampicilina.

Para confirmar a estrutura do vetor produto (plasmídio F), as colônias que são resistentes a cloramfenicol, resistentes a ampicilina, e sensíveis a canamicina são
20 escolhidas e inoculadas em meio contendo 100 µg/ml canamicina. Minipreparados são realizados e DNAs minipreparados são cortados com as enzimas de restrição apropriadas e eletroforisados. O Plasmídio F pode ser
25 identificado baseado no tamanho previsto para o plasmídio produto e os fragmentos resultantes da digestão por enzima de restrição.

C. Clonagem de Recombinação In vitro para Subclonar o Gene de Cloramfenicol Acetil Transferase em um Vetor para Expressão em Células Eucariontes

5 Um plasmídio doador de inserção, Plasmídio G, é construído, compreendendo na seguinte ordem: um sítio FRT de tipo selvagem, um gene de cloramfenicol acetil de *E. coli* sem um promotor, o sítio FRT 5, uma origem de replicação, e um marcador constitutivo tipo droga
10 (resistência a ampicilina).

Um plasmídio vetor doador, Plasmídio H, é construído, e compreende na seguinte ordem: gene de resistência a canamicina, origem de replicação, o promotor de
15 citomegalovírus eucarionte, um sítio FRT de tipo selvagem, o gene constitutivamente expressado para a proteína tet repressora (tetR), um gene de resistência a cloramfenicol, e o sítio FRT 5. Aliquotas de um microlitro de cada plasmídio, tipicamente cerca de 50 ng de DNA minipreparado
20 cru, são combinadas em uma reação de 10 μ l contendo um tampão de reação FLP e FLP recombinase. Após a incubação a 30° C por 30 minutos e 75° C por 10 minutos, um microlitro é transformado em linhagem DH5 α de *E. coli* competente (Life Technologies, Inc.). Aliquotas de transformações são
25 espalhadas em placas de ágar contendo 200 μ g/ml canamicina e incubadas a 37° C de um dia para o outro. Um reação controle idêntica de outra forma contém o plasmídio vetor doador apenas.

Para confirmar a estrutura do vetor produto (plasmídio I), minipreparados são realizados e os DNAs minipreparados são cortados com as enzimas de restrição apropriadas e eletroforisados. O Plasmídio I pode ser identificado
5 baseado no tamanho previsto para plasmídio produto e os fragmentos resultantes da digestão por enzima de restrição para confirmar a cloramfenicol acetil transferase são clonados abaixo do promotor CMV.

10 Todas publicações e aplicações de patentes mencionadas na especificação são indicativas do nível daqueles especialistas na arte a qual a invenção pertence. Todas publicações e aplicações de patentes são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação e
15 aplicação de patentes individual fossem especificamente e individualmente indicadas a serem incorporadas por referência.

20 Apesar da invenção precedente ser descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para propósitos de claridade de entendimento, será óbvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas no escopo das reivindicações no apêndice.

25 Os artigos "um" e "uma" são aqui usados para referir-se a um ou mais de um (i.e., a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" significa um ou mais de um elemento.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 <110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.
 <120> Titulo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA
 CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSFORMADA,
 MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE DNA DE SÍTIO ESPECÍFICO,
 10 BIBLIOTECA ISOLADA, MÉTODO DE GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE MOLÉCULAS E
 MÉTODO PARA SELECIONAR SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO FRT MODIFICADO
 <130> Referência do documento: 1525-PCT
 <150> Documento de prioridade: US 60/700.225
 15 <151> Data de depósito: 18-07-2005
 <160> Quantidade de SEQ ID NOs.: 74
 <170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0
 20 <210> SEQ ID NO.: 1
 <211> Comprimento: Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 25 <220> Características:
 <223> Outras informações: Nova sequência de espaçamento FRT do sítio
 FRT 12
 30 <400> Sequência: 1
 tctatgta 8
 <210> SEQ ID NO.: 2
 <211> Comprimento: 8
 35 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 <220> Características:
 <223> Outras informações: Nova sequência de espaçamento FRT do sítio
 40 FRT 57
 <400> Sequência: 2
 ttttctaa 8
 45 <210> SEQ ID NO.: 3
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 50 <220> Características:
 <223> Outras informações: Nova sequência de espaçamento FRT do sítio
 FRT 85
 <400> Sequência: 3
 55 tttcttga 8
 <210> SEQ ID NO.: 4
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 60 <213> Organismo: Sequência artificial

<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 87

5 <400> Seqüência: 4
tttctgga 8

<210> SEQ ID NO.: 5
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 53
15 <400> Seqüência: 5
tgtaaaaa 8

<210> SEQ ID NO.: 6
20 <211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
25 <223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 62

<400> Seqüência: 6
30 tttaghta 8

<210> SEQ ID NO.: 7
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial
35

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 78

40 <400> Seqüência: 7
tgaaaaga 8

<210> SEQ ID NO.: 8
<211> Comprimento: 8
45 <212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
50 FRT 34

<400> Seqüência: 8
tgtaatga 8

55 <210> SEQ ID NO.: 9
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

60 <220> Características:

<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 70

5 <400> Seqüência: 9
tatacaaa 8

<210> SEQ ID NO.: 10
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 76

15 <400> Seqüência: 10
ttccataa 8

<210> SEQ ID NO.: 11
20 <211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
25 <223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 89

<400> Seqüência: 11
30 tctctaga 8

<210> SEQ ID NO.: 12
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

35 <220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 43

40 <400> Seqüência: 12
ttccgaga 8

<210> SEQ ID NO.: 13
<211> Comprimento: 8
45 <212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
50 FRT 45

<400> Seqüência: 13
tctcttga 8

55 <210> SEQ ID NO.: 14
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

60 <220> Características:

<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 55

5 <400> Seqüência: 14
tccacaga 8

<210> SEQ ID NO.: 15
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 65

15 <400> Seqüência: 15
tgattgga 8

<210> SEQ ID NO.: 16
20 <211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
25 <223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 69

<400> Seqüência: 16
30 ttttgtga 8

<210> SEQ ID NO.: 17
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

35 <220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
FRT 74

40 <400> Seqüência: 17
tgagagaa 8

<210> SEQ ID NO.: 18
<211> Comprimento: 8
45 <212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Nova seqüência de espaçamento FRT do sítio
50 FRT 86

<400> Seqüência: 18
tttctcga 8

55 <210> SEQ ID NO.: 19
<211> Comprimento: 11
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

60 <220> Características:

<223> Outras informações: Sítio de ligação FLP 5' (elemento de simetria) do sítio FRT do tipo selvagem

5 <400> Sequência: 19
agttcctata c 11

<210> SEQ ID NO.: 20
<211> Comprimento: 11
<212> Tipo: DNA
10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Sítio de ligação FLP 3' (elemento de simetria) do sítio FRT do tipo selvagem
15

<400> Sequência: 20
gaataggaac t 11

<210> SEQ ID NO.: 21
20 <211> Comprimento: 30
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
25 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 12 mínimo

<400> Sequência: 21
agttcctata ctctatgtag aataggaact 30

30 <210> SEQ ID NO.: 22
<211> Comprimento: 30
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

35 <220> Características:
<223> Outras informações: Novo sítio FRT 57 mínimo

<400> Sequência: 22
agttcctata cttttctaag aataggaact 30

40 <210> SEQ ID NO.: 23
<211> Comprimento: 30
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

45 <220> Características:
<223> Outras informações: Novo sítio FRT 85 mínimo

<400> Sequência: 23
50 agttcctata ctttcttgag aataggaact 30

<210> SEQ ID NO.: 24
<211> Comprimento: 30
<212> Tipo: DNA
55 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Novo sítio FRT 87 mínimo

60 <400> Sequência: 24
agttcctata ctttctggag aataggaact 30

<210> SEQ ID NO.: 25
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 5 <213> Organismo: Sequência artificial

 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 53 mínimo

 10 <400> Sequência: 25
 agttcctata ctgtaaaaag aataggaact 30

 <210> SEQ ID NO.: 26
 <211> Comprimento: 30
 15 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 62 mínimo
 20
 <400> Sequência: 26
 agttcctata ctttaggtag aataggaact 30

 <210> SEQ ID NO.: 27
 25 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

 <220> Características:
 30 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 78 mínimo

 <400> Sequência: 27
 agttcctata ctgaaaagag aataggaact 30

 35 <210> SEQ ID NO.: 28
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

 40 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 34 mínimo

 <400> Sequência: 28
 45 agttcctata ctgtaatgag aataggaact 30

 <210> SEQ ID NO.: 29
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 50
 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 70 mínimo

 <400> Sequência: 29
 55 agttcctata ctatacaaag aataggaact 30

 <210> SEQ ID NO.: 30
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 60 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 76 mínimo

5 <400> Sequência: 30 30
 agttcctata cttccataag aataggaact

<210> SEQ ID NO.: 31
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 89 mínimo

15 <400> Sequência: 31 30
 agttcctata ctctctagag aataggaact

<210> SEQ ID NO.: 32
 <211> Comprimento: 30
 20 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 43 mínimo

25 <400> Sequência: 32 30
 agttcctata cttccgagag aataggaact

<210> SEQ ID NO.: 33
 30 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 35 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 45 mínimo

<400> Sequência: 33 30
 agttcctata ctctcttgag aataggaact

40 <210> SEQ ID NO.: 34
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

45 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 55 mínimo

<400> Sequência: 34 30
 50 agttcctata ctccacagag aataggaact

<210> SEQ ID NO.: 35
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

55 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 65 mínimo

<400> Sequência: 35 30
 60 agttcctata ctgattggag aataggaact

<210> SEQ ID NO.: 36
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 5
 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 69 mínimo
 <400> Sequência: 36
 10 agttcctata cttttgtgag aataggaact 30
 <210> SEQ ID NO.: 37
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 15 <213> Organismo: Sequência artificial
 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 74 mínimo
 20 <400> Sequência: 37
 agttcctata ctgagagaag aataggaact 30
 <210> SEQ ID NO.: 38
 <211> Comprimento: 30
 25 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 <220> Características:
 <223> Outras informações: Novo sítio FRT 86 mínimo
 30 <400> Sequência: 38
 agttcctata ctttctcgag aataggaact 30
 <210> SEQ ID NO.: 39
 35 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 <220> Características:
 40 <223> Outras informações: Sítio FRT do tipo selvagem mínimo
 <400> Sequência: 39
 agttcctata ctttctagag aataggaact 30
 45 <210> SEQ ID NO.: 40
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 50 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sítio FRT5 mutante mínimo
 <400> Sequência: 40
 55 agttcctata ctcttttgag aataggaact 30
 <210> SEQ ID NO.: 41
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial
 60 <220> Características:

<223> Outras informações: Sítio FRT6 mutante mínimo

<400> Sequência: 41
 agttcctata ctttttgaag aataggaact 30

5

<210> SEQ ID NO.: 42
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

10

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sítio FRT7 mutante mínimo

<400> Sequência: 42
 agttcctata cttattgaag aataggaact 30

15

<210> SEQ ID NO.: 43
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

20

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio de recombinação FRT do tipo selvagem

25

<400> Sequência: 43
 tttctaga 8

<210> SEQ ID NO.: 44
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

30

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio de recombinação FRT5

35

<400> Sequência: 44
 cttttgaa 8

40

<210> SEQ ID NO.: 45
 <211> Comprimento: 1032
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Bacteriófago C1

45

<220> Características:
 <221> Nome/chave: Nome/chave: CDS
 <222> Localização: (1)...(1016)

50

<400> Sequência: 45
 atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc 48
 Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
 1 5 10 15

55

gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg 96
 Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
 20 25 30

60

gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt 144
 Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
 35 40 45

	tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt	192
	Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe	
	50 55 60	
5	ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg	240
	Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala	
	65 70 75 80	
10	cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac	288
	Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn	
	85 90 95	
15	atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct	336
	Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	
	100 105 110	
20	gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt	384
	Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	
	115 120 125	
25	gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag	432
	Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
	130 135 140	
30	gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat	480
	Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
	145 150 155 160	
35	ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa	528
	Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
	165 170 175	
40	att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga	576
	Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
	180 185 190	
45	atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt	624
	Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
	195 200 205	
50	gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg	672
	Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
	210 215 220	
55	att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt tgc	720
	Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	
	225 230 235 240	
60	cgc gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta	768
	Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	
	245 250 255	
65	tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att	816
	Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
	260 265 270	
70	tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga	864
	Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
	275 280 285	

```

cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt 912
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
      290                      295                      300

5  tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att 960
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
305                      310                      315                      320

10 gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg 1008
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
      325                      330                      335

cgc ctg ct ggaagatggc gattag 1032
Arg Leu

15
<210> SEQ ID NO.: 46
<211> Comprimento: 338
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Bacteriófago C1

20
<400> Sequência: 46
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
 1      5      10      15
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
25      20      25      30
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
      35      40      45
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
50      55      60
30 Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
65      70      75      80
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
      85      90      95
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
35      100     105     110
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
      115     120     125
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
40      130     135     140
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
145     150     155     160
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
      165     170     175
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
45      180     185     190
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
      195     200     205
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
50      210     215     220
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
225     230     235     240
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
      245     250     255
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
55      260     265     270
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
      275     280     285
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
      290     295     300
60 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
305                      310                      315                      320

```

Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
 325 330 335

Arg Leu

5

<210> SEQ ID NO.: 47

<211> Comprimento: 1032

<212> Tipo: DNA

10 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:

15 <223> Outras informações: Sequência de nucleotídeo codificando proteína Cre a partir de Bacteriófago P1 tendo códons preferencialmente de milho (moCRE)

<221> Nome/chave: CDS

<222> Localização: (1)...(1032)

20 <400> Sequência: 47

atg tcc aac ctg ctc acg gtt cac cag aac ctt ccg gct ctt cca gtg 48
 Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
 1 5 10 15

25 gac gcg acg tcc gat gaa gtc agg aag aac ctc atg gac atg ttc cgc 96
 Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
 20 25 30

30 gac agg caa gcg ttc agc gag cac acc tgg aag atg ctg ctc tcc gtc 144
 Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
 35 40 45

35 tgc cgc tcc tgg gct gca tgg tgc aag ctg aac aac agg aag tgg ttc 192
 Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
 50 55 60

ccc gct gag ccc gag gac gtg agg gat tac ctt ctg tac ctg caa gct 240
 Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
 65 70 75 80

40 cgc ggg ctg gca gtg aag acc atc cag caa cac ctt gga caa ctg aac 288
 Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
 85 90 95

45 atg ctt cac agg cgc tcc ggc ctc ccg cgc ccc agc gac tcg aac gcc 336
 Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
 100 105 110

50 gtg agc ctc gtc atg cgc cgc atc agg aag gaa aac gtc gat gcc gcc 384
 Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
 115 120 125

55 gaa agg gca aag cag gcc ctc gcg ttc gag agg acc gat ttc gac cag 432
 Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
 130 135 140

gtc cgc agc ctg atg gag aac agc gac agg tgc cag gac att agg aac 480
 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
 145 150 155 160

60 ctg gcg ttc ctc gga att gca tac aac acg ctc ctc agg atc gcg gaa 528

Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
 165 170 175

5 att gcc cgc att cgc gtg aag gac att agc cgc acc gac ggc ggc agg 576
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
 180 185 190

10 atg ctt atc cac att ggc agg acc aag acg ctc gtt tcc acc gca ggc 624
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
 195 200 205

15 gtc gaa aag gcc ctc agc ctc gga gtg acc aag ctc gtc gaa cgc tgg 672
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
 210 215 220

20 atc tcc gtg tcc ggc gtc gcg gac gac cca aac aac tac ctc ttc tgc 720
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
 225 230 235 240

25 cgc gtc cgc aag aac ggg gtg gct gcc cct agc gcc acc agc caa ctc 768
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
 245 250 255

30 agc acg agg gcc ttg gaa ggt att ttc gag gcc acc cac cgc ctg atc 816
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
 260 265 270

35 tac ggc gcg aag gat gac agc ggt caa cgc tac ctc gca tgg tcc ggg 864
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
 275 280 285

40 cac tcc gcc cgc gtt gga gct gct agg gac atg gcc cgc gcc ggt gtt 912
 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
 290 295 300

45 tcc atc ccc gaa atc atg cag gcg ggt gga tgg acg aac gtg aac att 960
 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
 305 310 315 320

50 gtc atg aac tac att cgc aac ctt gac agc gag acg ggc gca atg gtt 1008
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
 325 330 335

55 cgc ctc ctg gaa gat ggt gac tga 1032
 Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp *
 340

<210> SEQ ID NO.: 48
 <211> Comprimento: 1260
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Saccharomyces cerevisiae

<220> Características:
 <221> Nome/chave: CDS
 <222> Localização: (1)...(1260)

<400> Sequência: 48
 atg cca caa ttt ggt ata tta tgt aaa aca cca cct aag gtg ctt gtt 48
 Met Pro Gln Phe Gly Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
 1 5 10 15

	cgt cag ttt gtg gaa agg ttt gaa aga cct tca ggt gag aaa ata gca	96
	Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala	
	20 25 30	
5	tta tgt gct gct gaa cta acc tat tta tgt tgg atg att aca cat aac	144
	Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn	
	35 40 45	
10	gga aca gca atc aag aga gcc aca ttc atg agc tat aat act atc ata	192
	Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile	
	50 55 60	
15	agc aat tcg ctg agt ttc gat att gtc aat aaa tca ctc cag ttt aaa	240
	Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys	
	65 70 75 80	
20	tac aag acg caa aaa gca aca att ctg gaa gcc tca tta aag aaa ttg	288
	Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu	
	85 90 95	
25	att cct gct tgg gaa ttt aca att att cct tac tat gga caa aaa cat	336
	Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His	
	100 105 110	
30	caa tct gat atc act gat att gta agt agt ttg caa tta cag ttc gaa	384
	Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu	
	115 120 125	
35	tca tcg gaa gaa gca gat aag gga aat agc cac agt aaa aaa atg ctt	432
	Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu	
	130 135 140	
40	aaa gca ctt cta agt gag ggt gaa agc atc tgg gag atc act gag aaa	480
	Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile Trp Glu Ile Thr Glu Lys	
	145 150 155 160	
45	ata cta aat tcg ttt gag tat act tcg aga ttt aca aaa aca aaa act	528
	Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr	
	165 170 175	
50	tta tac caa ttc ctc ttc cta gct act ttc atc aat tgt gga aga ttc	576
	Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe	
	180 185 190	
55	agc gat att aag aac gtt gat ccg aaa tca ttt aaa tta gtc caa aat	624
	Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn	
	195 200 205	
60	aag tat ctg gga gta ata atc cag tgt tta gtg aca gag aca aag aca	672
	Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr	
	210 215 220	
65	agc gtt agt agg cac ata tac ttc ttt agc gca agg ggt agg atc gat	720
	Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg Ile Asp	
	225 230 235 240	
70	cca ctt gta tat ttg gat gaa ttt ttg agg aat tct gaa cca gtc cta	768
	Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser Glu Pro Val Leu	
	245 250 255	
75	aaa cga gta aat agg acc ggc aat tct tca agc aat aaa cag gaa tac	816

	Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr	
				260					265					270			
5	caa	tta	tta	aaa	gat	aac	tta	gtc	aga	tcg	tac	aat	aaa	gct	ttg	aag	864
	Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys	
			275				280						285				
10	aaa	aat	gcg	cct	tat	tca	atc	ttt	gct	ata	aaa	aat	ggc	cca	aaa	tct	912
	Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ser	Ile	Phe	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser	
		290					295					300					
15	cac	att	gga	aga	cat	ttg	atg	acc	tca	ttt	ctt	tca	atg	aag	ggc	cta	960
	His	Ile	Gly	Arg	His	Leu	Met	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	
	305					310					315					320	
20	acg	gag	ttg	act	aat	gtt	gtg	gga	aat	tgg	agc	gat	aag	cgt	gct	tct	1008
	Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	
				325						330					335		
25	gcc	gtg	gcc	agg	aca	acg	tat	act	cat	cag	ata	aca	gca	ata	cct	gat	1056
	Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp	
				340					345					350			
30	cac	tac	ttc	gca	cta	gtt	tct	cgg	tac	tat	gca	tat	gat	cca	ata	tca	1104
	His	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser	
			355					360					365				
35	aag	gaa	atg	ata	gca	ttg	aag	gat	gag	act	aat	cca	att	gag	gag	tgg	1152
	Lys	Glu	Met	Ile	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Thr	Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp	
		370					375					380					
40	cag	cat	ata	gaa	cag	cta	aag	ggt	agt	gct	gaa	gga	agc	ata	cga	tac	1200
	Gln	His	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr	
	385					390					395					400	
45	ccc	gca	tgg	aat	ggg	ata	ata	tca	cag	gag	gta	cta	gac	tac	ctt	tca	1248
	Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ser	
				405						410					415		
50	tcc	tac	ata	aat													1260
	Ser	Tyr	Ile	Asn													
				420													
55	<210>	SEQ	ID	NO.:	49												
60	<211>	Comprimento:	420														
	<212>	Tipo:	PRT														
	<213>	Organismo:	Saccharomyces	cerevisiae													
65	<400>	Seqüência:	49														
70	Met	Pro	Gln	Phe	Gly	Ile	Leu	Cys	Lys	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Val	
	1				5					10					15		
	Arg	Gln	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala	
				20					25					30			
75	Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Ile	Thr	His	Asn	
			35					40					45				
80	Gly	Thr	Ala	Ile	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Met	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	
			50				55					60					
85	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys	
	65					70					75					80	
90	Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	
				85						90					95		

Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His
 100 105 110
 Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu
 115 120 125
 5 Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu
 130 135 140
 Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile Trp Glu Ile Thr Glu Lys
 145 150 155 160
 10 Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr
 165 170 175
 Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn
 195 200 205
 15 Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr
 210 215 220
 Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg Ile Asp
 225 230 235 240
 20 Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser Glu Pro Val Leu
 245 250 255
 Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser Ser Asn Lys Gln Glu Tyr
 260 265 270
 Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys
 275 280 285
 25 Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser
 290 295 300
 His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 30 Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser
 325 330 335
 Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln Ile Thr Ala Ile Pro Asp
 340 345 350
 His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr Asp Pro Ile Ser
 355 360 365
 35 Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr Asn Pro Ile Glu Glu Trp
 370 375 380
 Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr
 385 390 395 400
 40 Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser
 405 410 415
 Ser Tyr Ile Asn
 420

45 <210> SEQ ID NO.: 50
 <211> Comprimento: 1260
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

50 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de nucleotídeo tendo códons preferencialmente de milho codificando FLP recombinase (FLPm)

<221> Nome/chave: CDS
 <222> Localização: (1)...(1260)

55 <400> Sequência: 50
 atg ccc cag ttc gac atc ctc tgc aag acc ccc ccc aag gtg ctc gtg 48
 Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
 1 5 10 15
 60 agg cag ttc gtg gag agg ttc gag agg ccc tcc ggc gag aag atc gcc 96

	Arg	Gln	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala	
				20					25					30			
5	ctc	tgc	gcc	gcc	gag	ctc	acc	tac	ctc	tgc	tgg	atg	atc	acc	cac	aac	144
	Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Ile	Thr	His	Asn	
			35					40					45				
10	ggc	acc	gcc	att	aag	agg	gcc	acc	ttc	atg	tca	tac	aac	acc	atc	atc	192
	Gly	Thr	Ala	Ile	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Met	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	
		50					55					60					
15	tcc	aac	tcc	ctc	tcc	ttc	gac	atc	gtg	aac	aag	tcc	ctc	cag	ttc	aaa	240
	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys	
	65					70					75					80	
20	tac	aag	acc	cag	aag	gcc	acc	atc	ctc	gag	gcc	tcc	ctc	aag	aag	ctc	288
	Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	
					85				90						95		
25	atc	ccc	gcc	tgg	gag	ttc	acc	atc	atc	ccc	tac	tac	ggc	cag	aag	cac	336
	Ile	Pro	Ala	Trp	Glu	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gln	Lys	His	
				100					105					110			
30	cag	tcc	gac	atc	acc	gac	atc	gtg	tca	tcc	ctc	cag	ctt	cag	ttc	gag	384
	Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Phe	Glu	
			115					120					125				
35	tcc	tcc	gag	gag	gct	gac	aag	ggc	aac	tcc	cac	tcc	aag	aag	atg	ctg	432
	Ser	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser	His	Ser	Lys	Lys	Met	Leu	
			130				135						140				
40	aag	gcc	ctc	ctc	tcc	gag	ggc	gag	tcc	atc	tgg	gag	atc	acc	gag	aag	480
	Lys	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	
	145					150					155					160	
45	atc	ctc	aac	tcc	ttc	gag	tac	acc	tcc	agg	ttc	act	aag	acc	aag	acc	528
	Ile	Leu	Asn	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	
					165				170						175		
50	ctc	tac	cag	ttc	ctc	ttc	ctc	gcc	acc	ttc	atc	aac	tgc	ggc	agg	ttc	576
	Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe	
				180				185						190			
55	tca	gac	atc	aag	aac	gtg	gac	ccc	aag	tcc	ttc	aag	ctc	gtg	cag	aac	624
	Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn	
			195					200					205				
60	aag	tac	ctc	ggc	gtg	atc	atc	cag	tgc	ctc	gtg	acc	gag	acc	aag	acc	672
	Lys	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	
		210					215					220					
65	tcc	gtg	tcc	agg	cac	atc	tac	ttc	ttc	tcc	gct	cgc	ggc	agg	atc	gac	720
	Ser	Val	Ser	Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp	
	225					230					235				240		
70	ccc	ctc	gtg	tac	ctc	gac	gag	ttc	ctc	agg	aac	tca	gag	ccc	gtg	ctc	768
	Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	
					245				250						255		
75	aag	agg	gtg	aac	agg	acc	ggc	aac	tcc	tcc	tcc	aac	aag	cag	gag	tac	816
	Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr	

	260	265	270	
5	cag ctc ctc aag gac aac ctc	gtg agg tcc tac aac aag gcc ctc aag		864
	Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu	Val Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys		
	275	280	285	
10	aag aac gcc ccc tac tcc atc ttc gcc atc aag aac ggc ccc aag tcc		912	
	Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser			
	290	295	300	
15	cac atc ggt agg cac ctc atg acc tcc ttc ctc tca atg aag ggc ctc		960	
	His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu			
	305	310	315	320
20	acc gag ctc acc aac gtg gtg ggc aac tgg tcc gac aag agg gcc tcc		1008	
	Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser			
	325	330	335	
25	gcc gtg gcc agg acc acc tac acc cac cag atc acc gcc atc ccc gac		1056	
	Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln Ile Thr Ala Ile Pro Asp			
	340	345	350	
30	cac tac ttc gcc ctc gtg tca agg tac tac gcc tac gac ccc atc tcc		1104	
	His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr Asp Pro Ile Ser			
	355	360	365	
35	aag gag atg atc gcc ctc aag gac gag act aac ccc atc gag gag tgg		1152	
	Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr Asn Pro Ile Glu Glu Trp			
	370	375	380	
40	cag cac atc gag cag ctc aag ggc tcc gcc gag ggc tcc atc agg tac		1200	
	Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr			
	385	390	395	400
45	ccc gcc tgg aac ggc atc atc tcc cag gag gtg ctc gac tac ctc tcc		1248	
	Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser			
	405	410	415	
50	tcc tac atc aac		1260	
	Ser Tyr Ile Asn			
	420			

<210> SEQ ID NO.: 51
 <211> Comprimento: 78
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Iniciador de oligonucleotídeo

<221> Nome/chave: misc_feature
 <222> Localização: 38, 39, 40, 41, 42, 43
 <223> Outras informações: n = A, T, C ou G

<400> Sequência: 51
 gccagcatgc aagcttgaat tccgaagttc ctatactnnn nnnagaatag gaacttcgag 60
 atctggatcc gcggaacg 78

<210> SEQ ID NO.: 52
 <211> Comprimento: 78
 <212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Iniciador de oligonucleotídeo

5 <221> Nome/chave: misc_feature
 <222> Localização: 36, 37, 38, 39, 40, 41
 <223> Outras informações: n = A, T, C ou G

10 <400> Sequência: 52
 cgttccggg atccagatct cgaagttcct attctnnnnn nagtatagga acttcggaat 60
 tcaagcttgc atgctggc 78

<210> SEQ ID NO.: 53
 15 <211> Comprimento: 23
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 20 <223> Outras informações: Iniciador de oligonucleotídeo

<400> Sequência: 53
 gcacatacaa atggacgaac gga 23

25 <210> SEQ ID NO.: 54
 <211> Comprimento: 22
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

30 <220> Características:
 <223> Outras informações: Iniciador de oligonucleotídeo

<400> Sequência: 54
 cctcttcgct attacgccag ct 22

35 <210> SEQ ID NO.: 55
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

40 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT6

<400> Sequência: 55
 45 tttttgaa 8

<210> SEQ ID NO.: 56
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 50 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT7

55 <400> Sequência: 56
 ttattgaa 8

<210> SEQ ID NO.: 57
 <211> Comprimento: 8
 60 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
<223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT22s de
WO 01/23545

5 <400> Sequência: 57
tatctaga 8

<210> SEQ ID NO.: 58
10 <211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
15 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT72s de
WO 01/23545

20 <400> Sequência: 58
tttctaca 8

<210> SEQ ID NO.: 59
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

25 <220> Características:
<223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT3s de WO
01/23545

30 <400> Sequência: 59
tatttgaa 8

<210> SEQ ID NO.: 60
<211> Comprimento: 8
35 <212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
40 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT2161s de
WO 01/23545

<400> Sequência: 60
tctctgga 8

45 <210> SEQ ID NO.: 61
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Sequência artificial

50 <220> Características:
<223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT2151s de
WO 01/23545

55 <400> Sequência: 61
tctccaga 8

<210> SEQ ID NO.: 62
<211> Comprimento: 8
<212> Tipo: DNA
60 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT2272s de
 WO 01/23545

5 <400> Sequência: 62
 tatctaca 8

<210> SEQ ID NO.: 63
 <211> Comprimento: 8
 10 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT2262s de
 15 WO 01/23545

<400> Sequência: 63
 tatcttga 8

20 <210> SEQ ID NO.: 64
 <211> Comprimento: 8
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

25 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sequência de espaçamento do sítio FRT2373s de
 WO 01/23545

30 <400> Sequência: 64
 tgtctata 8

<210> SEQ ID NO.: 65
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 35 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sítio FRT f22 mínimo de WO 01/23545

40 <400> Sequência: 65
 agttcctata ctatctagag aataggaact 30

<210> SEQ ID NO.: 66
 <211> Comprimento: 30
 45 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 <223> Outras informações: Sítio FRT f72 mínimo de WO 01/23545

50 <400> Sequência: 66
 agttcctata ctttctacag aataggaact 30

<210> SEQ ID NO.: 67
 55 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

<220> Características:
 60 <223> Outras informações: Sítio FRT f3 mínimo de WO 01/23545

<400> Sequência: 67
 agttcctata ctatttgaag aataggaact 30

5 <210> SEQ ID NO.: 68
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

10 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sitio FRT f2161 mínimo de WO 01/23545

<400> Sequência: 68
 agttcctata ctctctggag aataggaact 30

15 <210> SEQ ID NO.: 69
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

20 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sitio FRT f2151 mínimo de WO 01/23545

25 <400> Sequência: 69
 agttcctata ctctccagag aataggaact 30

30 <210> SEQ ID NO.: 70
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

35 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sitio FRT f2272 mínimo de WO 01/23545

<400> Sequência: 70
 agttcctata ctatctacag aataggaact 30

40 <210> SEQ ID NO.: 71
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

45 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sitio FRT f2262 mínimo de WO 01/23545

<400> Sequência: 71
 agttcctata ctatcttgag aataggaact 30

50 <210> SEQ ID NO.: 72
 <211> Comprimento: 30
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

55 <220> Características:
 <223> Outras informações: Sitio FRT f2373 mínimo de WO 01/23545

<400> Sequência: 72
 agttcctata ctgtctatag aataggaact 30

60 <210> SEQ ID NO.: 73
 <211> Comprimento: 343
 <212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Bacteriófago C1

<220> Características:

<223> Outras informações: Polipeptídeo Cre codificado pela SEQ ID NO:
47

5

<400> Seqüência: 73

	Met	Ser	Asn	Leu	Leu	Thr	Val	His	Gln	Asn	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Val
	1				5					10					15	
10	Asp	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Leu	Met	Asp	Met	Phe	Arg
				20					25					30		
	Asp	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	His	Thr	Trp	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Val
			35					40					45			
15	Cys	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Asn	Arg	Lys	Trp	Phe
	50						55					60				
	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ala
	65					70					75					80
	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln	His	Leu	Gly	Gln	Leu	Asn
20					85					90					95	
	Met	Leu	His	Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Ser	Asp	Ser	Asn	Ala
				100					105					110		
	Val	Ser	Leu	Val	Met	Arg	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	Asn	Val	Asp	Ala	Gly
			115					120					125			
25	Glu	Arg	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Glu	Arg	Thr	Asp	Phe	Asp	Gln
	130						135					140				
	Val	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn
	145					150					155					160
30	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Tyr	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Glu
				165						170						175
	Ile	Ala	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Gly	Arg
				180					185					190		
	Met	Leu	Ile	His	Ile	Gly	Arg	Thr	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	Gly
			195					200					205			
35	Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Glu	Arg	Trp
	210						215					220				
	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Leu	Phe	Cys
	225				230						235					240
40	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln	Leu
				245						250					255	
	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu	Ile
				260					265					270		
	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser	Gly
			275					280					285			
45	His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly	Val
	290						295					300				
	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn	Ile
	305					310					315					320
50	Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met	Val
				325						330					335	
	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp									
				340												

<210> SEQ ID NO.: 74

55 <211> Comprimento: 420

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Saccharomyces cerevisiae*

<220> Características:

60 <223> Outras informações: Polipeptídeo FLP codificado pela SEQ ID NO: 50

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeos compreendendo
5 pelo menos um primeiro sítio de recombinação FRT, o primeiro sítio de recombinação FRT compreende uma seqüência de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18.
- 10 2. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sítio de recombinação FRT compreende a SEQ ID NO: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 ou 38.
- 15 3. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende ainda um segundo sítio de recombinação.
- 20 4. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação é selecionado do grupo consistindo de sítio FRT, sítio LOX e sítio att.
- 25 5. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o sítio FRT é selecionado do grupo consistindo de sítio FRT do tipo selvagem e sítio FRT modificado, e o sítio LOX é selecionado do grupo consistindo de sítio LOX do tipo selvagem e sítio LOX

modificado, e o sítio att é selecionado do grupo consistindo de sítio att do tipo selvagem e sítio att modificado.

5 6. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação compreende um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26,
10 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

7. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação é diferente e não-recombinogênico, com relação
15 ao primeiro sítio de recombinação FRT.

8. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação FRT e o segundo sítio de recombinação são
20 sítios de recombinação correspondentes.

9. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende um primeiro promotor convergente, o primeiro
25 sítio de recombinação, o segundo sítio de recombinação e um segundo promotor convergente.

10. Polinucleotídeo isolado de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo

compreende um primeiro promotor convergente, o primeiro sítio de recombinação, uma primeira seqüência de polinucleotídeos de interesse operacionalmente ligada ao primeiro promotor convergente, um segundo polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado ao segundo promotor convergente, o segundo sítio de recombinação e o segundo promotor convergente

11. Método para obtenção de uma célula transformada caracterizado pelo fato de compreender a transformação da célula com o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e cultivo da dita célula sob condições de crescimento.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula apresenta ainda, incorporada estavelmente em seu genoma, uma molécula de ácido nucléico codificando uma FLP recombinase.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucléico codifica uma variante biologicamente ativa da FLP recombinase.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que a célula é de uma planta.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é integrado estavelmente no genoma da célula.

5 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a célula é de uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a célula de planta é de milho, cevada, milheto, trigo, arroz, sorgo, centeio, soja, canola, alfafa, girassol, açafrão, tabaco, *Arabidopsis* ou algodão.

15 18. Método de obtenção de uma planta transformada caracterizado pelo fato de compreender a transformação de uma célula de acordo com o método definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 17 e adicionalmente, compreender a regeneração da planta transformada.

20 19. Método de produção de uma recombinação de DNA de sítio específico, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 a) prover um primeiro DNA compreendendo um primeiro sítio de recombinação de sítio específico, em que o primeiro sítio de recombinação de sítio específico compreende um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de:

i) sítio de recombinação FRT compreendendo uma região de espaçamento selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18; e

5

ii) sítio de recombinação FRT selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38;

10

b) prover um segundo DNA compreendendo um segundo sítio de recombinação de sítio específico, o qual é recombinogênico com o primeiro sítio de recombinação de sítio específico; e

15

c) prover uma recombinase de sítio específico, a qual catalisa uma recombinação de sítio específico entre os primeiro e segundo sítios de recombinação de sítio específico.

20

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o primeiro DNA e o segundo DNA são providos em uma única molécula de polinucleotídeo.

25

21. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação de sítio específico e o segundo sítio de recombinação de sítio específico são sítios correspondentes.

22. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação de sítio específico e o segundo sítio de recombinação de sítio específico são sítios diferentes.

23. Método de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação de sítio específico e o segundo sítio de recombinação de sítio específico são orientados diretamente um ao outro.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que os primeiro e segundo sítios de recombinação de sítio específico flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, em que o provimento da recombinase de sítio específico excisa o primeiro polinucleotídeo de interesse.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a excisão do primeiro polinucleotídeo de interesse ativa a expressão do segundo polinucleotídeo de interesse.

26. Método de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação de sítio específico e o segundo sítio de recombinação de sítio específico estão em orientação oposta um ao outro.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que os primeiro e segundo sítios de recombinação de sítio específico flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, em que o provimento da recombinação de sítio específico inverte o primeiro polinucleotídeo de interesse.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a inversão do primeiro polinucleotídeo de interesse ativa a expressão do primeiro polinucleotídeo de interesse.

29. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a inversão do primeiro polinucleotídeo de interesse ativa a expressão do segundo polinucleotídeo de interesse.

30. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o primeiro DNA é provido em um primeiro polinucleotídeo e o segundo DNA é provido em um segundo polinucleotídeo, em que os primeiro e segundo polinucleotídeos são moléculas separadas.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo é uma molécula circular.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo compreende ainda um polinucleotídeo de interesse.

5 33. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 a) prover um polinucleotídeo compreendendo o primeiro sítio de recombinação FRT e o segundo sítio de recombinação, em que o segundo sítio de recombinação é um sítio FRT;

15 b) prover uma FLP recombinase, sob condições tais que a FLP recombinase implemente um evento de excisão mediado por recombinase; e

c) determinar a eficiência da excisão dos primeiro e segundo sítios de recombinação FRT.

20 34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que os primeiro e segundo sítios de recombinação FRT são sítios de recombinação correspondentes.

25 35. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) prover o primeiro sítio de recombinação FRT;

b) prover o segundo sítio de recombinação, em que o segundo sítio de recombinação é um sítio FRT, o qual é diferente do primeiro sítio de recombinação FRT;

5

c) prover uma FLP recombinase, sob condições tais que a FLP recombinase implementa um evento de recombinação; e

10

d) analisar o evento de recombinação, para determinar se os primeiro e segundo sítios de recombinação são não-recombinogênicos.

36. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende:

15

a) prover um sítio-alvo compreendendo o primeiro sítio de recombinação FRT;

20

b) prover um cassette de transferência compreendendo um segundo sítio de recombinação e um polinucleotídeo de interesse, em que os primeiro e segundo sítios de recombinação são recombinogênicos, com relação um ao outro; e

25

c) prover uma recombinase, em que a recombinase reconhece e implementa a recombinação nos primeiro e segundo sítios de recombinação, e o

polinucleotídeo de interesse é inserido no sítio-alvo.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado
5 pelo fato de que o sítio-alvo é incorporado estavelmente no
genoma de uma célula.

38. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado
pelo fato de que compreende:

10

a) prover um sítio-alvo compreendendo o primeiro
sítio FRT e o segundo sítio de recombinação, em
que os primeiro e segundo sítios de recombinação
são diferentes e não-recombinogênicos, com
15 relação um ao outro;

15

b) prover um cassette de transferência compreendendo
um polinucleotídeo de interesse, em que o
polinucleotídeo de interesse é flanqueado pelos
primeiro e segundo sítios de recombinação; e

20

c) prover uma recombinase, em que a recombinase
reconhece e implementa a recombinação nos
primeiro e segundo sítios de recombinação, e o
polinucleotídeo de interesse é inserido no sítio-
25 alvo.

25

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado
pelo fato de que o sítio-alvo compreende um segundo

polinucleotídeo de interesse, flanqueado pelos primeiro e segundo sítios de recombinação.

40. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o sítio-alvo é incorporado estavelmente no genoma de uma célula.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que compreende:

10

a) prover um sítio-alvo operacionalmente ligado a um primeiro e a um segundo promotor, em que os primeiro e segundo promotores estão em uma orientação convergente;

15

b) prover um cassette de transferência compreendendo, na seguinte ordem, o primeiro sítio de recombinação funcional, um primeiro polinucleotídeo de interesse orientado na direção 5' a 3', um segundo polinucleotídeo de interesse orientado na direção 3' a 5' e o segundo sítio de recombinação funcional; e

20

c) prover uma recombinase, em que a inserção do cassette de transferência no sítio-alvo resulta no primeiro polinucleotídeo de interesse sendo operacionalmente ligado no primeiro promotor convergente e no segundo polinucleotídeo de

25

interesse sendo operacionalmente ligado no segundo promotor convergente.

42. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado
5 pelo fato de que compreende:

10 a) prover um sítio-alvo compreendendo o primeiro sítio FRT e o segundo sítio de recombinação, em que os primeiro e segundo sítios de recombinação são diferentes e não-recombinogênicos, com relação um ao outro;

15 b) prover um primeiro cassete de transferência compreendendo, na seguinte ordem, o primeiro, um terceiro e o segundo sítio de recombinação, em que o primeiro e o terceiro sítio de recombinação do primeiro cassete de transferência flanqueiam um primeiro polinucleotídeo de interesse, e os primeiro, segundo e terceiro sítios de recombinação são diferentes e não-recombinogênicos, com relação um ao outro.

20 c) prover uma primeira recombinase, em que a primeira recombinase reconhece e implementa a recombinação nos primeiro e segundo sítios de recombinação;

d) prover um segundo cassete de transferência compreendendo os segundo e terceiro sítios de

recombinação, em que os segundo e terceiro sítios de recombinação do segundo cassete de transferência flanqueiam um segundo polinucleotídeo de interesse; e

5

- e) prover uma segunda recombinase, em que a segunda recombinase reconhece e implementa a recombinação nos primeiro e segundo sítios de recombinação, em que os primeiro e segundo cassetes de transferência estão integrados no sítio-alvo.

10

43. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende:

15

- a) prover um sítio-alvo compreendendo, na seguinte ordem, pelo menos o primeiro sítio de recombinação FRT, o segundo sítio de recombinação e um terceiro sítio de recombinação, em que os primeiro, segundo e terceiro sítios de recombinação são diferentes e não-recombinogênicos, com relação um ao outro;

20

- b) prover um primeiro cassete de transferência compreendendo um primeiro polinucleotídeo de interesse, flanqueado pelos primeiro e segundo sítios de recombinação;

25

- c) prover uma primeira recombinase, em que a primeira recombinase reconhece e implementa a

recombinação nos primeiro e segundo sítios de recombinação;

5 d) prover um segundo cassete de transferência compreendendo um segundo polinucleotídeo de interesse, flanqueado por pelo menos os segundo e terceiro sítios de recombinação; e

10 e) prover uma segunda recombinase, em que a segunda recombinase reconhece e implementa a recombinação nos segundo e terceiro sítios de recombinação, em que os primeiro e segundo cassetes de transferência estão integrados no sítio-alvo.

15 44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 43, caracterizado pelo fato de que o segundo sítio de recombinação de sítio específico é um sítio de recombinação FRT modificado selecionado do grupo consistindo de SEQ ID
20 NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 44, caracterizado pelo fato de que a recombinação de
25 sítio específico ocorre *in vivo*.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a recombinação de sítio específico ocorre em uma célula eucariótica.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a célula eucariótica é uma célula de planta.

5

48. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a célula de planta é de uma planta selecionada do grupo consistindo de milho, arroz, trigo, cevada, milheto, sorgo, centeio, soja, alfafa, canola, *Arabidopsis*, tabaco, girassol, algodão e açafrão.

10

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 48, caracterizado pelo fato de que o provimento do primeiro sítio de recombinação, do segundo sítio de recombinação ou da recombinase compreende uma transformação.

15

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 49, caracterizado pelo fato de que o provimento do primeiro sítio de recombinação, do segundo sítio de recombinação ou da recombinase compreende cruzamento sexual.

20

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 50, caracterizado pelo fato de que o primeiro sítio de recombinação é incorporado estavelmente no genoma de uma célula.

25

52. Biblioteca isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma população de plasmídeos, em que cada plasmídeo na população compreende um primeiro marcador selecionável comum, e cada plasmídeo na população
5 compreende um membro de uma população de sítios de recombinação FRT modificados, em que cada membro da população de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de nucleotídeo na SEQ ID NO: 43, em que
10 a população de plasmídeos compreende pelo menos cerca de 100 membros distintos da população de plasmídeos.

53. Biblioteca isolada de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que os sítios de recombinação
15 FRT modificados da população são recombinogênicos.

54. Biblioteca isolada de acordo com a reivindicação 52 ou 53, caracterizada pelo fato de que os sítios de recombinação FRT modificados não incluem sítios de recombinação FRT modificados com uma região de espaçamento
20 selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NOs: 4, 44, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 e 64.

55. Biblioteca isolada de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 52 a 54, caracterizada pelo fato de que a população de plasmídeos compreende pelo menos um sítio recombinogênico FRT modificado selecionado do grupo consistindo de:

a) um polinucleotídeo compreendendo uma região de espaçamento selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18; e

5

b) um sítio recombinogênico FRT modificado selecionado do grupo consistindo das SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

10

56. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende a população de plasmídeos como definida em qualquer uma das reivindicações 52 a 55, compreendendo ainda uma segunda população de plasmídeos, em que cada plasmídeo na segunda população compreende um segundo marcador selecionável comum, em que os primeiro e segundo marcadores selecionáveis são distintos, e cada plasmídeo na segunda população compreende um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados.

15

57. Kit de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o kit compreende ainda uma FLP recombinase ou um polinucleotídeo codificando a FLP recômbinase.

20

58. Kit de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de que pelo menos um membro da primeira população, da segunda população ou de ambas as populações de sítios de recombinação FRT modificados compreende:

25

a) região de espaçamento selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18; e

5

b) sítio recombinogênico FRT modificado selecionado do grupo consistindo das SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

10

59. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 58, caracterizado pelo fato de que cada membro das primeira e segunda populações de sítios de recombinação FRT modificados é recombinogênico.

15

60. Método de geração de uma biblioteca de moléculas, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) fornecer uma população de sítios de recombinação FRT modificados, em que cada membro da população de sítios de recombinação FRT modificados compreende uma região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de nucleotídeo na SEQ ID NO: 43; e

20

b) contatar a população de sítios de recombinação FRT modificados com uma população de plasmídeos tendo um marcador selecionável comum, sob condições para a inserção da população de sítios

25

de recombinação FRT modificados na população de plasmídeos, de modo que cada plasmídeo da população compreende um único membro da população de sítios de recombinação FRT modificados, para
5 gerar uma biblioteca de moléculas.

61. Método para selecionar um sítio de recombinação FRT modificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 10 a) fornecer uma primeira população de plasmídeos, em que cada plasmídeo na primeira população compreende um primeiro marcador selecionável comum e cada plasmídeo na primeira população compreende um membro de uma população de sítios
15 de recombinação FRT modificados, em que cada membro da população de sítios de recombinação FRT modificados randomizados compreende uma região de espaçamento compreendendo pelo menos uma alteração de nucleotídeo na SEQ ID NO: 43;
- 20 b) fornecer uma segunda população de plasmídeos, em que cada plasmídeo na segunda população compreende um segundo marcador selecionável comum, em que os primeiro e segundo marcadores
25 selecionáveis são distintos e cada plasmídeo na segunda população compreende um membro da população de sítios de recombinação FRT modificados;

c) combinar a primeira população de plasmídeos com a segunda população de plasmídeos, na presença de uma FLP recombinase, sob condições em que pode ocorrer uma recombinação de sítio específico; e

5

d) selecionar um plasmídeo co-integrante compreendendo os primeiro e segundo marcadores selecionáveis, o plasmídeo co-integrante compreendendo o sítio de recombinação FRT modificado.

10

62. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o plasmídeo co-integrante compreende um sítio de recombinação FRT modificado funcional.

15

63. Método de acordo com a reivindicação 61 ou 62, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolar o plasmídeo co-integrante.

20

64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a caracterização do sítio de recombinação FRT modificado do plasmídeo co-integrante.

25

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que a caracterização do sítio de recombinação FRT modificado compreende um método selecionado do grupo consistindo da determinação da eficiência da excisão,

determinação da especificidade de recombinação e sequenciamento do sítio de recombinação FRT modificado.

66. Método de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que as primeira e segunda populações de plasmídeos são combinadas em uma razão equimolar.

RESUMO

POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE UMA PLANTA TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE DNA DE SÍTIO ESPECÍFICO, BIBLIOTECA ISOLADA, MÉTODO DE GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE MOLÉCULAS E MÉTODO PARA SELECIONAR SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO FRT MODIFICADO

A presente invenção refere-se a métodos e composições que utilizam populações de sítios de recombinação FRT modificados, randomizados, para identificar, isolar e/ou caracterizar sítios de recombinação FRT modificados.

Os sítios de recombinação FRT modificados recombinogênicos podem ser empregados em uma variedade de métodos para a recombinação direcionada de polinucleotídeos de interesse, incluindo métodos para recombinar polinucleotídeos, avaliar a atividade do promotor, selecionar diretamente organismos transformados, minimizar ou eliminar a expressão resultante de integração randômica no genoma de um organismo, tal como uma planta, excisar polinucleotídeos de interesse, combinar cassetes de transferência múltipla, inverter ou remover um polinucleotídeo, e identificar e/ou caracterizar regiões de regulação transcricional.

Adicionalmente, é provido um método para obtenção de uma célula transformada compreendendo a transformação da célula com um polinucleotídeo e o cultivo da dita célula sob condições de crescimento, além de um método de obtenção de uma planta transformada compreendendo a transformação de uma célula e a regeneração da planta transformada.