



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 276 416**

⑤1 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **97122417 .5**

⑧6 Fecha de presentación : **18.12.1997**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0849359**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **24.06.1998**

⑤4 Título: **Genes de la rafinosa sinteasa y su uso.**

③0 Prioridad: **18.12.1996 JP 8-338673**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

⑦3 Titular/es: **Sumitomo Chemical Company, Limited**
27-1, Shinkawa 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8260, JP

⑦2 Inventor/es: **Wantanabe, Eijiro y**
Oeda, Kenji

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Genes de la rafinosa sintetasa y su uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a genes de la rafinosa sintetasa y a su uso.

Antecedentes de la invención

10

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa son derivados de sacarosa, que están representados por o- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)n-o- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-flucto-furanósido como fórmula general, y se denominan "rafinosa" cuando n = 1, "estaquiosa" cuando n = 2, "verbascosa" cuando n = 3, y "ajugosa" cuando n = 4.

15

Los contenidos más altos de semejantes oligosacáridos de la familia de la rafinosa se encuentran en las plantas, excepto para la sacarosa, y se ha sabido que están contenidos no sólo en plantas superiores incluyendo gimnospermas tales como plantas pináceas (v.g., píceas) y angiospermas tales como plantas leguminosas (v.g., soja, judía), plantas brasicáceas (v.g., colza), plantas quenopodiáceas (v.g., remolacha azucarera), plantas malváceas (v.g., algodón), y plantas salicáceas (v.g., chopo), sino también en algas verdes, clorella. Así, se producen ampliamente en el reino de las plantas de una manera similar a la sacarosa.

20

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa juegan un papel como azúcares de reserva en los órganos de almacenamiento o las semillas de muchas plantas como azúcares de traslocación en el fenómeno del transporte de azúcares entre los tejidos de algunas plantas.

25

Además, se ha sabido que los oligosacáridos de la familia de la rafinosa tienen el efecto de ofrecer buenas condiciones para la flora enterobacteriana, si estuviera presente en una cantidad adecuada en los alimentos. Por consiguiente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa ya han sido utilizados como sustancia alimenticia funcional para la adición a algunas clases de alimentos y se utilizan en el campo de los alimentos saludables especificados.

30

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa que tienen semejante papel y utilidad son producidos por el sistema de síntesis de oligosacáridos de rafinosa que comienza con la sacarosa en muchas plantas. El sistema de biosíntesis implica usualmente una reacción para la adición sucesiva de grupos galactosilo a partir de galactinol a través de un enlace α (1 $\rightarrow$ 6) a un grupo hidroxilo del átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa.

35

En la primera etapa de este sistema de biosíntesis, la rafinosa sintetasa es una enzima implicada en la reacción de producción de rafinosa combinando un grupo galactosilo del galactinol a través de un enlace α (1 $\rightarrow$ 6) con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa. Se ha sugerido que esta enzima constituye la etapa limitante de la velocidad en el sistema de síntesis anterior, y se ha revelado que esta enzima es bastante importante en el control de la biosíntesis de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa.

40

El control del nivel de expresión o de la actividad de la rafinosa sintetasa en plantas hace posible cambiar los contenidos de oligosacáridos de la familia de la rafinosa en estas plantas. No obstante, la rafinosa sintetasa, aunque la presencia de esta misma enzima ya fue confirmada en muchas plantas mediante la medición de su actividad con una técnica bioquímica, todavía no ha sido aislada y purificada con éxito en forma de una proteína homogénea. Castillo E. *et al.*, en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, núm. 2, pág. 351.5, los autores informan de una purificación doble de rafinosa sintetasa a partir de semillas de soja. Además, la secuencia de aminoácidos de esta enzima es todavía desconocida, y no existe ningún informe sobre el intento de comenzar a aislar un gen que codifique esta enzima.

50

Breve descripción de los dibujos

55

La Figura 1 muestra la construcción de plásmidos utilizados para la expresión de un gen de la rafinosa sintetasa en *Escherichia coli*. pBluescriptKS-RS es un plásmido que contiene clonado el gen de la rafinosa sintetasa. RS representa el gen de la rafinosa sintetasa, y las secuencias de nucleótidos mostradas en la porción superior de esta figura son las de ambas porciones terminales del gen de la rafinosa sintetasa. Una secuencia parcial representada por letras pequeñas es una secuencia de nucleótidos derivada del vector pBluescriptII KS-. Las secuencias de nucleótidos enmarcadas son el codón de iniciación (ATG) y el codón de terminación (TGATAA) del gen de la rafinosa sintetasa, respectivamente. Los sitios de reconocimiento para las diferentes endonucleasas de restricción se muestran encima de las secuencias de nucleótidos. pGEX-RS y pTcr-RS son plásmidos utilizados para la expresión del gen de la rafinosa sintetasa en *E. coli*. Ptac, Ptrc, GST, lacI^q, y rrnB representan el promotor tac, el promotor tcr, el gen de la glutatión-S-transferasa, el gen represor de la lactosa, y la señal de terminación de la transcripción del ARN ribosómico, respectivamente.

65

La Figura 2 muestra la construcción de los vectores de expresión utilizados para la expresión en plantas de genes mixtos que tienen cada uno un gen de la rafinosa sintetasa y un promotor conectado. El mapa de endonucleasas de restricción del gen de la rafinosa sintetasa clonado en el plásmido pBluescriptKS-RS se muestra en la porción

inferior de esta figura. pBI221RS y pBI221(-)RS indican los mapas de endonucleasas de restricción de los vectores de expresión utilizados en la transformación de la soja. 35S y NOS representan el promotor 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor y el terminador del gen de la nopalina sintetasa, respectivamente.

- 5 La Figura 3 muestra la construcción de vectores de expresión utilizados para la expresión en plantas de genes mixtos que tienen cada uno un gen de la rafinosa sintetasa y un promotor conectado. El mapa de endonucleasas de restricción del gen de la rafinosa sintetasa clonado en el plásmido pBluescriptKS-RS se muestra en la porción superior de esta figura. pBI121RS y pBI121(-)RS indican los mapas de endonucleasas de restricción de los vectores binarios utilizados para la transformación de la mostaza. Para el vector binario, únicamente se muestra una región entre el límite derecho y el límite izquierdo. 35S, NOS y NPT representan el promotor 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor, el terminador del gen de la nopalina sintetasa y el gen de resistencia a la kanamicina, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

- 15 Los métodos para construir genes descritos más abajo se pueden llevar a cabo según métodos ordinarios, por ejemplo, como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6; "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X; y "Current Protocols In Protein Science" (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8. El término "gen de la rafinosa sintetasa" según se utiliza aquí hace referencia a un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado a un átomo de carbono en la posición 6 del un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa (referido más adelante como el presente gen), y semejante gen se puede preparar, por ejemplo, a partir de plantas.

- 25 Más específicamente, el presente gen se puede preparar a partir de dicotiledóneas tales como plantas leguminosas (v.g., haba, soja) y plantas lamiáceas (v.g., alcachofa) o de plantas monocotiledóneas tales como las plantas gramíneas (v.g., maíz). Los ejemplos específicos del presente gen son un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1"; un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada mediante delección, sustitución, modificación o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, y capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa"; un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3"; un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada mediante delección, sustitución, modificación o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3, y capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa"; un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5"; y un "gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7."

- Adicionalmente, se mencionan las moléculas de ácido nucleico de al menos 15 moléculas de longitud, que hibridan específicamente con una molécula de ácido nucleico como se ha descrito antes o con una hebra complementaria de la misma. La hibridación específica ocurre preferiblemente en condiciones restrictivas e implica una poca o ninguna hibridación cruzada con secuencias de nucleótidos que no codifican (oligo)péptidos o los codifican sustancialmente diferentes. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar como sondas y/o para el control de la expresión génica. La tecnología de sondas de ácido nucleico es bien conocida por los expertos en la técnica que apreciarán fácilmente que tales sondas pueden variar en longitud. Son preferidas las sondas de ácido nucleico de 17 a 50, particularmente preferidas de 21 a 50 nucleótidos de longitud. Por supuesto, también pueden ser apropiado utilizar ácidos nucleicos de hasta 100 y más nucleótidos de longitud. Las sondas de ácido nucleico son útiles para diferentes aplicaciones. Por un lado, pueden ser utilizadas como cebadores de PCR para la amplificación de secuencias reguladoras. Otra aplicación es el uso como sonda de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que hibridan con una molécula de ácido nucleico de la invención mediante el rastreo de homología de genotecas de ADN genómico. Las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una molécula de ácido nucleico descrita antes también se pueden utilizar para la represión de la expresión de un gen que comprende tales secuencias reguladoras, por ejemplo, debido a un efecto antisentido o de triple hélice o para la construcción de las ribozimas apropiadas (ver, v.g., EP-B1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257) que escinde específicamente el (pre)-ARNm de un gen que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. La elección de los sitios diana apropiados y de las correspondientes ribozimas se puede realizar como describe por ejemplo Steinecke, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith *et al.* eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460. Además, la persona experta en la técnica está bien enterada de si también es posible marcar semejante sonda de ácido nucleico con un marcador apropiado para aplicaciones específicas, tales como la detección de la presencia de una molécula de ácido nucleico de la invención en una muestra derivada de un organismo.

- 65 Las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente pueden ser ADN o ARN o un híbrido de los mismos. Adicionalmente, dicha molécula de ácido nucleico puede contener, por ejemplo, enlaces tioéster y/o análogos de nucleótidos, utilizados comúnmente en enfoques con nucleótidos antisentido. Dichas modificaciones pueden ser útiles para la estabilización de la molécula de ácido nucleico frente a endo- y/o exonucleasas en la célula. Dichas moléculas

de ácido nucleico pueden ser transcritas mediante un vector apropiado que contiene un gen mixto que permite la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico en la célula. Tales moléculas de ácido nucleico pueden contener adicionalmente secuencias de ribozimas que escinden específicamente el (pre)ARNm que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. Adicionalmente, se pueden diseñar oligonucleótidos que son complementarios a una molécula de ácido nucleico de la invención (triple hélice; ver Lee, Nucl. Acids Res. 6 (1979), 3073; Cooney, Science 241 (1988), 456 y Dervan, Science 251 (1991), 1360), evitándose de ese modo la transcripción y la producción del oligopéptido codificado.

El presente gen se puede obtener, por ejemplo, mediante el siguiente método.

Los tejidos de una planta leguminosa tal como el haba (*Vicia faba*) o la soja (*Glycine max*) se congelan en nitrógeno líquido y se trituran físicamente con un mortero u otros medios a restos de tejido en polvo fino. De los restos de tejido, el ARN se extrae mediante un método corriente. Los estuches de extracción de ARN asequibles comercialmente pueden ser utilizados en la extracción. El ARN completo se separa del extracto de ARN mediante precipitación en etanol. Del ARN completo separado, el ARN con colas de poli-A se fracciona mediante un método corriente. Las columnas de oligo-dT asequibles comercialmente se pueden utilizar en el fraccionamiento. El ADNc se sintetiza a partir de la fracción obtenida (es decir, el ARN con colas de poli-A) mediante un método corriente. En la síntesis se pueden utilizar los estuches para la síntesis de ADNc asequibles comercialmente.

Por ejemplo, los fragmentos de ADNc del “gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1” como el presente gen se pueden obtener mediante amplificación por PCR utilizando el ADNc obtenido antes como molde y los cebadores 1 a 3 mostrados en la lista 1 de más abajo. Los cebadores utilizados aquí pueden ser diseñados y sintetizados sobre la base de la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2, dependiendo del propósito. Por ejemplo, con el fin de amplificar la región del marco de lectura abierto del “gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1,” se pueden diseñar y sintetizar los cebadores 1 a 4 mostrados en la lista 2 de más abajo.

De la misma manera, los fragmentos de ADNc del “gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3” se puede obtener mediante amplificación por PCR con el ADNc derivado de la soja obtenido antes como molde y, por ejemplo, los cebadores 4 a 6 mostrados en la lista 1 de más abajo. Los cebadores utilizados aquí se pueden diseñar y sintetizar sobre la base de la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 4, dependiendo del propósito. Por ejemplo, con el fin de amplificar la región del marco de lectura abierto del “gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3,” se pueden diseñar y sintetizar los cebadores 5 a 8 mostrados en la lista 2 de más abajo.

Los fragmentos de ADN amplificados se pueden subclonar según métodos corrientes, por ejemplo, como se describe en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición” (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; y “Current Protocols In Molecular Biology” (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X. Más específicamente, la clonación se puede efectuar, por ejemplo, utilizando un estuche de clonación TA (Invitrogen) y un vector plasmídico tal como pBluescript II (Stratagene). Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados se pueden determinar mediante el método de terminación didesoxi, por ejemplo, como describen F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, págs. 5463-5467. Por ejemplo, se puede utilizar preferiblemente el estuche ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit comercialmente asequible de Perkin-Elmer.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 276 416 T3

Lista 1

5	Cebador 1: AATTTTCAAG CATAGCCAAG TTAACCACCT 30 mero	SEQ ID NO:3
10	Cebador 2: GCTCACAAGA TAATGATGTT AGTC 24 mero	SEQ ID NO:10
15	Cebador 3: ATACAAGTGA GGAACCTGAC CA 22 mero	SEQ ID NO:11
20	Cebador 4: CCAAACCATA GCAACCTAA GCAC 24 mero	SEQ ID NO:12
25	Cebador 5: ACAACAGAAA AATATGACTC TTATTACT 28 mero	SEQ ID NO:13
	Cebador 6: AAAAGAGAGT CAAACATCAT AGTATC 26 mero	SEQ ID NO:14

30 Lista 2

35	Cebador 1: ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGC 29 mero	SEQ ID NO:15
40	Cebador 2: ATGGCACCAC CAAGCATAAC CAAAACCTGCA ACCCTCCAAG ACG 43 mero	SEQ ID NO:16
45	Cebador 3: TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGAC 25 mero	SEQ ID NO:17
50	Cebador 4: TCAAAATAAA AACTGGACCA AAGACAATGT 30 mero	SEQ ID NO:18
55	Cebador 5: ATGGCTCCAA GCATAAGCAA AACTG 25 mero	SEQ ID NO:19
60	Cebador 6: ATGGCTCCAA GCATAAGCAA AACTGTGGAA CT 32 mero	SED ID NO:20
65	Cebador 7: TCAAAATAAA AACTCAACCA TTGAC 25 mero	SEQ ID NO:21
	Cebador 8: TCAAAATAAA AACTCAACCA TTGACAATTT TGAAGCACT 39 mero	SEQ ID NO:22

ES 2 276 416 T3

El término “fragmento génico” según se utiliza aquí hace referencia a un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del presente gen (referido de aquí en adelante simplemente como el presente fragmento génico). Por ejemplo, puede ser un fragmento génico derivado de una planta que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa. Los ejemplos específicos del presente fragmento génico son un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del gen que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 y un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del gen que tiene una secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2, más específicamente un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial del mismo, que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en la lista 3 de más abajo.

Estos fragmentos génicos se pueden utilizar como sondas en el método de hibridación o como cebadores en el método PCR. Para cebadores en el método PCR, se prefiere generalmente que el número de nucleótidos sea mayor desde el punto de vista de que se asegure la especificidad de la hibridación; también se prefiere, no obstante, que el número de nucleótidos no sea mayor desde los puntos de vista de que los propios cebadores tengan la tendencia a tener una estructura mayor haciendo posibles el deterioro de la eficacia de hibridación y de que se requieran procedimientos complicados en la purificación tras la síntesis. En los casos habituales, se prefiere un fragmento génico que consta de un ADN monocatenario, donde el número de nucleótidos está en el intervalo de 15 a 50.

Lista 3

#1 Gly Ile Lys Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly	SEQ ID NO:23
#2 Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr	SEQ ID NO:24
#3 Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln	SEQ ID NO:25
#4 Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met: Pro Cys Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu Asn	SEQ ID NO:26
#5 Val Tyr Val, Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro	SEQ ID NO:27
#6 Thr Met Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val Pro Pro	SEQ ID NO:28
#7 Gly Leu His Ser His Leu Glu Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu	SEQ ID NO:29
#8 Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala Tyr Tyr Lys Ala Leu	SEQ ID NO:30
#9 Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala	SEQ ID NO:31
#10 Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly The Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys	SEQ ID NO:32

ES 2 276 416 T3

5	#11	Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile	SEQ ID
		Gln Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro	NO:33
		Cys Ala Glu Phe His Ala Ala ser Arg Ala Ile Ser	
		Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp	
10	#12	Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg Cys	SEQ ID
			NO:34
15	#13	Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu Asp	SEQ ID
		Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys lie Trp	NO:35
		Asn	
20	#14	Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gin Gly Gly	SEQ ID
		Gly Trp	NO:36
25	#15	Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met	SEQ ID
			NO:37

El presente fragmento génico está marcado, y se utiliza como sonda en el método de hibridación e hibrida con un ADN derivado de un organismo, de manera que se puede detectar el fragmento de ADN que tiene unida específicamente la sonda. Así, a partir de una genoteca génica derivada de un Organismo, se pueden detectar un gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una enzima capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1 \rightarrow 6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa; o un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del mismo, (referido más adelante simplemente como el presente método de detección).

En cuanto al ADN derivado del Organismo, por ejemplo, se puede utilizar una genoteca de ADNc o una genoteca de ADN genómico de una planta deseada. La genoteca génica puede ser también una genoteca génica asequible comercialmente tal cual o un genoteca preparada según un método de preparación de genotecas corriente, por ejemplo, como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; "Current Protocols In Molecular Biology" (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X.

En cuanto al método de hibridación, se puede emplear hibridación en placa o hibridación de colonias, dependiendo de la clase de vector utilizado en la preparación de la genoteca. Más específicamente, cuando se construye una genoteca que se va a utilizar con un fago vector, un microorganismo huésped adecuado se mezcla con el fago bajo condiciones de infección, que se mezcla adicionalmente con un medio de agar blando, y la mezcla se cultiva en placa sobre un medio de agar. Después de eso, se hace crecer un cultivo a 37°C hasta que aparece una placa del tamaño apropiado. Cuando una genoteca que se va a utilizar se construye con un vector plasmídico, el plásmido es transformado en un microorganismo huésped adecuado para formar un transformante. El transformante obtenido se diluye hasta una concentración adecuada, y la dilución se cultiva en placa sobre un medio de agar, después de lo cual el cultivo se hace crecer a 37°C hasta que aparece una colonia del tamaño apropiado.

En cualquiera de los casos de las genotecas anteriores, se coloca un filtro de membrana sobre la superficie del medio de agar después del cultivo, de manera que el fago o el transformante sean transferidos a la membrana. Esta membrana se desnaturaliza con un álcali, seguido de neutralización, y por ejemplo, cuando se utiliza una membrana de nailon, la membrana se irradia con luz ultravioleta, de manera que el ADN se fije sobre la membrana. Esta membrana se somete después a hibridación con el presente fragmento génico marcado mediante un método corriente como sonda. Para este método, se puede hacer referencia, por ejemplo, a D.M. Glover ed., "DNA cloning, a practical approach" IRL PRESS (1985), ISBN 0-947946-18-7. Existen diferentes reactivos y condiciones de reacción que se van a utilizar en la hibridación; por ejemplo, la prehibridación se lleva a cabo mediante la adición de 6 x SSC (NaCl 0,9 M, ácido cítrico 0,9 M), SDS al 0,1-1%, ADN de esperma de salmón de 100 µg/ml, e incubación a 65°C durante 1 hora. El presente fragmento génico marcado se añade después como sonda, y se mezcla. La hibridación se lleva a cabo a 42-68°C durante 4 a 16 horas. La membrana se lava con 2 x SSC, SDS al 0,1-1%, se enjuaga adicionalmente con 0.2 x SSC, SDS al 0-0,1% SDS, y después se seca. La membrana se analiza, por ejemplo, mediante autorradiografía u otra técnica, para detectar la posición de la sonda sobre la membrana y detectar de ese modo la posición del ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a la de la sonda utilizada. Así, se puede detectar el presente gen o el presente fragmento génico. El clon correspondiente a la posición del ADN detectado de este modo sobre la membrana

se identifica sobre gel medio de agar original, y se selecciona el clon positivo, de manera que se pueda aislar el clon que tiene el ADN. Se repiten los mismos procedimientos de detección para purificar el clon que tiene el ADN.

También se pueden utilizar otros métodos de detección, por ejemplo, GENE TRAPPER cDNA Positive Selection System Kit asequible comercialmente de Gibco BRL. En este método, una genoteca de ADN monocatenario se hibrida con el presente fragmento génico biotinilado (es decir, la sonda), seguido de la adición de cuentas magnéticas unidas a estreptavidina y mezclado. De la mezcla, se recogen con un imán las cuentas magnéticas unidas a estreptavidina, de manera que se recoge y se detecta el ADN monocatenario que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a la de la sonda utilizada, que se ha unido a estas cuentas a través del presente fragmento génico, la biotina y la estreptavidina. De este modo, se puede detectar el presente gen o el presente fragmento génico. El ADN monocatenario recogido se puede cambiar a una forma bicatenaria mediante tratamiento con una polimerasa de ADN adecuada utilizando un oligonucleótido adecuado como cebador.

También se puede utilizar el presente método de detección en el análisis de una planta. Más específicamente, se prepara un ADN genómico vegetal según un método corriente, por ejemplo, como se describe en "Cloning and Sequence (Plant Biotechnology Experiment Manual)" compilado bajo la supervisión de Itaru Watanabe, editado por Masahiro Sugiura, publicado por Noson Bunka-sha, Tokyo (1989). El ADN genómico vegetal se digiere con varias clases de endonucleasas de restricción adecuadas, seguido de electroforesis, y el ADN sometido a electroforesis se transfiere a un filtro según un método corriente. Este filtro se somete a hibridación con una sonda preparada a partir del presente fragmento génico mediante un método corriente, y se detectan los fragmentos de ADN con los que hibrida la sonda. La longitud de los fragmentos de ADN detectados se compara entre las diferentes variedades de una especie de planta especificada. Las diferencias de longitud hacen posible el análisis de las diferencias de las características fenotípicas acompañadas de la expresión de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa entre estas variedades. Además, cuando se compara la longitud de los fragmentos de ADN detectados mediante el método anterior entre la planta con genes recombinantes y la planta sin genes recombinantes de la misma variedad, la primera planta puede ser diferenciada de la segunda planta por la detección de bandas de hibridación en mayor número o en mayor concentración para la primera planta que para la última planta. Este método se puede llevar a cabo según el método RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), por ejemplo, como se describe en "Plant PCR Experiment Protocols" compilado bajo la supervisión de Ko Shimamoto y Takuji Sasaki, publicado por Shujun-sha, Tokyo (1995), ISBN 4-87962-144-7, págs. 90-94.

El método PCR que utiliza un cebador que tiene una secuencia de nucleótidos del presente fragmento génico hace posible amplificar a partir de un ADN derivado de un Organismo, un gen de la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una enzima capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1 \rightarrow 6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa; o un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del mismo (referido más adelante simplemente como el presente método de amplificación).

Más específicamente, por ejemplo, se sintetiza químicamente un oligonucleótido que tiene de 15 a 50 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del presente fragmento génico en el extremo 3' mediante un método de síntesis corriente. Basándose en la tabla de codones siguiente, que muestra la correspondencia de los aminoácidos codificados en una secuencia de nucleótidos, también se puede sintetizar un cebador mixto de manera que un resto en una posición especificada en el cebador se cambia a una mezcla de varias bases, dependiendo de la variación de codones que pueden codificar un cierto aminoácido.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 276 416 T3

Tabla de codones

5	Phe	UUU	Ser	UCU	Tyr	UAU	Cys	UGU
		UUC		UCC		UAC		UGC
10		UUA		UCA	Stop	UAA	Stop	UGA
		UUG		UCG		UAG	Trp	UGG
15	Leu	CUU	Pro	CCU	His	CAU	Arg	CGU
		CUC		CCC		CAC		CGC
20		CUA		CCA	Gln	CAA		CGA
		CUG		CCG		CAG		CGG
25	Ile	AUU	Thr	ACU	Asn	AAU	Ser	AGU
		AUC		ACC		AAC		AGC
30		AUA		ACA	Lys	AAA	Arg	AGA
	Met	AUG		ACG		AGA		AGG
35	Val	GUU	Ala	GCU	Asp	GAU	Gly	GGU
		GUC		GCC		GAC		GGC
40		GUA		GCA	Glu	GAA		GGA
		GUG		GCG		GAG		GGG

Además, también se puede utilizar una base capaz de formar un par con clases plurales de bases, tales como la inosina, en lugar de la anterior mezcla de varias bases. Más específicamente, por ejemplo, se pueden utilizar cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos como las mostradas en la lista 4. En este contexto, un oligonucleótido que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la hebra codificadora del presente gen que consiste en ADN bicatenario se designa “cebador efector”, y un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la hebra codificadora, “cebador antisentido”.

Un cebador efector que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la presente sobre el lado aguas arriba 5' en la hebra codificadora de un gen de la rafinosa sintetasa o un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del mismo que se va a amplificar, y un cebador antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos sobre el lado corriente abajo 3' en esta hebra codificadora, se utilizan combinados para la reacción PCR para amplificar un fragmento de ADN, por ejemplo, con una genoteca génica, un ADN genómico o un ADNc como molde. En este momento, la amplificación del fragmento de ADN se puede confirmar mediante un método corriente con electroforesis. Para el fragmento de ADN amplificado, su mapa de endonucleasas de restricción se construye o su secuencia de nucleótidos se determina mediante un método corriente, de manera que se puede identificar el presente gen o el presente fragmento génico. En cuanto a la genoteca génica utilizada aquí, por ejemplo, se puede utilizar una genoteca de ADN genómico de una planta deseada. Para la genoteca génica vegetal, se puede utilizar tal cual una genoteca asequible comercialmente derivada de una planta; o también se puede utilizar una genoteca preparada según un método de preparación de genotecas corriente, por ejemplo, como se describe en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición” (1989), Cold Spring Harbor laboratory Press o “Current Protocols in Molecular Biology” (1987), John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-50338-X. En cuanto al ADN genómico o al ADNc utilizado en el presente método de amplificación, por ejemplo, se puede utilizar el ADNc o el ADN genómico preparado a partir de una planta deseada.

ES 2 276 416 T3

Más específicamente, por ejemplo, se utiliza un cebador diseñado sobre la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 para el presente método de amplificación con ADNc derivado de la alcachofa japonesa, que es una planta lamiácea, como molde, de manera que se puede amplificar un fragmento génico de la rafinosa sintetasa que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 6. Además, por ejemplo, se utiliza un cebador diseñado sobre la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 para el presente método de amplificación con ADNc derivado de maíz, que es una planta gramínea, como molde, de manera que se puede amplificar un fragmento génico de la rafinosa sintetasa que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 8.

Lista 4

1-F	32mero	
	TTIAAIGTITGGTGGACIACICAITGGGTIGG	SEQ ID NO:38
2-F	41mero	
	ATIATIGAIAAITTIGGITGGTGIACITGGGAIGCIT TITA	SEQ ID NO:39
2-RV	41mero	
	TAIAAIGCITCCCAIGTICACCAIGCIAAITTITCI ATIAT	SEQ ID NO:40
3-F	44mero	
	GCIGGITGCCICCGIGGITTIGTIAATIATIGAIGAI GGITGGCA	SEQ ID NO:41
3-RV	44mero	
	TGCCAICCITCITCIATIATIAAIAICCIGGIGGI CAICCICC	SEQ ID NO: 42
4-F	32mero	
	AAIAAICAITTTIAAIGGIAAIGGIGTIATIGC	SEQ ID NO:43
4-RV	32mero	
	GCIATIACICCCITTICCTTTAAITGITTITT	SEQ ID NO:44
5-F	38mero	
	TGGATGGGIAAITTTIATICAICCIGAITGGGAI ATGTT	SEQ ID NO:45
5-RV	38mero	
	AACATITCCCAITCIGGITGIATIAAITTICCC ATCCA	SEQ ID NO:46
6-RV	27mero	
	CATITTTIACIA (AG) ICCIATIGGIGCIAA	SEQ ID NO:47

El presente método de amplificación también se puede utilizar para el análisis de un gen vegetal. Más específicamente, por ejemplo, se utiliza como molde un ADN genómico vegetal preparado a partir de diferentes variedades de una especie vegetal especificada para el presente método de amplificación para amplificar un fragmento de ADN. El fragmento de ADN amplificado se mezcla con una solución de formaldehído, que se desnaturaliza calentando a 85°C durante 5 minutos, seguido de enfriamiento rápido sobre hielo. Esta muestra se somete a electroforesis, por ejemplo, sobre un gel de poliacrilamida al 60% que contiene el 0% o el 10% de glicerol. En esta electroforesis, se puede utilizar un aparato de electroforesis asequible comercialmente para el SSCP (polimorfismo de la conformación de la hebra sencilla), y la electroforesis se lleva a cabo, mientras que el gel se mantiene a una temperatura constante, v.g., 5°C, 25°C o 37°C. A partir del gel sometido a electroforesis, se detecta un fragmento de ADN, por ejemplo, mediante un método tal como el método de tinción con plata con reactivos asequibles comercialmente.

A partir de las diferencias de comportamiento entre las variedades en la electroforesis del fragmento de ADN detectado, se detecta una mutación en el gen de la rafinosa sintetasa, y se lleva a cabo un análisis en cuanto a las diferencias causadas por la mutación en las características genotípicas acompañadas con la expresión de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Este método se puede llevar a cabo según el método SSCP, por ejemplo, como se describe en "Plant PCR Experiment Protocols" compilado bajo la supervisión de Ko Shimamoto y Takuji Sasaki, publicado por Shujun-sha, Tokyo (1995), ISBN 4-87962-144-7, págs. 141-146.

También se pueden utilizar el presente método de detección o el presente método de amplificación descritos antes para identificar un gen de la rafinosa sintetasa o un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del mismo y después aislar y purificar el gen o el fragmento génico identificado para obtener el presente gen (referido más adelante simplemente como el presente método de adquisición de genes).

Se puede obtener el presente gen o el presente fragmento génico, por ejemplo, detectando una sonda que consta del presente fragmento génico hibridado a ADN en la genoteca génica derivada del Organismo mediante el presente método de detección como se ha descrito antes para identificar ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a la de la sonda utilizada; purificar un clon que porta el ADN; y aislar y purificar un ADN plasmídico o de fago a partir del clon. Cuando el ADN obtenido de este modo es un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del gen de la rafinosa sintetasa, el rastreo adicional de la genoteca génica mediante el presente método de detección de genes utilizando el ADN como sonda produce el presente gen completo.

El presente gen o el presente fragmento génico pueden ser identificados, por ejemplo, efectuando una reacción en cadena de la polimerasa utilizando un cebador que tenga la secuencia de nucleótidos del presente fragmento génico para amplificar el fragmento de ADN del ADN derivado del Organismo mediante el presente método de amplificación como se ha descrito antes; y después construir un mapa de endonucleasas de restricción o determinar una secuencia de nucleótidos para el fragmento de ADN amplificado. Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento génico obtenido, se sintetiza un cebador antisentido para el análisis de las secuencias 5' terminales, y se sintetiza un cebador efector para el análisis de las secuencias 3' terminales. La secuencia de nucleótidos del presente gen completo se puede determinar mediante el método RACE utilizando estos cebadores y un estuche asequible comercialmente, v.g., Marathon Kit de Clontech. El presente gen completo se puede obtener sintetizando nuevos cebadores basados en ambas secuencias terminales de la secuencia de nucleótidos así determinada y efectuando de nuevo una reacción en cadena de la polimerasa.

El presente método de adquisición de genes descrito antes hace posible obtener genes de la rafinosa sintetasa como el presente gen de diferentes Organismos. Por ejemplo, un gen que codifica la rafinosa sintetasa que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 50% o mayor, en la región correspondiente a la longitud de 400 o más aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1, y capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa. Más específicamente, por ejemplo, se puede obtener un gen de la rafinosa sintetasa que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 4 amplificando e identificando un fragmento de ADN que contiene un fragmento génico que tiene una secuencia de nucleótidos parcial del gen de la rafinosa sintetasa mediante el presente método de amplificación utilizando los cebadores diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 y un ADNc de soja como molde; aislando y purificando el fragmento de ADN identificado, seguido de los procedimientos anteriores para obtener un gen completo que contiene el fragmento de ADN.

Se pueden construir un gen mixto que comprende el presente gen y un promotor conectado a él (referido más adelante simplemente como el presente gen mixto).

El promotor que se va a utilizar no está particularmente limitado, con tal que funcione en un Organismo huésped que se vaya a transformar. Entre los promotores se pueden incluir, por ejemplo, promotores sintéticos que funcionen en *Escherichia coli*, tales como el promotor del operón lactosa de *E. coli*, el promotor del operón triptófano de *E. coli* y el promotor tac, el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH), el promotor tardío principal de adenovirus (Ad.ML), el promotor temprano de SV40, y el promotor de baculovirus.

Cuando el Organismo huésped es una planta o una célula de la misma, entre los promotores se pueden incluir, por ejemplo, promotores constitutivos derivados de ADN-T tales como el promotor del gen de la nopalina sintetasa (NOS) y el promotor del gen de la octopina sintetasa (OCS); promotores derivados de virus vegetales tales como

los promotores 19S y 35S derivados del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotores derivados tales como el promotor del gen de la fenilalanina-amonio-liasa (PAL), el promotor del gen de la chalcona sintetasa (CHS) y el promotor del gen de la proteína relacionada con la patogénesis (PR). Además, también se puede utilizar el vector pSUM-GY1 (ver JP-A 06-189777/1994), que tiene un promotor que produce una expresión específica en un tejido vegetal especificado, v.g., un promotor del gen de la proteína glicinina de almacenamiento en las semillas derivado de la soja. El uso de un gen mixto construido de manera que tenga semejante promotor hace posible incrementar o disminuir el contenido de oligosacáridos de la familia de la rafinosa en un tejido especificado de una planta.

El presente gen mixto es introducido después en un Organismo huésped según un método de ingeniería genética corriente para dar un transformante. Si fuera necesario, el presente gen mixto se puede utilizar en forma de un plásmido dependiendo del método de transformación para introducir el gen en el Organismo huésped. Además, el presente gen mixto puede contener un terminador. En este caso, se prefiere generalmente que el gen mixto se construya de manera que tenga un terminador aguas abajo del gen de la rafinosa sintetasa. El terminador que se va a utilizar no está particularmente limitado, con tal que funcione en un Organismo huésped que se vaya a transformar. Por ejemplo, cuando el Organismo huésped es una planta o una célula de la misma, entre los terminadores se pueden incluir, por ejemplo, los terminadores constitutivos derivados de ADN-T tales como el terminador del gen de la nopalina sintetasa (NOS); y terminadores derivados de plantas tales como los terminadores GV1 o GV2 de virus de allium.

Si fuera necesario, el presente gen se puede utilizar en forma de plásmido. Por ejemplo, cuando el Organismo huésped es un microorganismo, el plásmido construido es introducido en el microorganismos mediante un método corriente, por ejemplo, como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición" (1989), Cold Spring Harbor laboratory Press o "Current Protocols in Molecular Biology" (1987). John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-50338-X. El microorganismo transformado de este modo se selecciona con un marcador tal como resistencia a antibióticos o auxotrofia. Cuando el Organismo huésped es una planta, el plásmido construido es introducido en una célula vegetal mediante un método corriente tal como infección con *Agrobacterium* (ver JP-B 2-58917/1990 y JP-A 60-70080/1985), electroporación en protoplastos (ver JP-A 60-251887/1985 y JP-B 5-68575/1993) o el método con pistola de partículas (ver JP-A 5-508316/1993 y JP-A 63-258525/1988). La célula vegetal transformada mediante la introducción de un plásmido se selecciona con un antibiótico tal como la kanamicina o la higromicina. A partir de la célula vegetal transformada de este modo, se puede regenerar una planta transformada mediante un método de cultivo de células vegetales corriente, por ejemplo, como se describe en "Plant Gene Manipulation Manual (How to Produce Transgenic Plants)" escrito por Uchimiya, 1990, Kodan-sha Scientific (ISBN 4-06-153513-7), págs. 27-55. Además, la colección de semillas de la planta transformada también hace posible la proliferación de la planta transformada. Además, el cruzamiento entre la planta transformada obtenida y la planta no transformada hace posible producir plantas de progenie con el carácter de la planta transformada.

El contenido de oligosacáridos de la familia de la rafinosa se puede cambiar introduciendo el presente gen en un Organismo huésped o en una célula del mismo, y modificando el metabolismo en el Organismo huésped o en una célula del mismo. En cuanto a semejante método, por ejemplo, se puede utilizar un método de modificación metabólica para incrementar la cantidad de oligosacáridos de la familia de la rafinosa en un Organismo huésped o en una célula del mismo construyendo el presente gen mixto que comprende el presente gen y un promotor conectado, en cuyo caso el presente gen está conectado al promotor en una dirección original adecuada para la transcripción, la traducción, y la expresión como proteína, y después introduciendo el presente gen mixto en el Organismo huésped o en una célula del mismo; o un método para la modificación metabólica para disminuir la cantidad de oligosacáridos de la familia de la rafinosa en un Organismo huésped o una célula del mismo construyendo el presente gen mixto que comprende el presente gen y un promotor conectado, en cuyo caso el presente gen se conecta a un promotor en una dirección inversa inadecuada para la traducción y la expresión como proteína, y después introduciendo el presente gen mixto en el Organismo huésped o en una célula del mismo.

El término "rafinosa sintetasa: proteína" según se utiliza así hace referencia a una proteína codificada en el presente gen (referida más adelante simplemente como la presente proteína). Por ejemplo, puede incluir una proteína enzimática que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o que tiene una secuencia de aminoácidos derivada mediante delección, sustitución, modificación o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; y capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo a través de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa.

Los ejemplos específicos de la presente proteína son una proteína enzimática que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (799 aminoácidos; peso molecular, 89 kDa) y una proteína enzimática que tiene el aminoácido del SEQ ID NO: 3 (781 aminoácidos; peso molecular, 87 kDa).

La presente proteína, si bien se puede preparar, por ejemplo, a partir de plantas leguminosas tales como el haba, (*Vicia faba*), mediante un método bioquímico corriente tal como precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, columna de intercambio iónico, columna hidrófoba o columna de filtración en gel, también se puede preparar a partir del Organismo huésped transformado con el presente plásmido, o de una célula del mismo. Más específicamente, por ejemplo, utilizando el GST Gene Fusion Vectors Kit de Pharmacia, el presente gen es insertado en un plásmido vector de expresión anclado al estuche. El plásmido vector resultante es introducido en un microorganismo tal como *E. coli* según un método de ingeniería genética corriente. Se hace crecer un cultivo del transformante obtenido en un medio con la adición de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosido), de manera que la presente proteína pueda ser expresada y derivada en

forma de una proteína fusionada en el cultivo. La proteína fusionada expresada e inducida se puede aislar y purificar mediante un método corriente tal como rotura de células bacterianas, operación en columna o electroforesis SDS-PAGE. La digestión de la proteína fusionada con una proteína tal como la trombina o el factor Xa de coagulación de la sangre produce la presente proteína. Esto se puede realizar preferiblemente, por ejemplo, según el método descrito en “Current Protocols In Protein Science” (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8. La actividad de la presente proteína se puede medir, por ejemplo, mediante el método descrito por L. Lehle y W. Tanner, Eur. J. Biochem., 38, 103-110 (1973).

Se puede producir un anticuerpo anti-rafinosa sintetasa capas de unirse a una proteína rafinosa sintetasa (referido más adelante simplemente como el presente anticuerpo) mediante un método inmunológico corriente utilizando la presente proteína preparada antes, como antígeno. Más específicamente, se puede producir el presente anticuerpo, por ejemplo, según el método descrito por Ed Harlow y David Lane, “Antibodies: A Laboratory Manual” (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2.

La presente proteína se puede detectar tratando las proteínas de ensayo con el presente anticuerpo y detectando una proteína que tiene el presente anticuerpo unido específicamente. Semejante método de detección se puede llevar a cabo según una técnica inmunológica tal como el método de transferencia Western o el análisis de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), por ejemplo, como describen Ed Harlow y David Lane, “Antibodies: A Laboratory Manual” (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

El método de transferencia Western se lleva a cabo, por ejemplo, como sigue: Se extraen las proteínas de una planta, por ejemplo, según el método descrito en Methods in Enzymology, volumen 182, “Guide to Protein Purification,” págs. 174-193, ISBN 9-12-182083-1. La composición de un tampón de extracción se puede cambiar adecuadamente dependiendo del tejido vegetal utilizado. Las proteínas extraídas son sometidas a electroforesis según un método SDS-PAGE. Las proteínas sometidas a electroforesis en el gel son transferidas a una membrana mediante transferencia Western con un método eléctrico corriente. Más específicamente, por ejemplo, el gel se sumerge en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%) durante 10 minutos, y después se colocan sobre una membrana PVDF con corte al mismo tamaño que el gel. El gel junto con la membrana se coloca en un aparato de transferencia asequible comercialmente de tipo semi-seco. La transferencia se lleva a cabo a una corriente constante de 0,8 a 2 mA/cm² durante 45 minutos a 1 hora. Las proteínas transferidas a la membrana se pueden detectar inmunológicamente con un estuche para la detección de la transferencia Western utilizando un anticuerpo primario, y un anticuerpo secundario o proteína A, que ha sido marcado con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. En este momento, la presente proteína sobre la membrana se puede detectar mediante el uso del presente anticuerpo como anticuerpo primario.

En el método ELISA, por ejemplo, la propiedad de las proteínas que se unen a la superficie de una placa ELISA de 96 pocillos elaborada de reina se utiliza en principio para la detección inmunológica de un antígeno que se une por último a la superficie de la placa de ELISA. Las proteínas de ensayo se añaden en forma de solución y se unen a una placa de ELISA, seguido de bloqueo, por ejemplo, mediante la adición de PBS conteniendo una proteína tal como seralbúmina bovina al 5%. Después de eso, el pocillo se lava con PBS, a lo que se añade una solución que contiene el presente anticuerpo para efectuar la reacción. Después de lavar el pocillo, se añade adicionalmente al pocillo una solución que contiene un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, seguido de lavado. Finalmente, se añade al pocillo una solución sustrato para la detección, y se detecta el desarrollo de color con un lector de ELISA.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Purificación de Galactinol

Aproximadamente 250 ml de melazas residuales de remolacha azucarera se diluyeron cinco veces con metanol. La dilución se centrifugó a 21.400 x g durante 15 minutos a la temperatura ambiente para eliminar la materia insoluble. El sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2 litros, a lo que se añadió en porciones isopropanol a la mitad de su volumen agitando. El matraz se dejó a la temperatura ambiente durante un momento hasta que el precipitado resultante se adhirió al matraz. El sobrenadante se descartó después mediante decantación. Al precipitado se le añadieron 500 ml de etanol, y la mezcla se lavó agitando con un aparato de sacudimiento rotatorio. El lavado se repitió adicionalmente varias veces. El precipitado lavado se separó de la pared del matraz rascando, seguido de secado con aire sobre un papel de filtro. El precipitado secado con aire (polvo seco) se disolvió en agua purificada hasta aproximadamente el 40% (p/v). A esta solución se le añadió AG501-X8(D) de BioRad, seguido de agitación. Esta operación se repitió hasta que casi no se observó color en la solución. La solución resultante se trató con una columna Sep-Pak QMA de Millipore, y se pretrató adicionalmente con columnas Sep-Pak CM, Sep Pak C18 y Sep Pak Silica de Millipore. La solución resultante se cargó a un volumen de 5 ml en una columna Wako-gel LP40C18 (Wako Pure Chemical Industries, 2,6 cm x 85 cm), y se hizo eluir con agua purificada. El contenido de azúcar del eluato se midió con un refractómetro para azúcares portátil, y se analizó la composición de azúcares mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Sugar-pak Na (7,8 mm x 300 mm) de Millipore. La detección de los

ES 2 276 416 T3

azúcares se llevó a cabo con un Refractómetro Diferencial modelo 410 de Waters. El eluato que contenía galactinol se liofilizó, y el polvo liofilizado resultante se disolvió en 5 ml de agua purificada. La solución se cargó en una columna TOYOPEARL HW40(S) (Toso, 2,6 cm x 90 cm), y se hizo eluir con agua purificada. El eluato se analizó de la misma manera que se ha descrito antes, de manera que se obtuvo galactinol purificado.

El galactinol obtenido se mantuvo a 25°C durante 40 minutos en la mezcla de reacción que pasó a contener tampón fosfato 80 mM (pH 6,5), galactinol de 2 mg/ml, y 8,3 U de α -galactosidasa (Boehringer Mannheim, *E. coli* productor en exceso 662038). La mezcla de reacción se extrajo con cloroformo, y la capa de agua se analizó mediante HPLC. Se confirmó que el galactinol resultante era hidrolizado en galactosa y mio-inositol.

Ejemplo 2

Medición de la Actividad Rafinosa Sintasa

Se midió la actividad de la rafinosa sintetasa en las siguientes condiciones según la descripción de L. Lehle y W. Tanner, Eur. J. Biochem., 38, 103-110 (1973).

Primero, se añadieron 2 μ l de una muestra que se iba a utilizar en la medición de la actividad a 18 μ l de la mezcla de reacción que pasó a contener Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 5 mM, BSA al 0,01%, sacarosa 200 μ M, galactinol 5 mM, sacarosa[C^{14}] de 740 kBq/ml (31,7 μ M), y la mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 3 a 20 horas. Tras la reacción, se añadieron 30 μ l de etanol a la mezcla de reacción, seguido de agitación y centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aplicó a un volumen de 5 μ l sobre una placa de HPTLC de celulosa para la cromatografía en capa fina (Merck, 10 cm x 20 cm), y se desarrolló con n-butanol : piridina : agua : ácido acético = 60 : 40 : 30 : 3. La placa desarrollada se secó y después se analizó cuantitativamente con un analizador de imágenes (Fuji Photographic Film, FUJIX Bio Imaging Analyzer BAS-2000II) para la determinación de la rafinosa [C^{14}] producida.

Ejemplo 3

Purificación de la Rafinosa Sintasa

La purificación de la rafinosa sintetasa a partir de haba se llevó a cabo como sigue: Para cada solución de proteína purificada, las proteínas presentes en la solución de proteína se analizaron mediante SDS-PAGE (Daiichi Kagaku Yakuhin), y se midió la actividad enzimática de la misma según el método descrito en el Ejemplo 2.

Primero, se descongelaron y se pelaron 300 de semillas inmaduras de haba (Nintoku Issun) almacenadas a -80°C. Las semillas peladas se colocaron en 600 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y benzamida 1 mM, y se trituraron sobre hielo con un mortero. El material triturado se centrifugó a 21.400 x g durante 50 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante se le añadieron polietilenimina al 10% (pH 8,0) a 1/20 en volumen. La mezcla se agitó a 4°C durante 15 minutos, y se centrifugó a 15.700 x g durante 20 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante se le añadieron 196 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ agitando. La mezcla se agitó sobre hielo durante 30 minutos, y se centrifugó a 15.700 x g durante 20 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante se le añadieron adicionalmente 142 g/l of $(NH_4)_2SO_4$ agitando. Después de la agitación en hielo durante 30 minutos, la mezcla se centrifugó a 15.700 x g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado resultante se disolvió en 50 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) y DTT (ditiotritol) 5 mM, y la solución se sometió a diálisis frente a Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 1 mM y EDTA 1 mM a 4°C durante la noche. Tras la diálisis, la suspensión se centrifugó a 70.000 x g durante 60 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante se le añadió benzamida 1 mM · HCl, ácido ϵ -amino-n-capróico 5 mM, antipaina de 1 μ g/ml, leupeptina de 1 μ g/ml y EGTA 10 mM, y se añadió adicionalmente KCl 2 M en porciones a un volumen de 1/40. La mezcla se cargó en una columna DEAE-Sephacel (Pharmacia, 2,5 cm x 21,5 cm) equilibrada con KCl 0,05 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 1 mM y EDTA 1 mM, y las proteínas absorbidas se hicieron eluir con un gradiente de KCl de 0,05 a 0,5 M. Las etapas de purificación hasta esta fase se repitieron tres veces, y las fracciones que tenían actividad rafinosa sintasa se combinaron y después se purificaron como sigue:

A la fracción eluida que tenía actividad rafinosa sintetasa se le añadió en porciones $(NH_4)_2SO_4$ saturado a un volumen de 1/4. La solución se cargó en una columna Phenyl-Sepharose (Pharmacia, 2,5 cm x 10,2 cm) equilibrada con $(NH_4)_2SO_4$ saturado al 20%, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 1 mM y EDTA 1 mM, y las proteínas absorbidas se hicieron eluir con un gradiente de $(NH_4)_2SO_4$ del 20% al 0%. La fracción activa resultante se diluyó mediante la adición de tampón fosfato de potasio 0,01 M (pH 7,5) al doble del volumen. La solución diluida se cargó en una columna Econo-Pac 10DG (BioRad, 5 ml) equilibrada previamente con tampón fosfato de potasio 0,01 M (pH 7,5) y DTT (ditiotritol) 2 mM, y las proteínas absorbidas se hicieron eluir con un gradiente de tampón fosfato de potasio de 0,01 a 0,5 M (pH 7,5) y DTT (ditiotritol) 2 mM. Se encontró que la fracción activa obtenida en esta fase había sido purificada hasta 6.500 veces o una actividad específica superior. Parte de la solución de proteína purificada que tenía actividad rafinosa sintetasa se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia, 1,6 cm x 60 cm) equilibrada con KCl 0,2 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), DTT (ditiotritol) 1 mM y EDTA 1 mM. Las proteínas purificadas separadas de este modo se sometieron a SDS-PAGE, y se midió la actividad rafinosa sintetasa. Se identificó que una banda de proteína que tenía actividad rafinosa sintetasa tenía un peso molecular de aproximadamente 90 kDa en la SDS-PAGE.

Ejemplo 4

Análisis de la Secuencia de Aminoácidos Parcial de la Rafinosa Sintasa

- 5 A aproximadamente 1 ml de la solución de proteína purificada, que había sido purificada con una columna Econo-Pac 10DG (BioRad, 5 ml) en el Ejemplo 3, se le añadió TCA al 100% a un volumen de 1/9, y la mezcla se dejó sobre hielo durante 30 minutos. Después de la centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, el precipitado resultante se suspendió en 500 μ l de acetona fría (-20°C), seguido de centrifugación adicional. Se repitió este lavado con acetona, y el precipitado recogido se secó y después se disolvió en 200 μ l de tampón de muestra de SDS, seguido de SDS-PAGE.
- 10 Se efectuó una tinción CBB para el gel sometido a electroforesis, del cual se cortó la banda de una proteína rafinosa sintetasa.

- Al gel recogido de este modo se le añadió 1 ml de acetonitrilo al 50% y carbonato de amonio 0,2 M (pH 8,9), y el lavado continuó agitando a la temperatura ambiente durante 20 minutos. El gel se lavó de nuevo una vez de la misma manera, y se secó a presión reducida hasta un grado que produjo una reducción de volumen. A este gel se le añadieron 1 ml de Tween-20 al 0,02% y carbonato de amonio 0,2 M (pH 8,9), y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de separar la solución, se añadieron 400 μ l de urea 8 M y NH_4HCO_3 0,4 M, a la se que se añadieron adicionalmente 40 μ l de DTT (ditiotreitól) 45 mM, y la mezcla se dejó a 50°C durante 20 minutos. Tras el retorno completo a la temperatura ambiente, se añadieron 4 μ l de ácido yodoacético 1 M, y la mezcla
- 20 se agitó en la oscuridad a la temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras la separación de la solución, se añadió 1 ml de agua purificada, y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de lavado. Tras dos lavados adicionales, se añadió 1 ml de acetonitrilo al 50% y carbonato de amonio 0,2 M (pH 8,9), y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Se repitió el mismo tratamiento de nuevo una vez, después de lo cual se separó la solución, y el gel se secó a presión reducida hasta el grado que se produjo una reducción de volumen.

- A este gel se le añadió una solución de Proteasa I de Acromobacter (Takara, Residue-specific Protease Kit) a un volumen de 100 μ l. Se añadió nuevamente Tween-20 al 0,02% y carbonato de amonio 0,2 M (pH 8,9) hasta un grado que el gel no era expuesto desde la superficie de la solución, y la mezcla se dejó a 37°C durante 42 horas. Se añadieron adicionalmente 500 μ l de TFA al 0,09% y acetonitrilo al 70%, y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante
- 30 30 minutos. La mezcla resultante contenida en un tubo de muestra se hizo flotar en un baño ultrasónico, seguido de tratamiento ultrasónico (BRANSON, potencia de entrada 60 W) durante 5 minutos. El tubo y el contenido tratado de este modo se centrifugaron, y el extracto resultante se recogió en otro tubo de muestra recubierto de silicona. Por otro lado, se añadieron de nuevo 500 μ l de TFA al 0,09% y acetonitrilo al 70% al precipitado, seguido de la extracción repetida de la misma manera que se ha descrito antes. Los extractos resultantes se combinaron y después se concentraron a presión reducida hasta el grado que se producía una solución que permanecía a un volumen de 200 a 300 μ l. Al producto concentrado se le añadieron 25 μ l de urea 8 M y NH_4HCO_3 0,4 M, y la mezcla se concentró hasta el punto que se produjo una solución que permanecía a un volumen de 100 μ l o menos. El producto concentrado se llevó a aproximadamente 100 μ l con agua purificada, y la mezcla se filtró a través de un filtro Ultrafree C3 GV (Millipore). El producto filtrado obtenido se sometió después a elución a través de una columna Aquapore BU-300 C-4 (2,1 mm x 300 mm) con un gradiente de TFA al 0,1%/acetonitrilo del 2,1% al 68,6%. Se verificó la absorbancia a 215 nm para recoger una fracción en un pico de la misma. La muestra recogida se evaporó a presión reducida hasta una sequedad completa, y después se analizó con un Protein Sequencer 473A de ABI para determinar la secuencia de aminoácidos parcial de una rafinosa sintetasa.

Ejemplo 5

Preparación de ADNc

- Se congelaron aproximadamente 2 g de semillas inmaduras de haba (Nintoku Issun) en nitrógeno líquido y después se trituraron con un mortero, al cual se añadieron 20 ml de Isogen (Nippon gene), y la mezcla se trituró más cuidadosamente. El material triturado se transfirió a un tubo de centrifugación, al cual se añadieron 4 ml cloroformo, y la mezcla se agitó con un mezclador de vórtice y después se centrifugó a 6.500 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante se lavó con 10 ml de etanol al 70% y después se disolvió en 1 ml de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, SDS al 0,1%). La solución se dejó a 60°C durante 10 minutos y después se centrifugó
- 55 a 10.000 x g durante 1 minuto para eliminar la materia insoluble. Al sobrenadante resultante se le añadió un volumen equivalente de Oligotex-dT30 (Takara), y la mezcla se agitó y después se dejó a 65°C durante 5 minutos. La mezcla se colocó sobre hielo y después se dejó 3 minutos, a lo que se añadieron 200 μ l de NaCl 5 M, y la mezcla se dejó a 37°C durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó después a 10.000 x g a 4°C durante 3 minutos. El precipitado se recogió y después se suspendió en 1 ml de tampón TE, y la suspensión se dejó a 65°C durante 5 minutos, que se colocó sobre hielo y después se dejó durante 3 minutos, seguido de centrifugación a 10.000 x g durante 3 minutos a 4°C para eliminar el precipitado.

- Al sobrenadante resultante se le añadieron 100 μ l de acetato de sodio 3 M y 2 ml de etanol, y el ARN se precipitó con etanol y se recogió. El ARN recogido se lavó dos veces con etanol al 70% y después se disolvió en 20 μ l de agua esterilizada, que se utilizó para la posterior síntesis de ADNc. La cantidad de ARN obtenida se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm.

ES 2 276 416 T3

Para la síntesis de ADNc, se utilizaron First Strand Synthesis Kit para RT-PCR (Amercham) y cDNA Synthesis Kit (Takara), y todas las operaciones se realizaron según el protocolo.

Ejemplo 6

Análisis de la secuencia de nucleótidos del Gen de la Rafinosa Sintasa a partir de ADNc

Basándose en la secuencia de aminoácidos obtenida en el Ejemplo 4, se sintetizaron cebadores de ADN sintéticos mixtos que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 5 más abajo. Se llevó a cabo el método de la PCR con Gene Amp PCR Systems 2400 y DNA Thermal Cycler Model 480 de Perkin-Elmer utilizando Advantage Klen Taq cDNA Kit de Clontech. La reacción en cadena de la polimerasa se efectuó con los cebadores anteriores a 94°C durante 1 minuto, a 50°C durante 3 minutos, y a 72°C durante 3 minutos, y esta reacción se repitió cuarenta veces. Como resultado, las combinaciones de cebadores 8.2 y 13.3RV, cebadores 13.4 y 10.3RV, y cebadores 7.4 y 10.3RV, que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 5 más abajo, daban una amplificación de las bandas de 1,2 kb, 0,5 kb, y 1,2 kb, respectivamente. Estos fragmentos de ADN amplificados se clonaron con un estuche de clonación TA (Invitrogen), seguido de reacción de la secuencia utilizando ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer y el análisis de la secuencia de nucleótidos con un secuenciador de ADN 373S de ABI. Como resultado, se encontró que estos fragmentos de ADN tenían una secuencia de nucleótidos que se extendía desde la base 813 a la base 1915, de la base 1936 a la base 2413, y de la base 1226 a la base 2413, respectivamente, en la secuencia de nucleótidos del SEC ID NUM: 2. Basándose en estas secuencias de nucleótidos, se prepararon los cebadores de ADN sintéticos que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 6 más abajo, y se analizaron las secuencias de nucleótidos de ambas regiones terminales de ADNc con Marathon cDNA Amplification Kit de Clontech. Como resultado, se determinó finalmente la secuencia de nucleótidos del SEC ID NUM: 2.

Lista 5

Núm.8.2	26mero	
AA (AG)	AC (ATGC)	GC (ATGC) CC (ATGC) AG (TC) SEQ ID NO:48
AT (TCA)	AT (TCA)	GAC AA
Núm.13.4	20mero	
AA (AG)	AT (TCA)	TGG AA (TC) CT (ATGC) AAC AA SEQ ID NO:49
Núm.7.4	24mero	
AA (AG)	GC (ATGC)	AG (AG) GT (ATGC) GT (ATGC) SEQ ID NO:50
GT (ATGC)	CC (ATGC)	AAG
Núm.13.3RV	21mero	
(TC) TT	(AG) TT	(ATGC) AG (AC) TP CCA SEQ ID NO:51
(AGT) AT	TTT	
Núm.10.3RV	21mero	
(TC) TT	(AG) TC	(TC) TC (AG) TA (ATGC) AG SEQ ID NO:52
(AG) AA	TTT	

ES 2 276 416 T3

Lista 6

5	RS-2RV 30mero	
	GGCTGAGGTTTCGGTTCATTCCTGAATCATC	SEQ ID NO:53
10	RS-7 30mero	
	CCAAATGGTACATATTGGCTCCAAGGTTGT	SEQ ID NO:54
15	RS-8 30mero	
	AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG	SEQ ID NO:55
20	RS-9 30mero	
	TGGTGCAATGGGAAAACCTCCAATGAGCACC	SEQ ID NO: 56
25	RS-10 30mero	
	ATGAAGTGTCTGATAGATTGAAAGTTTCG	SEQ ID NO: 57
30	RS-11 30mero	
	CAGTCTCTGGAGTTTGATGATAATGCAAGT	SEQ ID NO: 58

Ejemplo 7

35 Clonación del Gen de la Rafinosa Sintetasa de ADNc de Haba

Se sintetizaron los cebadores diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 1, es decir, los cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos mostrada en la lista 7 más abajo. Utilizando estos cebadores y el ADNc obtenido en el Ejemplo 5 como molde, se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN de la región del marco de lectura abierto en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN amplificado se digirió con las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Xba* I cuyas secuencias de reconocimiento estaban contenidas en los cebadores utilizados. Utilizando el Ligation Kit (Takara), se clonó el fragmento de ADN digerido de este modo en el plásmido pBluescriptII KS- (Stratagene) previamente digerido con *Bam* HI y *Xba* I. La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN clonado se confirmó con el ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer. En el clon obtenido de este modo, se encontró que la base de la posición 1591 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 se había cambiado de timina (T) a citosina (C). Esta era, no obstante, una mutación terminadora sin cambio de aminoácido; por lo tanto, este clon se denominó pBluescriptKS-RS, y se utilizó en el siguiente experimento.

Lista 7

55	RS-N 41mero	
	CGCGGATCCACCATGGCACCACCAAGCATAACCAAACTGC	SEQ ID NO:59
60	RS-C 37mero	
	TGCTCTAGATTATCAAAATAAAAACCTGGACCAAAGAC	SEQ ID NO:60

Ejemplo 8

Expresión del Gen de la Rafinosa Sintetasa de Haba en E. coli

El plásmido pBluescriptKS-RS que tenía el gen de la rafinosa sintetasa de haba obtenido en el Ejemplo 7 se digirió con *Bam* HI y *Not* I, y se clonó en el plásmido pGEX-4T3 (Pharmacia) digerido con *Bam* HI y *Not* I para dar el plásmido pGEX-RS como se muestra en la Figura 1.

El plásmido pBluescriptKS-RS se digirió con *Nco* I y *Xba* I, y se clonó en el plásmido pTrc99A (Pharmacia) digerido con *Nco* I y *Xba* I para dar el plásmido pTrc-RS como se muestra en la Figura 1.

Estos plásmidos se introdujeron en la cepa HB101 de *E. coli*, y los transformantes resultantes se utilizaron para la confirmación de la expresión de la rafinosa sintetasa. Los cultivos de los transformantes de una noche se inocularon a un volumen de 1 ml cada uno en 100 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 3 horas, seguido de la adición de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosido) a una concentración final de 1 mM y de una incubación adicional de 5 horas. Los cultivos se centrifugaron a 21.400 x g durante 10 minutos, y se recogieron las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas se almacenaron a -80°C. A las células bacterianas se añadió diez veces el volumen de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, DTT 5 mM (ditiotreitól), PMSF 1 mM (fluoruro de feniltrimetilsulfonilo) y benzamida 1 mM, y las células bacterianas se descongelaron y se suspendieron. Estas suspensiones se trataron con una desorganizador ultrasónico (Branson) para efectuar la desorganización de las células bacterianas. Las mezclas de células desorganizadas obtenidas se centrifugaron a 16.000 x g durante 10 minutos, y se recogieron las soluciones de proteína soluble.

Las soluciones de proteínas obtenidas de este modo se utilizaron a un volumen de 4 μ l cada una para la medida de la actividad de la rafinosa sintetasa según el método descrito antes. La reacción se efectuó a 37°C durante 64 horas. Como control, se utilizó la cepa HB101 de *E. coli* que había sido transformada con uno de los vectores, pGEX-4T3. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La síntesis de la rafinosa se detectó en las muestras de los transformantes HB101 (pGEX-RS) y HB101 (pTrc-RS).

TABLA 1

Transformante	Cantidad de rafinosa producida (pmoles)
HB101 (pGEX4T-3)	0,56
HB101 (pGEX-RS)	10,50
HB101 (pTrc-RS)	11,10

Ejemplo 9

Clonación del Gen de la Rafinosa Sintetasa a partir de ADNc de Soja

De la misma manera que se describe en el Ejemplo 5, se obtuvo ADNc de semillas inmaduras de soja (*Glycine max*) Williams 82. Utilizando este ADNc como molde y los cebadores diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 1, es decir, cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 8 más abajo, se amplificó un fragmento de ADN mediante PCR en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN amplificado de este modo mediante PCR se clonó con un estuche de clonación TA (Invitrogen), seguido de reacción de la secuencia utilizando el ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer y el análisis de la secuencia de nucleótidos con un secuenciador 373S DNA de ABI. Basándose en esta secuencia, se sintetizaron cebadores que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 9 más abajo. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con Marathon Kit de Clontech utilizando el ARNm obtenido de la misma manera que en el Ejemplo 1 a partir de hojas de soja Williams 82. El ADNc obtenido se ligó aun adaptador contenido en este estuche con ligasa. Esta operación se realizó según el protocolo adjunto. Utilizando el ADNc ligado al adaptador preparado de este modo, se efectuó la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores utilizados en la lista 9 más abajo. Las secuencias de nucleótidos de ambas regiones terminales del gen se analizaron según el protocolo adjunto al Marathon Kit de Clontech. Como resultado, se determinó la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 4.

ES 2 276 416 T3

Lista 8

5	cebador 1-F 35mero	
	CGATTIAAIGTITGGTGGACIACICAITGGGTIGG	SEQ ID NO:61
10	cebador 2-RV 45mero	
	GGCCTAIAAIGCITCCCAIGTICACCAICCIAAITTITCIATI AT	SEQ ID NO:62
15	cebador 5-F 41mero	
	CGATGGATGGGIAAITTIATICAICCGAITGGGAIATGTT	SEQ ID NO:63
20	cebador 6-RV 32mero	
	GGCCACATITTIAC (AG) ICCIATIGGIGCIAA	SEQ ID NO:64
25		

Lista 9

30	SN-1 30mero	
	CACGAACTGGGGCAGGACACAGATGATG	SEQ ID NO:65
35	SC-3RV 30mero	
	AAGCAAGTCACGGAGTGTGAATAGTCAGAG	SEQ ID NO:66
40	SC-5 30mero	
	ACACGAGACTGTTTGTGTTGAAGACCCCTTG	SEQ ID NO:67
45	SC-6 25mero	
	TGGAATCTCAACAAATATACAGGTG	SEQ ID NO:68
50	SN-3RV 30mero	
	GGGTCATGGCCAACGTGGACGTATAAGCAC	SEQ ID NO:69
55	SN-4RV 30mero	
	GATGATCACTGGCGCGGTTTTCTCCTCCTCGAG	SEQ ID NO:70

Ejemplo 10

Adquisición del Gen de la Rafinosa Sintetasa a partir de ADNc de alcachofa Japonesa

De la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 5, se obtuvo ADNc de hojas de alcachofa Japonesa (*Stachys sieboldii*). Utilizando esta ADNc como molde y los cebadores diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 1, es decir, los cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 10 más abajo, se amplificó un fragmento de ADN mediante PCR en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN amplificado de este modo mediante PCR se clonó con un estuche de clonación TA (Invitrogen), seguido de reacción

ES 2 276 416 T3

de la secuencia utilizando el ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer y el análisis de la secuencia de nucleótidos con un secuenciador 373S DNA de ABI. Como resultado, se determinó la secuencia del SEC ID NO: 6.

- 5 Basándose la secuencia de nucleótidos obtenida de este modo, se prepararon los cebadores de ADN sintetizado, y de la misma manera que se describe en el Ejemplo 9, se analizan las secuencias de nucleótidos en ambas regiones terminales del gen con el Marathon Kit de Clontech.

Lista 10

10	cebador 1-F 35mero	
15	CGATTIAAIGTITGGTGGACIACICAITGGGTIGG	SEQ ID NO: 71
	cebador 4-RV 37mero	
20	GGCCAGCIATIAICICCTTICCTTIAAITGITTITT	SEQ ID NO: 72
	cebador 2-F 44mero	
25	CGAATIATIGAIAAITTIGGITGGTGIACITGGGAIGCITTITA	SEQ ID NO: 73
	cebador 6-RV 32mero	
30	GGCCACATITTTIACIA (AG) ICCIATIGGIGCIAA	SEQ ID NO: 74

Ejemplo 11

35 Adquisición del Gen de la Rafinosa Sintetasa a partir de ADNc

De la misma manera que se describe en el Ejemplo 5, se obtuvo ADNc a partir de hojas de maíz (*Zea mays*) Pioneer 3358. Utilizando este ADNc como molde y los cebadores diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 1, es decir, cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 11 más abajo, se amplió un fragmento de ADN mediante PCR en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. El fragmento de ADN amplificado de este modo mediante PCR se clonó con un estuche de clonación TA (Invitrogen), seguido de reacción de la secuencia utilizando el ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer y el análisis de la secuencia de nucleótidos con un secuenciador 373S DNA de ABI. Basándose en esta secuencia, se sintetizaron cebadores que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en el lista 12 más abajo. De la misma manera que se describe en el Ejemplo 5, se conectó el ARNm obtenido de hojas de maíz (*Zea mays*) Pioneer 3358 con un adaptador contenido en el Marathon Kit de Clontech con ligasa. Esta operación se realizó según el protocolo adjunto. Utilizando el ADNc ligado al adaptador preparado de este modo, se efectuó la reacción en cadena de la polimerasa de la misma manera que se ha descrito antes con los cebadores mostrados en la lista 12 más abajo. Como resultado, se determinó la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 8.

50 Basándose en la secuencia de nucleótidos obtenida de esta modo, se preparan cebadores de ADN sintetizados, y de la misma manera que se describe en el Ejemplo 9, se analiza la secuencia de nucleótidos de la región 5'-terminal con el Marathon Kit of Clontech.

55 Lista 11

60	cebador 5-F 41 mero	
	CGATGGATGGGIAAITTTIATICAICCAITGGGAIATGTT	SEQ ID NO: 75
	cebador 6-RV 32mero	
65	GGCCACATITTTIACIA (AG) ICCIATIGGIGCIAA	SEQ ID NO: 76

ES 2 276 416 T3

Lista 12

5	cebador M-10 25mero	
	GACGTCGAGTGGAAGAGCGGCAAGG	SEQ ID NO:77
10	cebador M-11 25mero	
	CACCTACGAGCTCTTCGTCGTTGCC	SEQ ID NO:78

Ejemplo 12

Construcción de Vectores de Expresión en Plantas para Genes Mixtos, Gen de la Rafinosa Sintetasa de Haba 35S

El plásmido pBluescriptKS-RS que tenía el gen de la rafinosa sintetasa de haba obtenido en el Ejemplo 7 se digirió con las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Sac* I. Utilizando el Ligation Kit (Takara), el fragmento de ADN digerido de este modo se clonó en el vector binario Pbi121 (Clontech) previamente digerido con *Bam* HI y *Sac* I. El vector obtenido de este modo se designó pBI121-RS.

Para un experimento antisentido, se ligó el plásmido pBI121 (Clontech) previamente digerido con *Bam* HI y *Sac* I con los conectores mostrados en la lista 13 más abajo para dar pBI121(-). Este pBI121(-) se utilizó para preparar pBI121(-)RS de la misma manera que se ha descrito para la preparación de pBI121-RS antes.

Se preparó un vector similar con pBI221. El plásmido pBluescriptKS-RS obtenido en el Ejemplo 7 se digirió con las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Sac* I. Utilizando el Ligation Kit (Takara), se clonó el fragmento de ADN digerido de este modo en el vector pNI221 (Clontech) previamente digerido con *Bam* HI y *Sac* I. El vector obtenido de este modo se designó pBI221-RS.

Para un experimento antisentido, se ligó el plásmido pBI221 (Clontech) previamente digerido con *Bam* HI y *Sac* I a los conectores mostrados en la lista 13 más abajo para dar pBI221(-). Este pBI221(-) se utilizó para preparar pBI221(-)RS de la misma manera que se descrito para la preparación de pBI221-RS anterior.

La construcción de estos vectores de expresión se muestra en las Figuras 2 y 3.

Lista 13

40	conector BamSac-(+) 25mero	
45	GATCGAGCTCGTGTCTGGATCCAGCT	SEQ ID NO: 79
	conector BamSac-(-) 17mero	
50	GGATCCGACACGAGCTC	SEQ ID NO :80

Ejemplo 13

Transformación de Mostaza con el Gen de la Rafinosa Sintetasa de Haba

Se utilizaron los vectores pBI121-RS y pBI121(-)RS preparados en el Ejemplo 12 para la transformación de mostaza (*Brassica juncia*) mediante el método de infección con *Agrobacterium*.

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1, resistente a rifampicina) que se había hecho pasar previamente a un estado competente mediante tratamiento con cloruro de calcio independientemente con dos plásmidos pBI121-RS y pBI121(-)RS preparados en el Ejemplo 12. Se llevó a cabo la selección de los transformantes en medio LV que contenía 50 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml de kanamicina utilizando el carácter de resistencia a kanamicina conferido por el gen de resistencia a la kanamicina (neomicin fosfotransferasa, NPTII) de los plásmidos introducidos.

El *Agrobacterium* transformante obtenido (cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, resistente a rifampicina) se cultivó sobre medio LB que contenía 50 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml de kanamicina a 28°C durante un día y una noche completos, y se utilizó el cultivo para la transformación de la mostaza mediante el método descrito más abajo.

ES 2 276 416 T3

Las semillas de mostaza se sembraron asépticamente en medio 1/2 MS, sacarosa al 2%, agar al 0,7%. Al cabo de una semana, se cortaron los cotiledones y los pecíolos de las plantas con retoños con un escalpelo, y se transfirieron a medio MS, sacarosa al 3%, agar al 0,7%, MBA 4,5 μ M, 2,4-D 0,05 μ M, AgNO₃ 3,3 μ M, seguido de cultivo previo durante 1 día. Los cotiledones y los pecíolos precultivados se transfirieron a una dilución a la milésima del cultivo de Agrobacterium para causar la infección durante 5 minutos. Los cotiledones y los pecíolos infectados se transfirieron de nuevo al mismo medio y se utilizaron en el cultivo previo, y se cultivaron durante 3 a 4 días. Los cotiledones y pecíolos cultivados se transfirieron a medio MS, sacarosa al 3%, BA 4,5 μ M, 2,4-D 0,05 μ M, AgNO₃ 3,3 μ M, 500 mg/litro de cefotaxim, y se esterilizaron con sacudimiento durante 1 día. Los cotiledones y pecíolos esterilizados se transfirieron a medio MS, sacarosa al 3%, agar al 0,7%, BA 4,5 μ M, 2,4-D 0,05 μ M, AgNO₃ 3,3 μ M, 100 mg/litro de cefotaxim, 20 mg/litro de kanamicina, y se cultivaron durante 3 a 4 semanas. Los cotiledones y pecíolos se transfirieron a medio MS, sacarosa al 3%, agar al 0,7%, BA 4,5 μ M, 2,4-D 0,05 μ M, 100 mg/litro de cefotaxim, 20 mg/litro de kanamicina, y se cultivaron. El cultivo de este medio continuó con subcultivos a intervalos de 3 a 4 semanas. Cuando se empezaba a producir la regeneración de los vástagos, estos vástagos se subcultivaron en medio MS, sacarosa al 3%, agar al 0,7%, 20 mg/litro de kanamicina, y se cultivaron durante 3 a 4 semanas. Las plantas arraigadas se transfirieron a vermiculita:esfagno = 1:1, y se acondicionaron de 21°C a 22°C en un ciclo de día/noche = 12 horas:12 horas. Con el progreso del crecimiento del cuerpo vegetal, las plantas se hicieron crecer adecuadamente tierra de cultivo. De las hojas de las plantas regeneradas, se extrajo ADN genómico según el método descrito antes, y se confirmó la inserción del gen en el genoma de la planta mediante PCR utilizando los cebadores mostrados en la lista 14 más abajo.

20 Lista 14

	35S 30mero		
25	<table border="1"> <tr> <td>TTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTC</td><td>SEQ ID NO: 81</td></tr> </table>	TTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTC	SEQ ID NO: 81
TTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTC	SEQ ID NO: 81		
	NOS 25mero		
30	<table border="1"> <tr> <td>ATGTATAATTGCGGGACTCTAATCA</td><td>SEQ ID NO: 82</td></tr> </table>	ATGTATAATTGCGGGACTCTAATCA	SEQ ID NO: 82
ATGTATAATTGCGGGACTCTAATCA	SEQ ID NO: 82		
	RS-F 30mero		
35	<table border="1"> <tr> <td>AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG</td><td>SEQ ID NO: 83</td></tr> </table>	AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG	SEQ ID NO: 83
AAGAGTGTATCTGAATTTTCACGCGCGGTG	SEQ ID NO: 83		
	RS-RV 33mero		
40	<table border="1"> <tr> <td>ACCTTCCCATACACCTTTTGGATGAACCTTCAA</td><td>SEQ ID NO: 84</td></tr> </table>	ACCTTCCCATACACCTTTTGGATGAACCTTCAA	SEQ ID NO: 84
ACCTTCCCATACACCTTTTGGATGAACCTTCAA	SEQ ID NO: 84		

Ejemplo 14

45 Transformación de Embriones Somáticos de Soja con el Gen de la Rafinosa Sintetasa de Haba

Se dispusieron células cultivadas de embriones somáticos de soja "Fayette" (400 a 500 mg FW) en una capa dentro de un círculo que tenía un diámetro de 20 mm en la parte central de una placa de agar de 6 cm. Se introdujeron dos plásmidos pBI221-RS y pBI221(-)-RS que tenían genes mixtos preparados a partir del gen de la rafinosa sintetasa de haba y promotor 35S en el Ejemplo 12 en los embriones somáticos de soja según la descripción de la Solicitud de Patente Japonesa Núm. 3-291501/1991. Esto es, se mezclaron estos plásmidos con el vector de coexpresión de β -glucuronidasa (GUS)/gen resistente a la higromicina (HPT) pSUM-GH:NotI para la selección descrito en Soshiki Baiyo, 20, 323-327 (1994). Estos plásmidos mixtos se utilizaron para la introducción del gen en embriones somáticos de soja con una pistola de partículas (800 mg/partículas de oro de recubrimiento 200 μ g/disparo; distancia del tapón del proyectil-muestra, 100 mm). Después de la introducción, se hicieron crecer cultivos giratorios en el medio líquido de crecimiento modificado MS (Sigma) que contenía de 25 a 50 μ g/ml de higromicina con iluminación a 25°C durante 16 horas, y se seleccionaron los embriones somáticos transformados.

Para los embriones somáticos de soja resistentes a la higromicina que tenían un color verde amarillento y capacidad de crecer, que se habían seleccionado después de aproximadamente 3 meses, se efectúa una reacción en cadena por polimerización con los cebadores mostrados en la lista 14 anterior para determinar si la región del gen de la rafinosa sintetasa de haba se ha amplificado o no. Esto confirma que el gen de la rafinosa sintetasa de haba está insertado en el genoma de la soja.

Además, se utilizan los embriones somáticos obtenidos para la regeneración de plantas para dar soja transformante con el gen de la rafinosa sintetasa de haba.

ES 2 276 416 T3

Composición del Medio

Los medios LB y MS utilizados en los Ejemplos anteriores tienen las siguientes composiciones respectivas.

Medio LB

Bacto-triptona	10 g	
Bacto-extracto de levadura	5 g	
NaCl	10 g	/ 1 litro H ₂ O (pH 7.0)

Medio MS

KNO ₃	2022 mg/l
NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
NH ₄ Cl	2140 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025 mg/l
KI	0,83 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025 mg/l
H ₃ BO ₃	6,2 mg/l
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 mg/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8 mg/l
Na ₂ EDTA	37,3 mg/l
Acido Nicotínico	0,5 mg/l
Tiamina HCl	1 mg/l
Piridoxina HCl	0,5 mg/l
Inositol	100 mg/l
Glicina	2 mg/l

ES 2 276 416 T3

Breve Descripción de las Secuencias

1. SEQ ID NO: 1

5 La secuencia del SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína rafinosa sintetasa codificada en el gen de la rafinosa sintetasa obtenido de haba.

2. SEQ ID NO: 2

10 La secuencia del SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de nucleótidos de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa obtenido de haba.

3. SEQ ID NO: 3

15 La secuencia del SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína rafinosa sintetasa codificada en el gen de la rafinosa sintetasa obtenido de la soja.

4. SEQ ID NO: 4

20 La secuencia del SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de nucleótidos de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa obtenido de la soja.

5. SEQ ID NO: 5

25 La secuencia del SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína rafinosa sintetasa codificada en el gen de la rafinosa sintetasa obtenido de la alcachofa Japonesa.

6. SEQ ID NO: 6

30 La secuencia del SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de ADNc de nucleótidos del gen de la rafinosa sintetasa obtenido de la alcachofa Japonesa.

7. SEQ ID NO: 7

35 La secuencia del SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína rafinosa sintetasa codificada en el gen de la rafinosa sintetasa obtenido del maíz.

8. SEQ ID NO: 8

40 La secuencia del SEQ ID NO: 8 muestra una secuencia de ADNc de nucleótidos del gen de la rafinosa sintetasa obtenido del maíz.

9. Lista 1

45 Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 1 son los cebadores típicos utilizados en la amplificación de un fragmento de ADNc de un gen de rafinosa sintetasa. Todas estas secuencias se basan en la secuencia de nucleótidos de la región no codificadora del gen. El cebador 1 es un cebador efector correspondiente al extremo 5' de un fragmento de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa derivado de haba. Los cebadores 2 y 3 son cebadores antisentido correspondientes al extremo 3' del fragmento de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa derivado de haba. El cebador 4 es un
50 cebador efector correspondiente al extremo 5' de un fragmento de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa derivado de soja. Los cebadores 5 y 6 son cebadores antisentido correspondientes al extremo 3' del fragmento de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa derivado de soja. Dependiendo del propósito, se pueden añadir las secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción adecuadas a los extremos 5' de estas secuencias de nucleótidos de una manera apropiada.

55 10. Lista 2

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 2 son de los cebadores típicos utilizados en la amplificación de un marco de lectura abierto que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína rafinosa sintetasa en la secuencia
60 de ADNc de un gen de rafinosa sintetasa. Los cebadores 1 y 2 son cebadores efectores correspondientes al extremo N de la proteína rafinosa sintetasa derivada de haba. Los cebadores 3 y 4 son cebadores antisentido correspondientes al extremo C de la proteína rafinosa sintetasa derivada de haba. Los cebadores 5 y 6 son cebadores efectores correspondientes al extremo N de la proteína rafinosa sintetasa derivada de soja. Los cebadores 7 y 8 son cebadores antisentido correspondientes al extremo C de la proteína rafinosa sintetasa derivada de soja. Dependiendo del propósito, se pueden
65 añadir secuencias de reconocimiento para endonucleasas adecuadas a los extremos 5' de estas secuencias de una manera apropiada.

ES 2 276 416 T3

11. Lista 3

Las secuencias de aminoácidos mostradas en la lista 3 son secuencias de aminoácidos parciales de una proteína rafinosa sintetasa.

El Núm. 1 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 110 al aminoácido 129 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 2 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 234 al aminoácido 247 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 3 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 265 al aminoácido 279 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 4 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 296 al aminoácido 312 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 5 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 346 al aminoácido 361 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 6 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 383 al aminoácido 402 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 7 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 411 al aminoácido 433 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 8 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 440 al aminoácido 453 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 9 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 457 al aminoácido 468 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 10 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 471 al aminoácido 516 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 11 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 517 al aminoácido 559 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 12 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 574 al aminoácido 582 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 13 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 586 al aminoácido 609 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 14 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 615 al aminoácido 627 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

El Núm. 15 es equivalente a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 716 al aminoácido 724 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

12. Lista 4

Las secuencias de aminoácidos mostradas en la lista 4 son de los cebadores típicos sintetizados en algunas de las secuencias de aminoácidos mostradas en la lista 3. El símbolo "F" utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia efectora. El símbolo "RV" utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido. El cebador 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 119 al aminoácido 129 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1. El cebador 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 234 al aminoácido 247 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1. El cebador 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 265 al aminoácido 279 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1. El cebador 4 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 458 al aminoácido 468 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1. El cebador 5 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 522 al aminoácido 534 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1. El cebador 6 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial que se extiende desde el aminoácido 716 al aminoácido 724 de la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1.

ES 2 276 416 T3

13. Lista 5

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 5 son de los cebadores típicos sintetizados en secuencias de aminoácidos parciales de la proteína rafinosa sintetasa de haba purificada. Las bases mostradas entre paréntesis significan que se utilizó una mezcla de aquellas bases en la síntesis. El símbolo “RV” utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

14. Lista 6

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 6 son de los cebadores típicos utilizados en el análisis de ambas regiones terminales de una secuencia de nucleótidos de ADNc del gen de la rafinosa sintetasa de haba mediante el método RACE. El símbolo “RV” utilizado después del número de cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

15. Lista 7

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 7 son de los cebadores típicos utilizados en la clonación del gen de la rafinosa sintetasa de haba. RS-N corresponde al extremo N del marco de lectura abierto y contiene dos sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *Xba* I del lado 5'-terminal.

16. Lista 8

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 8 son de los cebadores típicos utilizados en la clonación de un fragmento del gen de la rafinosa sintetasa de soja. La base representada por el símbolo “I” era la inosina utilizada en la síntesis. El símbolo “RV” utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

17. Lista 9

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 9 son de los cebadores típicos utilizados en el análisis de la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen de la rafinosa sintetasa de soja. El símbolo “RV” utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

El análisis de las secuencias de nucleótidos se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando SN-1 y SC-3RV. Se utilizaron SC-5 y SC-6 en el análisis de una secuencia de nucleótidos en la región 3'-terminal, y se utilizaron SN-3RV y SN-4RV en el análisis de una secuencia de nucleótidos en la región 5'-terminal.

18. Lista 10

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 10 son de los cebadores típicos utilizados en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNc de un fragmento del gen de la rafinosa sintetasa de alcachofa Japonesa. La base representada por el símbolo “I” era la inosina utilizada en la síntesis. El símbolo “RV” utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

19. Lista 11

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 11 son de los cebadores típicos utilizados en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNc de un fragmento del gen de la rafinosa sintetasa de maíz. La base representada por el símbolo “I” era la inosina utilizada en la síntesis. El símbolo “RV” utilizado después del número del cebador significa que el cebador referido por este símbolo tiene una secuencia antisentido.

20. Lista 12

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 12 son de los cebadores típicos utilizados en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNc de un fragmento del gen de la rafinosa sintetasa de maíz. Se utilizaron M-10 y M-11 en el análisis de una secuencia de nucleótidos en la región 3'-terminal.

21. Lista 13

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 13 son de los adaptadores típicos utilizados en la construcción de vectores para experimentos antisentido. Estos fragmentos de ADN sintético adoptan una doble forma cuando se mezclan entre sí porque son hebras complementarias. Este fragmento de ADN bicatenario tiene extremos cohesivos de los sitios de escisión para las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Sac* I en ambos extremos, y contiene los sitios de restricción para las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Sac* I en la región bicatenaria.

ES 2 276 416 T3

22. Lista 14

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la lista 14 son de los cebadores típicos utilizados en el experimento de PCR para confirmar la introducción del gen en el genoma de una planta recombinante. 35S es un cebador hacia la región aguas abajo en el sitio del promotor 35S, y NOS es un cebador hacia la región aguas arriba en el sitio del terminador NOS. RS-F es un cebador efector del gen de la rafinosa sintetasa de haba, y RS-RV es un cebador antisentido del gen de la rafinosa sintetasa de haba.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una rafinosa sintetasa vegetal que es capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo por medio de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono en la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa, donde dicha molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por:
 - 10 (a) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por el SEC ID NUM: 3, SEC ID NUM: 5, y SEC ID NUM: 7;
 - (b) moléculas de ácido nucleico que comprenden la región codificadora de la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por el SEC ID NUM: 4, SEC ID NUM: 6, y SEC ID NUM: 8;
 - 15 (c) moléculas de ácido nucleico que hibridan con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico indicada en (a) o (b), en condiciones restrictivas, donde la planta es una planta leguminosa, una planta lamiácea o una monocotiledónea;
 - (d) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de (a) a (c) debido a la degeneración del código genético;
 - 20 (e) un fragmento de una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de uno cualquiera de (a) a (d) que codifica una proteína capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo por medio de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa;
 - 25 (f) moléculas de ácido nucleico de (d) o (e) donde la planta es una planta leguminosa, una planta lamiácea, o una monocotiledónea;
 - 30 (g) moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos del SEC ID NUM: 1;
 - (h) moléculas de ácido nucleico que comprenden la región codificadora de la secuencia de nucleótidos del SEC ID NUM: 2;
 - 35 (i) moléculas de ácido nucleico que hibridan con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico indicada en (g) o (h), en condiciones restrictivas;
 - (j) un fragmento de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de uno cualquiera de (g) a (i) que codifica una proteína capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo por medio de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa; y
 - 40 (k) moléculas de ácido nucleico de (i) o (j), donde la planta es una planta leguminosa.
- 45 2. Las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde la planta leguminosa es una planta de haba o de soja.
3. Las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde la planta lamiácea es una alcachofa Japonesa.
- 50 4. Las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde la monocotiledónea es una planta gramínea.
5. Las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 4, donde la planta gramínea es el maíz.
- 55 6. Una molécula de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, conectada funcionalmente a un promotor.
7. Un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 opcionalmente en una combinación funcional con un promotor, o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.
- 60 8. Un organismo huésped que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o el plásmido de la reivindicación 7.
9. El organismo huésped de la reivindicación 8 que es un microorganismo, una célula vegetal o una planta.
- 65 10. Un método para la producción de una proteína rafinosa sintetasa o una porción de la misma, que comprende las etapas de aislar y purificar una proteína rafinosa sintetasa o una porción de la misma de un cultivo obtenido cultivando el organismo huésped de la reivindicación 8 o 9.

ES 2 276 416 T3

11. Una proteína rafinosa sintetasa aislada codificada por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

12. Una molécula de ácido nucleico antisentido o una ribozima que hibrida o se une específicamente a una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

13. Un método para modificar el metabolismo de un organismo huésped, que comprende introducir la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 6 o una molécula de ácido nucleico antisentido o una ribozima de la reivindicación 12 en dicho organismo huésped o una célula del mismo, de manera que cambie el contenido de oligosacáridos de la familia de la rafinosa en dicho organismo huésped o célula del mismo.

14. Una proteína rafinosa sintetasa aislada que es capaz de producir rafinosa combinando un grupo D-galactosilo por medio de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ con un grupo hidroxilo anclado al átomo de carbono de la posición 6 de un resto D-glucosa en una molécula de sacarosa, donde dicha proteína está relacionada con la proteína rafinosa sintetasa del SEC ID NUM: 1 o el SEC ID NUM:3, mediante delección, sustitución, modificación o adición de un aminoácido.

15. Un anticuerpo anti-rafinosa sintetasa capaz de unirse específicamente a la proteína rafinosa sintetasa de la reivindicación 11 o 14.

16. El uso de un anticuerpo anti-rafinosa sintetasa de la reivindicación 15 para la detección de una proteína rafinosa sintetasa.

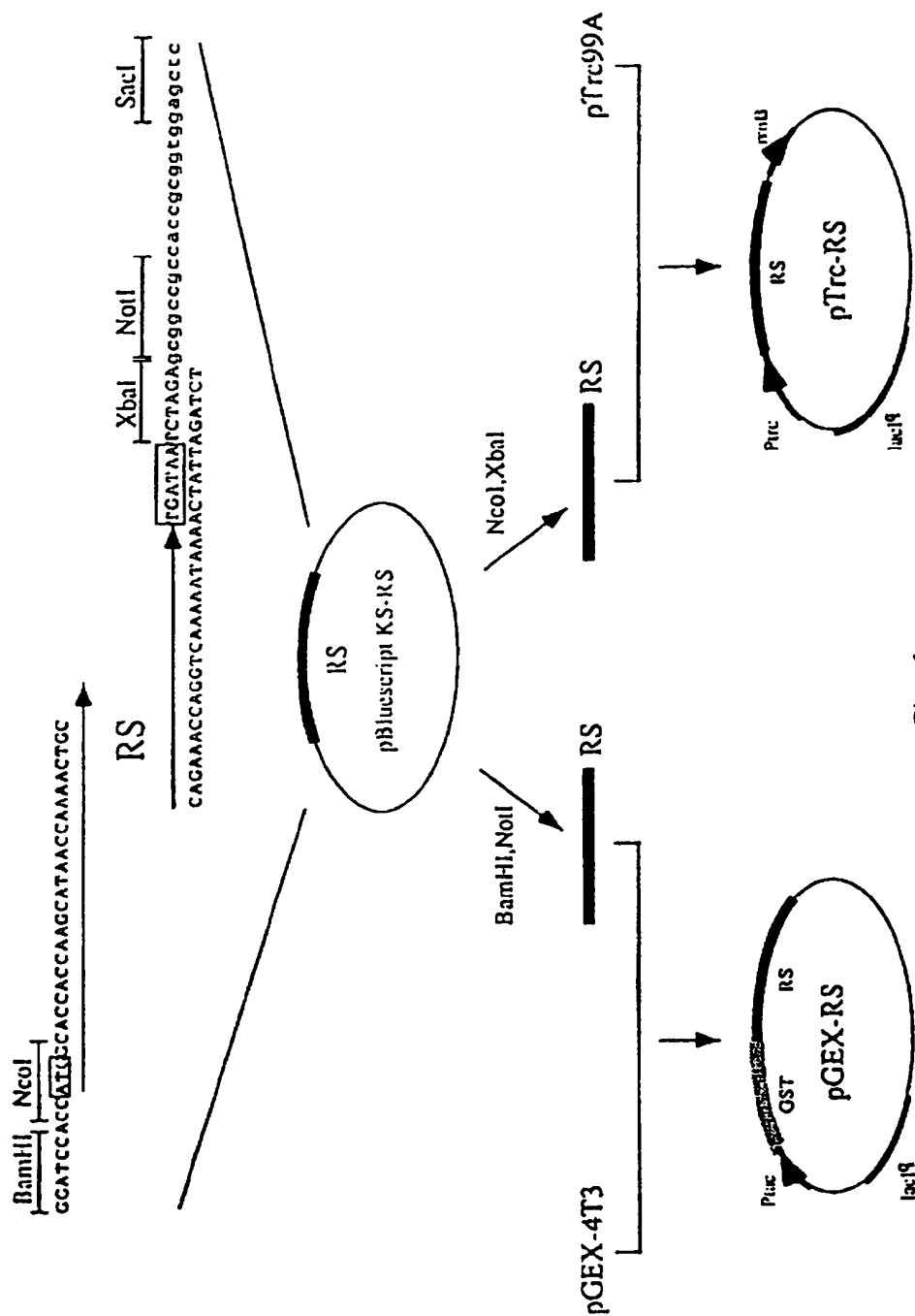


Fig. 1

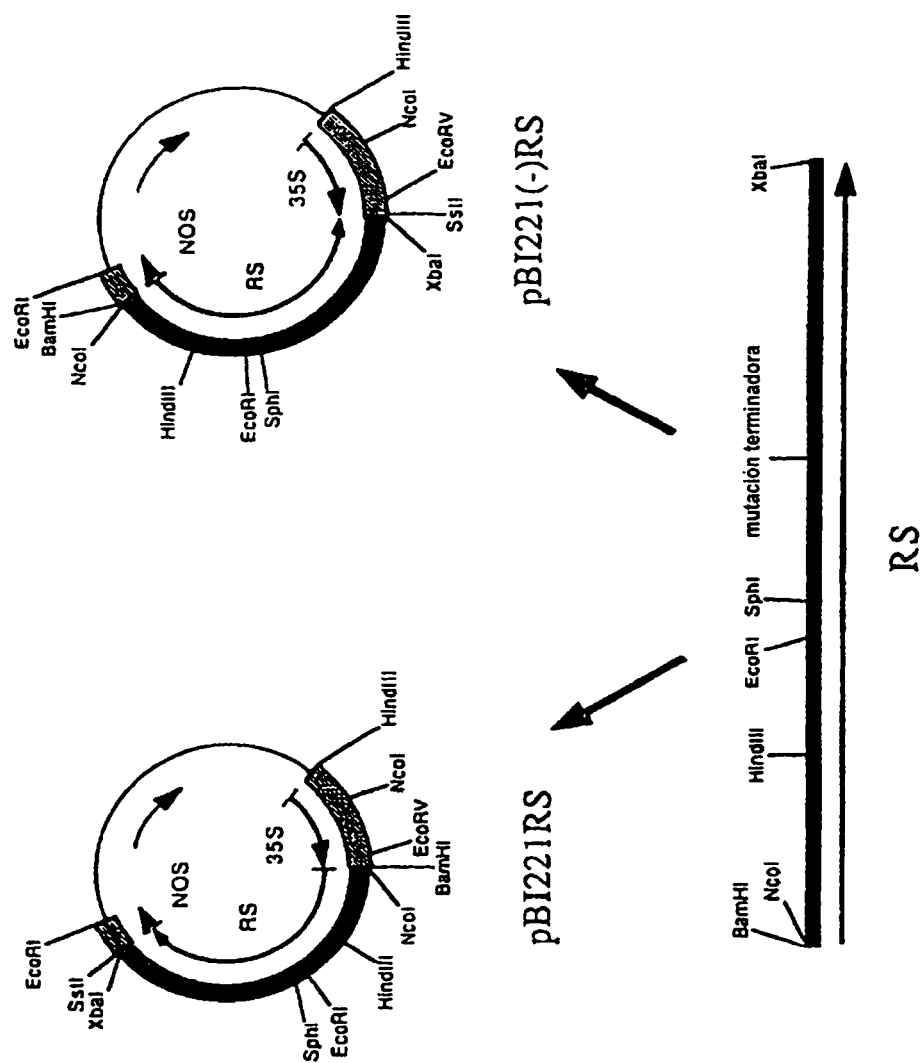


Fig. 2

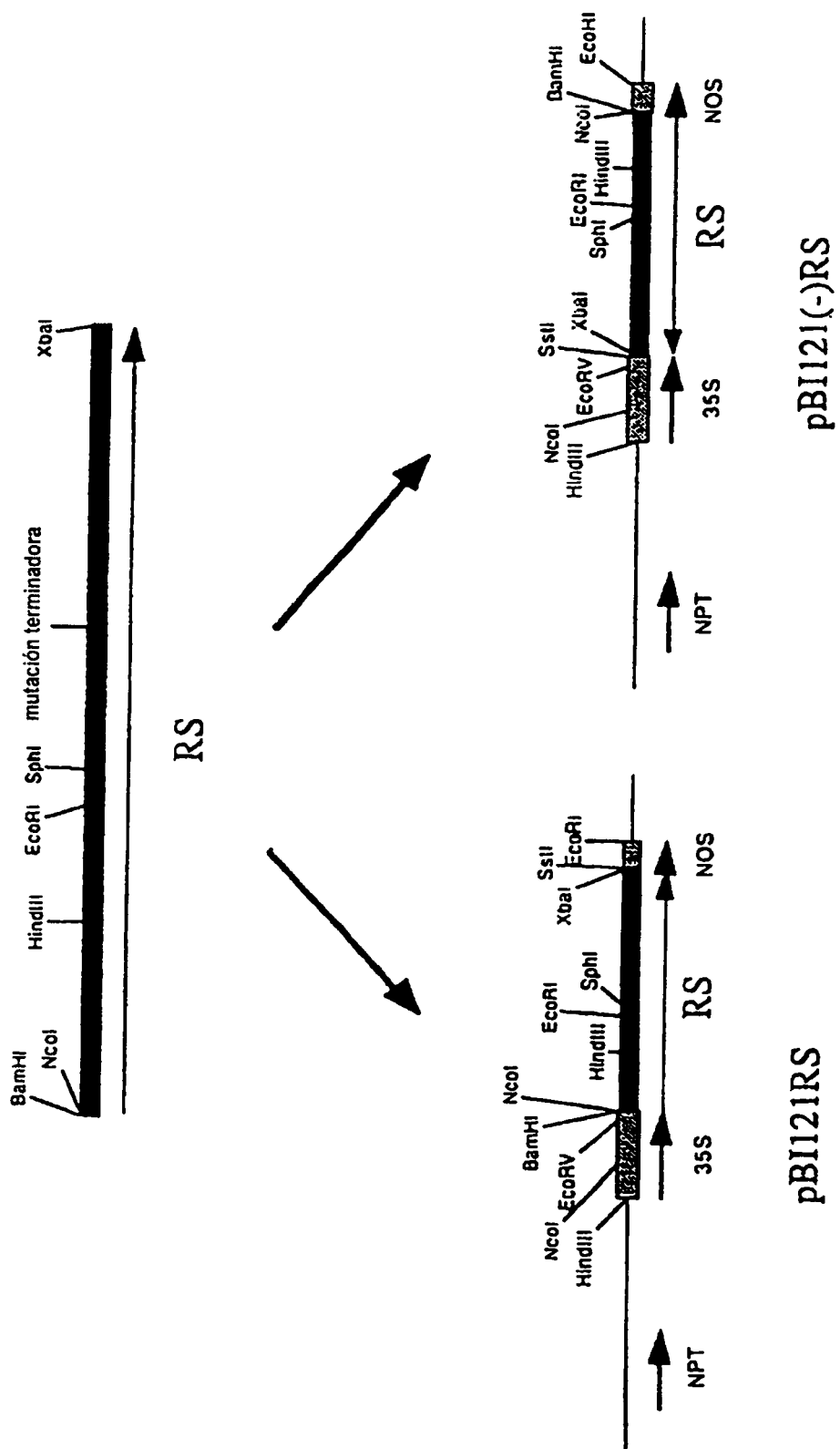


Fig. 3

ES 2 276 416 T3

LISTA DE SECUENCIAS

NUMERO DE SECUENCIAS: 8

5 (1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 799 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: haba (*Vicia faba*)

(B) CEPa: Nintoku Issun

20

(F) TIPO DE TEJIDO: semillas

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

25

Met Ala Pro Pro Ser Ile Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gln Asp Val Ile
1 5 10 15

Ser Thr Ile Asp Ile Gly Asn Gly Asn Ser Pro Leu Phe Ser Ile Thr
20 25 30

Leu Asp Gln Ser Arg Asp Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr
35 40 45

30

Gln Val Pro Pro Asn Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ser
50 55 60

Phe Leu Asn Leu Lys Ser Asn Lys Asp Thr Ile Pro Asn Asn Asn Asn
65 70 75 80

35

Thr Met Leu Leu Gln Gln Gly Cys Phe Val Gly Phe Asn Ser Thr Glu
85 90 95

Pro Lys Ser His Val Val Pro Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile Lys
100 105 110

Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val
115 120 125

40

Gly Thr Asn Gly Gln Glu Leu Gln His Glu Thr Gln Met Leu Ile Leu
130 135 140

Asp Lys Asn Asp Ser Leu Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Ile
145 150 155 160

45

Leu Glu Asn Thr Phe Arg Thr Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asn Asp His
165 170 175

Ile Gly Met Ser Val Glu Ser Gly Ser Thr His Val Thr Gly Ser Ser
180 185 190

Phe Lys Ala Cys Leu Tyr Ile His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile
195 200 205

50

Leu Lys Glu Ala Val Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys
210 215 220

Thr Leu Glu Glu Lys Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp
225 230 235 240

55

Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp
245 250 255

60

65

ES 2 276 416 T3

Glu Gly Val Lys Ser Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val
 260 265 270
 Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Glu
 275 280 285
 Asp Asp Ser Gly Met Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys
 290 295 300
 Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn
 305 310 315
 Pro Glu Asn Gly Gly Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu
 320 325 330 335
 Lys Glu Glu Phe Gly Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu
 340 345 350
 Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys
 355 360 365
 Ala Arg Val Val Val Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met
 370 375 380
 Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val
 385 390 395 400
 Pro Pro Asp Phe Ala His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu
 405 410 415
 Glu Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu
 420 425 430
 Glu Leu Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala
 435 440 445
 Tyr Tyr Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn
 450 455 460
 Gly Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly
 465 470 475 480
 Thr Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser
 485 490 495
 Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His
 500 505 510
 Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln
 515 520 525
 Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His
 530 535 540
 Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys
 545 550 555 560
 Val Gly Asn His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp
 565 570 575
 Gly Ser Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys
 580 585 590
 Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp
 595 600 605
 Asn Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly
 610 615 620
 Gly Gly Trp Cys Pro Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe
 625 630 635 640
 Ser Arg Ala Val Thr Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys
 645 650 655
 Asn Gly Lys Thr Pro Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val
 660 665 670
 Tyr Phe Phe Lys Glu Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg
 675 680 685

ES 2 276 416 T3

	Leu	Lys	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Phe	Ser	Phe	Glu	Leu	Met	Thr	Val	Ser	
	690						695					700					
5	Pro	Val	Lys	Val	Phe	Ser	Lys	Arg	Phe	Ile	Gln	Phe	Ala	Pro	Ile	Gly	
	705					710				715						720	
	Leu	Val	Asn	Met	Leu	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Phe	
					725					730					735		
	Asp	Asp	Asn	Ala	Ser	Leu	Val	Lys	Ile	Gly	Val	Arg	Gly	Cys	Gly	Glu	
				740						745				750			
10	Met	Ser	Val	Phe	Ala	Ser	Glu	Lys	Pro	Val	Cys	Cys	Lys	Ile	Asp	Gly	
		755						760					765				
	Val	Lys	Val	Lys	Phe	Leu	Tyr	Glu	Asp	Lys	Met	Ala	Arg	Val	Gln	Ile	
		770					775					780					
15	Leu	Trp	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Val	Gln	Phe	Leu	Phe	Stop	
	785					790					795					800	

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2746 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 - (B) LOCALIZACIÓN: 101..2500
 - (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimento
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

	AATTTTCAAG	CATAGCCAAG	TTAACCACCT	TAGAACATT	CCTACAAGCT	ACTTATCCCT	60
40	GTCAATAAGC	TACTAAGCTA	CCAGAGTCTC	ATCAATCACC	ATG GCA CCA CCA AGC	115	
					Met Ala Pro Pro Ser	5	
	ATA ACC AAA ACT GCA ACC CTC CAA GAC GTA ATA AGC ACC ATC GAT ATT	163					
45	Ile Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gln Asp Val Ile Ser Thr Ile Asp Ile						
		10		15		20	
	GGT AAT GGT AAC TCA CCC TTA TTC TCC ATA ACC TTA GAC CAA TCA CGT	211					
	Gly Asn Gly Asn Ser Pro Leu Phe Ser Ile Thr Leu Asp Gln Ser Arg						
		25		30		35	
50	GAC TTC CTT GCA AAT GGC CAC CCT TTC CTC ACC CAA GTC CCA CCT AAC	259					
	Asp Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr Gln Val Pro Pro Asn						
		40		45		50	
	ATA ACA ACA ACA ACA ACC ACT GCT TCC TCT TTT CTC AAT CTC AAA	307					
	Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ser Phe Leu Asn Leu Lys						
		55		60		65	
55	TCC AAC AAA GAT ACC ATT CCC AAC AAC AAC ACC ATG TTG TTG CAA	355					
	Ser Asn Lys Asp Thr Ile Pro Asn Asn Asn Asn Thr Met Leu Leu Gln						
		70		75		80	
	CAA GGT TGT TTC GTT GGT TTC AAC TCC ACC GAA CCC AAA AGC CAC CAC	403					
	Gln Gly Cys Phe Val Gly Phe Asn Ser Thr Glu Pro Lys Ser His His						
60		90		95		100	

ES 2 276 416 T3

	GTA GTT CCA CTC GGC AAA CTA AAA GGA ATC AAA TTC ATG AGC ATA TTC	451
	Val Val Pro Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile Lys Phe Met Ser Ile Phe	
	105 110 115	
5	CGG TTC AAA GTT TGG TGG ACA ACT CAC TGG GTC GGA ACA AAT GGA CAG	499
	Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Thr Asn Gly Gln	
	120 125 130	
	GAA CTA CAA CAC GAA ACA CAA ATG TTA ATC CTG GAC AAA AAC GAC TCC	547
10	Glu Leu Gln His Glu Thr Gln Met Leu Ile Leu Asp Lys Asn Asp Ser	
	135 140 145	
	CTC GGA CGA CCC TAT GTC TTA CTC CTC CCA ATC CTA GAA AAC ACC TTC	595
	Leu Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Ile Leu Glu Asn Thr Phe	
	150 155 160 165	
15	CGA ACC TCA CTC CAA CCC GGT CTC AAC GAT CAC ATA GGC ATG TCC GTC	643
	Arg Thr Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asn Asp His Ile Gly Met Ser Val	
	170 175 180	
	GAA AGC GGT TCA ACA CAT GTC ACC GGG TCA AGC TTC AAA GCA TGT CTT	691
	Glu Ser Gly Ser Thr His Val Thr Gly Ser Ser Phe Lys Ala Cys Leu	
	185 190 195	
20	TAC ATC CAT CTC AGT AAC GAC CCA TAC AGT ATA CTA AAA GAA GCA GTT	739
	Tyr Ile His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile Leu Lys Glu Ala Val	
	200 205 210	
	AAA GTA ATC CAA ACT CAG TTA GGA ACA TTC AAG ACT CTT GAA GAA AAA	787
25	Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys Thr Leu Glu Glu Lys	
	215 220 225	
	ACA GCA CCT AGT ATT ATA GAC AAA TTC GGT TGG TGC ACG TGG GAT GCT	835
	Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala	
	230 235 240 245	
	TTT TAC TTG AAG GTT CAT CCA AAA GGT GTA TGG GAA GGT GTA AAG TCT	883
30	Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp Glu Gly Val Lys Ser	
	250 255 260	
	CTC ACA GAT GGT GGT TGT CCT CCC GGT TTC GTC ATA ATC GAC GAC GGT	931
	Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val Ile Ile Asp Asp Gly	
	265 270 275	
35	TGG CAA TCC ATT TGT CAT GAC GAT GAC GAT GAA GAT GAT TCA GGA ATG	979
	Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Glu Asp Asp Ser Gly Met	
	280 285 290	
	AAC CGA ACC TCA GCC GGG GAA CAA ATG CCA TGC AGA CTT GTA AAA TAC	1027
	Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Val Lys Tyr	
	295 300 305	
40	GAA GAG AAT TCT AAG TTT AGA GAA TAT GAG AAT CCT GAA AAT GGA GGG	1075
	Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn Pro Glu Asn Gly Gly	
	310 315 320 325	
	AAG AAA GGT TTG GGT GGT TTT GTG AGG GAT TTG AAG GAA GAG TTT GGG	1123
45	Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu Glu Phe Gly	
	330 335 340	
	AGT GTG GAG AGT GTT TAT GTT TGG CAT GCG CTT TGT GGG TAT TGG GGC	1171
	Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp Gly	
	345 350 355	
	GGG GTT AGG CCT GGA GTG CAT GGG ATG CCG AAA GCT AGG GTT GTT	1219
50	Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys Ala Arg Val Val Val	
	360 365 370	
	CCG AAG GTG TCT CAG GGG TTG AAG ATG ACG ATG GAG GAT TTG GCG GTG	1267
	Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met Glu Asp Leu Ala Val	
	375 380 385	

ES 2 276 416 T3

	GAT AAG ATT GTT GAG AAC GGT GTG GGG CTA GTG CCG CCA GAT TTT GCA	1315
	Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val Pro Pro Asp Phe Ala	
	390 395 400 405	
5	CAT GAG ATG TTT GAT GGG CTT CAC TCT CAT TTG GAG TCG GCG GGA ATT	1363
	His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu Glu Ser Ala Gly Ile	
	410 415 420	
	GAC GGT GTT AAA GTT GAT GTT ATC CAT CTG CTT GAG TTA CTA TCA GAG	1411
	Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Leu Leu Ser Glu	
10	425 430 435	
	GAA TAT GGT GGA CGA GTT GAG CTA GCA AGA GCT TAT TAC AAA GCA CTA	1459
	Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala Tyr Tyr Lys Ala Leu	
	440 445 450	
	ACC TCA TCA GTG AAG AAA CAT TTC AAA GGC AAT GGT GTA ATT GCT AGC	1507
15	Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala Ser	
	455 460 465	
	ATG GAG CAT TGC AAC GAC TTC TTT CTC CTC GGC ACC GAA GCC ATA TCC	1555
	Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr Glu Ala Ile Ser	
	470 475 480 485	
20	CTC GGC CGC GTC GGA GAT GAT TTT TGG TGC TCT GAT CCA TCT GGT GAT	1603
	Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser Asp Pro Ser Gly Asp	
	490 495 500	
	CCA AAT GGT ACA TAT TGG CTC CAA GGT TGT CAC ATG GTA CAT TGT GCC	1651
	Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys Ala	
25	505 510 515	
	TAC AAC AGT TTA TGG ATG GGA AAT TTC ATT CAG CCA GAT TGG GAC ATG	1699
	Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro Asp Trp Asp Met	
	520 525 530	
	TTT CAG TCC ACT CAT CCT TGT GCT GAA TTT CAT GCC GCC TCA CGA GCC	1747
30	Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg Ala	
	535 540 545	
	ATA TCC GGC GGA CCA ATT TAT GTT AGT GAT TGT GTT GGT AAT CAC AAT	1795
	Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys Val Gly Asn His Asn	
	550 555 560 565	
35	TTC AAG TTG CTC AAA TCT CTT GTT TTG CCC GAT GGT TCT ATC TTG CGT	1843
	Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg	
	570 575 580	
	TGT CAA CAT TAC GCA CTC CCT ACA AGA GAT TGC TTG TTT GAA GAC CCT	1891
	Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu Asp Pro	
40	585 590 595	
	TTG CAT AAT GGC AAA ACA ATG CTG AAA ATT TGG AAT CTC AAC AAA TAT	1939
	Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys Tyr	
	600 605 610	
	ACA GGT GTT TTG GGT CTT TTC AAC TGC CAA GGT GGT GGG TGG TGT CCT	1987
45	Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys Pro	
	615 620 625	
	GAG GCA CGG CGA AAC AAG AGT GTA TCT GAA TTT TCA CGC GCG GTG ACA	2035
	Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe Ser Arg Ala Val Thr	
	630 635 640 645	
	TGT TAT GCA AGT CCC GAA GAC ATT GAA TGG TGC AAT GGG AAA ACT CCA	2083
50	Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys Asn Gly Lys Thr Pro	
	650 655 660	
	ATG AGC ACC AAA GGT GTG GAT TTT TTT GCT GTG TAT TTT TTC AAG GAG	2131
	Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val Tyr Phe Phe Lys Glu	
55	665 670 675	

ES 2 276 416 T3

	AAG AAA TTG AGG CTC ATG AAG TGT TCT GAT AGA TTG AAA GTT TCG CTT	2179
	Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg Leu Lys Val Ser Leu	
	680 685 690	
5	GAG CCA TTT AGT TTT GAG CTA ATG ACA GTG TCT CCA GTG AAA GTG TTT	2227
	Glu Pro Phe Ser Phe Glu Leu Met Thr Val Ser Pro Val Lys Val Phe	
	695 700 705	
	TCG AAA AGG TTT ATA CAG TTT GCA CCG ATT GGG TTA GTG AAC ATG CTG	2275
	Ser Lys Arg Phe Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met Leu	
10	710 715 720 725	
	AAC TCT GGT GGT GCG ATT CAG TCT CTG GAG TTT GAT GAT AAT GCA AGT	2323
	Asn Ser Gly Gly Ala Ile Gln Ser Leu Glu Phe Asp Asp Asn Ala Ser	
	730 735 740	
15	TTG GTC AAG ATT GGG GTG AGA GGT TGC GGG GAG ATG AGC GTG TTT GCG	2371
	Leu Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met Ser Val Phe Ala	
	745 750 755	
	TCT GAG AAA CCG GTT TGC TGC AAA ATT GAT GGG GTT AAG GTG AAA TTT	2419
	Ser Glu Lys Pro Val Cys Cys Lys Ile Asp Gly Val Lys Val Lys Phe	
	760 765 770	
20	CTT TAT GAG GAC AAA ATG GCA AGA GTT CAA ATT CTG TGG CCT AGT TCT	2467
	Leu Tyr Glu Asp Lys Met Ala Arg Val Gln Ile Leu Trp Pro Ser Ser	
	775 780 785	
	TCA ACA TTG TCT TTG GTC CAG TTT TTA TTT TGA TCCCTAGGAA TCCTATGCAC	2520
	Ser Thr Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Phe Stop	
25	790 795 800	
	GTGTCTCTGT TTACAAGTAC TTTATATAAG TATAATATGT ATCTATTTCC ATTTTAACT	2580
	GTCTTTATGC AATTAGGTGG TCAATTAGTT ATTTGTTTGT GAAGTAACTA ACTTGCTTGT	2640
	GTGTGAAGCT TATAATATAT GGTCAAGTTC CTCACCTGTA TATACCTGTT GTATGTATAA	2700
	ATTTTACTAT ATATGACTAA CATCATTATC TTGTGAGCAA AAAAAA	2746

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 3:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 781 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: soja (*Glycine max*)
- (B) CEPA: Williams 82
- (F) TIPO DE TEJIDO: semillas y hojas

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

50	Met Ala Pro Ser Ile Ser Lys Thr Val Glu Leu Asn Ser Phe Gly Leu	
	5 10 15	
	Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ser Ile Thr Leu Glu Gly Ser Asn Phe	
	20 25 30	
55	Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr Glu Val Pro Glu Asn Ile Ile	
	35 40 45	
	Val Thr Pro Ser Pro Ile Asp Ala Lys Ser Ser Lys Asn Asn Glu Asp	
	50 55 60	

ES 2 276 416 T3

Asp Asp Val Val Gly Cys Phe Val Gly Phe His Ala Asp Glu Pro Arg
 65 70 75 80
 Ser Arg His Val Ala Ser Leu Gly Lys Leu Arg Gly Ile Lys Phe Met
 85 90 95
 Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Ser
 100 105 110
 Asn Gly His Glu Leu Glu His Glu Thr Gln Met Met Leu Leu Asp Lys
 115 120 125
 Asn Asp Gln Leu Gly Arg Pro Phe Val Leu Ile Leu Pro Ile Leu Gln
 130 135 140
 Ala Ser Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asp Asp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Val Cys Met Glu Ser Gly Ser Thr Arg Val Cys Gly Ser Ser Phe Gly
 165 170 175
 Ser Cys Leu Tyr Val His Val Gly His Asp Pro Tyr Gln Leu Leu Arg
 180 185 190
 Glu Ala Thr Lys Val Val Arg Met His Leu Gly Thr Phe Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Lys Thr Ala Pro Val Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr
 210 215 220
 Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Ser Gly Val Trp Glu Gly
 225 230 235 240
 Val Lys Gly Leu Val Glu Gly Gly Cys Pro Pro Gly Met Val Leu Ile
 245 250 255
 Asp Asp Gly Trp Gln Ala Ile Cys His Asp Glu Asp Pro Ile Thr Asp
 260 265 270
 Gln Glu Gly Met Lys Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg
 275 280 285
 Leu Val Lys Leu Glu Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Gln Tyr Cys Ser Gly
 290 295 300
 Lys Asp Ser Glu Lys Gly Met Gly Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu
 305 310 315 320
 Gln Phe Arg Ser Val Glu Gln Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly
 325 330 335
 Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Lys Val Pro Gly Met Pro Gln Ala Lys
 340 345 350
 Val Val Thr Pro Lys Leu Ser Asn Gly Leu Lys Leu Thr Met Lys Asp
 355 360 365
 Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Ser Asn Gly Val Gly Leu Val Pro Pro
 370 375 380
 His Leu Ala His Leu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser Arg Leu Glu Ser
 385 390 395 400
 Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met
 405 410 415
 Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Tyr
 420 425 430
 Lys Ala Leu Thr Ala Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val
 435 440 445
 Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr Glu
 450 455 460
 Ala Ile Ala Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro
 465 470 475 480
 Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val
 485 490 495

ES 2 276 416 T3

5 His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro Asp
 500 505 510
 Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala
 515 520 525
 Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Cys Val Gly
 530 535 540
 Lys His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Pro Asp Gly Thr
 545 550 555 560
 10 Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe
 565 570 575
 Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu
 580 585 590
 Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly
 595 600 605
 15 Trp Cys Pro Val Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ala Ser Glu Phe Ser Gln
 610 615 620
 Thr Val Thr Cys Leu Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Ser Asn Gly
 625 630 635 640
 20 Lys Ser Pro Ile Cys Ile Lys Gly Met Asn Val Phe Ala Val Tyr Leu
 645 650 655
 Phe Lys Asp His Lys Leu Lys Leu Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu Glu
 660 665 670
 Val Ser Leu Glu Pro Phe Thr Phe Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro Val
 675 680 685
 25 Ile Val Leu Ser Lys Lys Leu Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val
 690 695 700
 Asn Met Leu Asn Thr Gly Gly Ala Ile Gln Ser Met Glu Phe Asp Asn
 705 710 715 720
 30 His Ile Asp Val Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met Lys
 725 730 735
 Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Ser Cys Lys Leu Asp Gly Val Val
 740 745 750
 Val Lys Phe Asp Tyr Glu Asp Lys Met Leu Arg Val Gln Val Pro Trp
 755 760 765
 35 Pro Ser Ala Ser Lys Leu Ser Met Val Glu Phe Leu Phe Stop
 770 775 780

40 (1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2598 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 62..2407

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimento

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

ES 2 276 416 T3

	CCAAACCATA GCAAACCTAA GCACCAAACC TCTTCTTTC AAGATCCTTG AATTCAGTCC	60
	C ATG GCT CCA AGC ATA AGC AAA ACT GTG GAA CTA AAT TCA TTT GGT	106
5	Met Ala Pro Ser Ile Ser Lys Thr Val Glu Leu Asn Ser Phe Gly	
	5 10 15	
	CTT GTC AAC GGT AAT TTG CCT TTG TCC ATA ACC CTA GAA GGA TCA AAT	154
	Leu Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ser Ile Thr Leu Glu Gly Ser Asn	
	20 25 30	
10	TTC CTC GCC AAC GGC CAC CCT TTT CTC ACG GAA GTT CCC GAA AAC ATA	202
	Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr Glu Val Pro Glu Asn Ile	
	35 40 45	
	ATA GTC ACC CCT TCA CCC ATC GAC GCC AAG AGT AGT AAG AAC AAC GAG	250
	Ile Val Thr Pro Ser Pro Ile Asp Ala Lys Ser Ser Lys Asn Asn Glu	
	50 55 60	
15	GAC GAC GAC GTC GTA GGT TGC TTC GTG GGC TTC CAC GCG GAC GAG CCC	298
	Asp Asp Asp Val Val Gly Cys Phe Val Gly Phe His Ala Asp Glu Pro	
	65 70 75	
	AGA AGC CGA CAC GTG GCT TCC CTG GGG AAG CTC AGA GGA ATA AAA TTC	346
	Arg Ser Arg His Val Ala Ser Leu Gly Lys Leu Arg Gly Ile Lys Phe	
20	80 85 90 95	
	ATG AGC ATA TTC CGG TTT AAG GTG TGG TGG ACC ACT CAC TGG GTC GGT	394
	Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly	
	100 105 110	
25	AGC AAC GGA CAC GAA CTG GAG CAC GAG ACA CAG ATG ATG CTT CTC GAC	442
	Ser Asn Gly His Glu Leu Glu His Glu Thr Gln Met Met Leu Leu Asp	
	115 120 125	
	AAA AAC GAC CAG CTC GGA CGC CCC TTT GTG TTG ATT CTC CCG ATC CTC	490
	Lys Asn Asp Gln Leu Gly Arg Pro Phe Val Leu Ile Leu Pro Ile Leu	
	130 135 140	
30	CAA GCC TCG TTC CGA GCC TCC CTG CAA CCC GGT TTG GAT GAT TAC GTG	538
	Gln Ala Ser Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asp Asp Tyr Val	
	145 150 155	
	GAC GTT TGC ATG GAG AGC GGG TCG ACA CGT GTC TGT GGC TCC AGC TTC	586
	Asp Val Cys Met Glu Ser Gly Ser Thr Arg Val Cys Gly Ser Ser Phe	
35	160 165 170 175	
	GGG AGC TGC TTA TAC GTC CAC GTT GGC CAT GAC CCG TAT CAG TTG CTT	634
	Gly Ser Cys Leu Tyr Val His Val Gly His Asp Pro Tyr Gln Leu Leu	
	180 185 190	
	AGA GAA GCA ACT AAA GTC GTT AGG ATG CAT TTG GGG ACG TTC AAG CTT	682
	Arg Glu Ala Thr Lys Val Val Arg Met His Leu Gly Thr Phe Lys Leu	
40	195 200 205	
	CTC GAG GAG AAA ACC GCG CCA GTG ATC ATA GAC AAG TTT GGT TGG TGT	730
	Leu Glu Glu Lys Thr Ala Pro Val Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys	
	210 215 220	
45	ACA TGG GAC GCG TTT TAC TTG AAG GTG CAT CCC TCA GGT GTG TGG GAA	778
	Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Ser Gly Val Trp Glu	
	225 230 235	
	GGG GTG AAA GGG TTG GTG GAG GGA GGG TGC CCT CCA GGG ATG GTC CTA	826
	Gly Val Lys Gly Leu Val Glu Gly Gly Cys Pro Pro Gly Met Val Leu	
	240 245 250 255	
50	ATC GAC GAC GGG TGG CAA GCC ATT TGT CAC GAC GAG GAC CCC ATA ACG	874
	Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ala Ile Cys His Asp Glu Asp Pro Ile Thr	
	260 265 270	
	GAC CAA GAG GGT ATG AAG CGA ACC TCC GCA GGG GAG CAA ATG CCA TGC	922
	Asp Gln Glu Gly Met Lys Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys	
55	275 280 285	

ES 2 276 416 T3

	AGG TTG GTG AAG TTG GAG GAA AAT TAC AAG TTC AGA CAG TAT TGT AGT	970
	Arg Leu Val Lys Leu Glu Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Gln Tyr Cys Ser	
	290 295 300	
5	GGA AAG GAT TCT GAG AAG GGT ATG GGT GCC TTT GTT AGG GAC TTG AAG	1018
	Gly Lys Asp Ser Glu Lys Gly Met Gly Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys	
	305 310 315	
	GAA CAG TTT AGG AGC GTG GAG CAG GTG TAT GTG TGG CAC GCG CTT TGT	1066
	Glu Gln Phe Arg Ser Val Glu Gln Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys	
	320 325 330 335	
10	GGG TAT TGG GGT GGG GTC AGA CCC AAG GTT CCG GGC ATG CCC CAG GCT	1114
	Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Lys Val Pro Gly Met Pro Gln Ala	
	340 345 350	
	AAG GTT GTC ACT CCG AAG CTG TCC AAT GGA CTA AAA TTG ACA ATG AAG	1162
	Lys Val Val Thr Pro Lys Leu Ser Asn Gly Leu Lys Leu Thr Met Lys	
	355 360 365	
	GAT TTA CCG GTG GAT AAG ATC GTC AGT AAC GGA GTT GGA CTG GTG CCA	1210
	Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Ser Asn Gly Val Gly Leu Val Pro	
	370 375 380	
20	CCA CAC CTG GCT CAC CTT TTG TAC GAG GGG CTC CAC TCC CGT TTG GAA	1258
	Pro His Leu Ala His Leu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser Arg Leu Glu	
	385 390 395	
	TCT GCG GGT ATT GAC GGT GTT AAG GTT GAC GTT ATA CAC TTG CTC GAG	1306
	Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu	
	400 405 410 415	
25	ATG CTA TCC GAG GAA TAC GGT GGC CGT GTT GAG CTA GCC AAA GCT TAT	1354
	Met Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Ala Tyr	
	420 425 430	
	TAC AAA GCG CTC ACT GCT TCG GTG AAG AAG CAT TTC AAA GGC AAT GGG	1402
	Tyr Lys Ala Leu Thr Ala Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly	
	435 440 445	
30	GTC ATT GCG AGC ATG GAG CAT TGT AAT GAC TTC TTT CTC CTT GGT ACC	1450
	Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr	
	450 455 460	
	GAA GCC ATA GCC CTT GGG CGC GTA GGA GAT GAT TTT TGG TGC ACT GAT	1498
	Glu Ala Ile Ala Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp	
	465 470 475	
35	CCC TCT GGA GAT CCA AAT GGC ACG TAT TGG CTC CAA GGG TGT CAC ATG	1546
	Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met	
	480 485 490 495	
40	GTG CAC TGT GCC TAC AAC AGC TTG TGG ATG GGG AAT TTT ATT CAG CCG	1594
	Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro	
	500 505 510	
	GAT TGG GAC ATG TTC CAG TCC ACT CAC CCT TGT GCC GAA TTC CAT GC	1642
	Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala	
	515 520 525	
45	GCC TCT AGG GCC ATC TCT GGT GGA CCA GTT TAC GTT AGT GAT TGT GTT	1690
	Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Cys Val	
	530 535 540	
	GGA AAG CAC AAC TTC AAG TTG CTC AAG AGC CTC GCT TTG CCT GAT GGG	1738
	Gly Lys His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Pro Asp Gly	
	545 550 555	
50	ACG ATT TTG CGT TGT CAA CAC TAT GCA CTC CCC ACA CGA GAC TGT TTG	1786
	Thr Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu	
	560 565 570 575	

ES 2 276 416 T3

	TTT GAA GAC CCC TTG CAT GAT GGG AAG ACA ATG CTC AAA ATT TGG AAT	1834
	Phe Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn	
	580 585 590	
5	CTC AAC AAA TAT ACA GGT GTT TTG GGT CTA TTT AAT TGC CAA GGA GGT	1882
	Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly	
	595 600 605	
	GGG TGG TGT CCC GTA ACT AGG AGA AAC AAG AGT GCC TCT GAA TTT TCA	1930
	Gly Trp Cys Pro Val Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ala Ser Glu Phe Ser	
10	610 615 620	
	CAA ACT GTG ACA TGC TTA GCG AGT CCT CAA GAC ATT GAA TGG AGC AAT	1978
	Gln Thr Val Thr Cys Leu Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Ser Asn	
	625 630 635	
	GGG AAA AGC CCA ATA TGC ATA AAA GGG ATG AAT GTG TTT GCT GTA TAT	2026
15	Gly Lys Ser Pro Ile Cys Ile Lys Gly Met Asn Val Phe Ala Val Tyr	
	640 645 650 655	
	TTG TTC AAG GAC CAC AAA CTA AAG CTC ATG AAG GCA TCA GAG AAA TTG	2074
	Leu Phe Lys Asp His Lys Leu Lys Leu Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu	
	660 665 670	
20	GAA GTT TCA CTT GAG CCA TTT ACT TTT GAG CTA TTG ACA GTG TCT CCA	2122
	Glu Val Ser Leu Glu Pro Phe Thr Phe Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro	
	675 680 685	
	GTG ATT GTG CTG TCA AAA AAG TTA ATT CAA TTT GCT CCA ATT GGA TTA	2170
	Val Ile Val Leu Ser Lys Lys Leu Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu	
	690 695 700	
25	GTG AAC ATG CTT AAC ACT GGT GGT GCC ATT CAG TCC ATG GAG TTT GAC	2218
	Val Asn Met Leu Asn Thr Gly Gly Ala Ile Gln Ser Met Glu Phe Asp	
	705 710 715	
	AAC CAC ATA GAT GTG GTC AAA ATT GGG GTT AGG GGT TGT GGG GAG ATG	2266
	Asn His Ile Asp Val Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met	
30	720 725 730 735	
	AAG GTG TTT GCA TCA GAG AAA CCA GTT AGT TGC AAA CTA GAT GGG GTA	2314
	Lys Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Ser Cys Lys Leu Asp Gly Val	
	740 745 750	
35	GTT GTA AAA TTT GAT TAT GAG GAT AAA ATG CTG AGA GTG CAA GTT CCC	2362
	Val Val Lys Phe Asp Tyr Glu Asp Lys Met Leu Arg Val Gln Val Pro	
	755 760 765	
	TGG CCT AGT GCT TCA AAA TTG TCA ATG GTT GAG TTT TTA TTT TGA TCCCT	2412
	Trp Pro Ser Ala Ser Lys Leu Ser Met Val Glu Phe Leu Phe Stop	
	770 775 780	
40	GAAGGTGAAT TTGGGATACT ATGATGTTTG ACTCTCTTTT TAAGTAATAA GAGTCATATT	2472
	TTTCTGTTGT AAAAAAAAAA AAAAAA	2498

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 587 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Alcachofa Japonesa (*Stachys sieboldii*)

(F) TIPO DE TEJIDO: hojas

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

ES 2 276 416 T3

Thr Asn Gly Ser Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gln Ile Val Val Leu Asp
 1 5 10 15
 Lys Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Ile Val Leu Leu Pro Leu Ile Glu Gly
 20 25 30
 Gln Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro Gly Val Asp Asp Phe Ile Asp Ile
 35 40 45
 Cys Val Glu Ser Gly Ser Thr Lys Val Asn Glu Ser Ser Phe Arg Ala
 50 55 60
 Ser Leu Tyr Met His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Thr Leu Val Lys Asp
 65 70 75 80
 Ala Val Lys Val Ala Arg His His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu
 85 90 95
 Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp
 100 105 110
 Asp Ala Phe Tyr Leu Asn Val Gln Pro His Gly Val Met Glu Gly Val
 115 120 125
 Gln Gly Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp
 130 135 140
 Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asn Asp Ala Leu Thr Thr Glu
 145 150 155 160
 Gly Met Gly Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Ile
 165 170 175
 Lys Phe Glu Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Ser Pro Asn Lys
 180 185 190
 Thr Gly Pro Gly Pro Asn Thr Gly Met Gly Ala Phe Ile Arg Asp Met
 195 200 205
 Lys Asp Asn Phe Lys Ser Val Asp Tyr Val Tyr Val Trp His Ala Leu
 210 215 220
 Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Asn Val Pro Gly Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Lys Leu Ile Glu Pro Lys Leu Thr Pro Gly Leu Lys Thr Thr Met
 245 250 255
 Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Asn Asn Gly Val Gly Leu Val
 260 265 270
 Pro Pro Glu Phe Val Glu Gln Met Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu
 275 280 285
 Glu Ser Val Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu
 290 295 300
 Glu Met Leu Cys Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Asn His Phe Asn Gly Asn
 325 330 335
 Gly Val Ile Ala Gly Leu Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly
 340 345 350
 Thr Glu Ala Ile Thr Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr
 355 360 365
 Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys His
 370 375 380
 Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Ile Trp Met Gly Asn Phe Ile His
 385 390 395 400
 Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His
 405 410 415

Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser
 420 425 430
 Val Gly Lys His Asn Phe Glu Leu Leu Arg Ser Leu Val Leu Pro Asp
 435 440 445
 Gly Ser Ile Leu Arg Cys Asp Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys
 450 455 460
 Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp
 465 470 475 480
 Asn Tyr Asn Lys Phe Thr Gly Val Val Gly Thr Phe Asn Cys Gln Gly
 485 490 495
 Gly Gly Trp Ser Arg Glu Val Arg Arg Asn Gln Cys Ala Ala Glu Tyr
 500 505 510
 Ser His Ala Val Ser Ser Ser Ala Gly Pro Ser Asp Ile Glu Trp Lys
 515 520 525
 Gln Gly Thr Ser Pro Ile Asp Val Asp Gly Val Lys Thr Phe Ala Leu
 530 535 540
 Tyr Leu Phe His Glu Lys Lys Leu Val Leu Ser Lys Pro Ser Asp Lys
 545 550 555 560
 Ile Asp Ile Thr Leu Glu Pro Phe Asp Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser
 565 570 575
 Pro Val Lys Thr Leu Ala Asn Cys Thr Val Gln
 580 585

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1762 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
- (B) LOCALIZACIÓN: 2..1762
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimento

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

G ACA AAC GGG TCG GAT CTT GAG CGG GAA ACT CAA ATA GTC GTG CTC 46
 Thr Asn Gly Ser Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gln Ile Val Val Leu
 1 5 10 15
 GAC AAG TCC GAC GAC AGG CCC TAC ATC GTG CTG CTT CCG CTC ATC GAG 94
 Asp Lys Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Ile Val Leu Leu Pro Leu Ile Glu
 20 25 30
 GGG CAG TTT CGG GCT TCC CTT CAG CCC GGT GTG GAT GAT TTT ATC GAT 142
 Gly Gln Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro Gly Val Asp Asp Phe Ile Asp
 35 40 45
 ATT TGT GTC GAA AGC GGG TCA ACC AAG GTC AAC GAG TCC TCG TTC CGT 190
 Ile Cys Val Glu Ser Gly Ser Thr Lys Val Asn Glu Ser Ser Phe Arg
 50 55 60

ES 2 276 416 T3

	GCT TCG CTC TAC ATG CAC GCC GGT GAT GAC CCT TTT ACC CTG GTG AAG	238
	Ala Ser Leu Tyr Met His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Thr Leu Val Lys	
5	65 70 75	
	GAC GCC GTG AAG GTG GCG CGC CAC CAC CTC GGG ACG TTC AGG CTG CTG	286
	Asp Ala Val Lys Val Ala Arg His His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu	
	80 85 90 95	
	GAG GAG AAA ACT CCG CCG GGG ATC GTC GAC AAA TTC GGG TGG TGC ACG	334
10	Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr	
	100 105 110	
	TGG GAT GCG TTC TAC CTC AAC GTC CAG CCC CAC GGC GTT ATG GAG GGC	382
	Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Asn Val Gln Pro His Gly Val Met Glu Gly	
	115 120 125	
15	GTG CAG GGG CTG GTT GAC GGC GGA TGT CCG CCG GGG CTG GTG TTG ATC	430
	Val Gln Gly Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile	
	130 135 140	
	GAC GAC GGG TGG CAG TCC ATT TGT CAC GAC AAC GAC GCG CTC ACC ACC	478
	Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asn Asp Ala Leu Thr Thr	
20	145 150 155	
	GAG GGG ATG GGG AGA ACC TCC GCC GGA GAG CAA ATG CCC TGC AGG TTG	526
	Glu Gly Met Gly Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu	
	160 165 170 175	
	ATC AAG TTT GAG GAG AAT TAC AAG TTC AGG GAG TAC GAG AGC CCG AAT	574
25	Ile Lys Phe Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Ser Pro Asn	
	180 185 190	
	AAA ACT GGG CCG GGC CCG AAT ACG GGG ATG GGG GCC TTT ATT CGT GAC	622
	Lys Thr Gly Pro Gly Pro Asn Thr Gly Met Gly Ala Phe Ile Arg Asp	
	195 200 205	
30	ATG AAG GAC AAT TTC AAG AGT GTG GAC TAC GTG TAC GTG TGG CAT GCG	670
	Met Lys Asp Asn Phe Lys Ser Val Asp Tyr Val Tyr Val Trp His Ala	
	210 215 220	
	TTG TGT GGT TAT TGG GGC GGG CTC AGG CCC AAT GTT CCG GGC CTG CCC	718
	Leu Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Asn Val Pro Gly Leu Pro	
35	225 230 235	
	GAG GCT AAG CTC ATT GAG CCC AAA CTG ACT CCT GGG CTT AAG ACC ACC	766
	Glu Ala Lys Leu Ile Glu Pro Lys Leu Thr Pro Gly Leu Lys Thr Thr	
	240 245 250 255	
	ATG GAA GAT TTG GCT GTT GAT AAG ATT GTC AAC AAT GGC GTG GGT CTG	814
40	Met Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Asn Asn Gly Val Gly Leu	
	260 265 270	
	GTC CCA CCG GAG TTT GTT GAA CAA ATG TAT GAA GGA TTA CAT TCA CAT	862
	Val Pro Pro Glu Phe Val Glu Gln Met Tyr Glu Gly Leu His Ser His	
	275 280 285	
45	CTC GAA TCT GTG GGG ATT GAT GGA GTC AAA GTT GAC GTC ATC CAT TTG	910
	Leu Glu Ser Val Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu	
	290 295 300	
	TTG GAA ATG TTG TGT GAA GAC TAT GGT GGG AGA GTG GAC TTA GCC AAG	958
	Leu Glu Met Leu Cys Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys	
	305 310 315	
50	GCT TAT TAC AAG GCC TTA TCA AGC TCA GTT AAC AAC CAC TTC AAC GGC	1006
	Ala Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Asn His Phe Asn Gly	
	320 325 330 335	
	AAC GGC GTC ATC GCT GGC CTG GAG CAC TGC AAT GAC TTC ATG TTT CTC	1054
55	Asn Gly Val Ile Ala Gly Leu Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu	
	340 345 350	

ES 2 276 416 T3

	GGA ACC GAG GCC ATT ACC TTG GGT CGT GTC GGG GAT GAT TTT TGG TGC	1102
	Gly Thr Glu Ala Ile Thr Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys	
	355 360 365	
5	ACT GAT CCA TCT GGA GAT CCC AAT GGC ACG TTC TGG TTG CAA GGG TGT	1150
	Thr Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys	
	370 375 380	
	CAC ATG GTG CAC TGC GCC TAC AAC AGC ATA TGG ATG GGT AAT TTC ATC	1198
10	His Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Ile Trp Met Gly Asn Phe Ile	
	385 390 395	
	CAC CCT GAT TGG GAC ATG TTT CAA TCG ACT CAC CCT TGC GCT GAA TTC	1246
	His Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe	
	400 405 410 415	
15	CAC GCT GCC TCA CGA GCC ATC TCC GGC GGG CCC ATT TAC GTC AGT GAC	1294
	His Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp	
	420 425 430	
	TCG GTC GGA AAG CAC AAC TTC GAG CTC CTT AGG AGC CTC GTT CTT CCC	1342
	Ser Val Gly Lys His Asn Phe Glu Leu Leu Arg Ser Leu Val Leu Pro	
	435 440 445	
20	GAT GGC TCC ATC CTC CGT TGT GAT TAC TAC GCG CTT CCG ACT CGC GAT	1390
	Asp Gly Ser Ile Leu Arg Cys Asp Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp	
	450 455 460	
	TGC CTC TTT GAA GAT CCA CTT CAC AAT GGC AAG ACT ATG CTC AAA ATT	1438
25	Cys Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile	
	465 470 475	
	TGG AAT TAT AAC AAG TTC ACC GGA GTT GTC GGA ACT TTC AAC TGC CAA	1486
	Trp Asn Tyr Asn Lys Phe Thr Gly Val Val Gly Thr Phe Asn Cys Gln	
	480 485 490 495	
30	GGT GGC GGG TGG AGC CGG GAA GTG CGT CGC AAC CAA TGC GCT GCC GAG	1534
	Gly Gly Gly Trp Ser Arg Glu Val Arg Arg Asn Gln Cys Ala Ala Glu	
	500 505 510	
	TAT TCC CAC GCC GTC TCC TCT AGC GCT GGT CCG AGT GAC ATT GAG TGG	1582
	Tyr Ser His Ala Val Ser Ser Ser Ala Gly Pro Ser Asp Ile Glu Trp	
	515 520 525	
35	AAG CAA GGA ACG AGT CCG ATC GAC GTC GAC GGC GTC AAA ACA TTC GCG	1630
	Lys Gln Gly Thr Ser Pro Ile Asp Val Asp Gly Val Lys Thr Phe Ala	
	530 535 540	
	TTG TAC CTA TTC CAC GAG AAG AAA CTC GTC CTT TCT AAG CCA TCA GAC	1678
	Leu Tyr Leu Phe His Glu Lys Lys Leu Val Leu Ser Lys Pro Ser Asp	
	545 550 555	
40	AAA ATC GAC ATC ACG CTT GAG CCC TTC GAT TTT GAG CTG ATA ACC GTT	1726
	Lys Ile Asp Ile Thr Leu Glu Pro Phe Asp Phe Glu Leu Ile Thr Val	
	560 565 570 575	
45	TCT CCA GTC AAA ACT CTA GCC AAT TGC ACC GTC CAA	1762
	Ser Pro Val Lys Thr Leu Ala Asn Cys Thr Val Gln	
	580 585	

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 271 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: maíz (*Zea mays* L.)

(B) CEPA: Pioneer 3358

(F) TIPO DE TEJIDO: hojas

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

ES 2 276 416 T3

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

(1) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 996 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN_c a ARN_m

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 2..817

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimento

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

ES 2 276 416 T3

	C CAG TCC ACG CAC CCC TGC GCC GCC TTC CAC GCC GCG TCC CGC GCC	46
	Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser Arg Ala	
	5 10 15	
5	ATC TCC GGC GGG CCC ATC TAC GTC AGC GAC TCG GTG GGG CAG CAC GAC	94
	Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Gln His Asp	
	20 25 30	
	TTC GCG CTG CTC CGC CGC CTG GCG CTC CCC GAC GGC ACC GTC CTC CGG	142
	Phe Ala Leu Leu Arg Arg Leu Ala Leu Pro Asp Gly Thr Val Leu A	
	35 40 45	
10	TGC GAG GGC CAC GCG CTG CCC ACG CGC GAC TGC CTC TTC GCC GAC CCG	190
	Cys Glu Gly His Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Ala Asp Pro	
	50 55 60	
	CTC CAC GAC GGC CGG ACC GTG CTC AAG ATC TGG AAC GTG AAC CGC TTC	238
	Leu His Asp Gly Arg Thr Val Leu Lys Ile Trp Asn Val Asn Arg Phe	
	65 70 75	
15	GCC GGC GTC GTC GGC GCC TTC AAC TGC CAG GGC GGC GGG TGG AGC CCC	286
	Ala Gly Val Val Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Ser Pro	
	80 85 90 95	
20	GAG GCG CGG CGG AAC AAG TGC TTC TCG GAG TTC TCC GTG CCC CTG GCC	334
	Glu Ala Arg Arg Asn Lys Cys Phe Ser Glu Phe Ser Val Pro Leu Ala	
	100 105 110	
	GCG CGC GCC TCG CCG TCC GAC GTC GAG TGG AAG AGC GGC AAG GCG GGG	382
	Ala Arg Ala Ser Pro Ser Asp Val Glu Trp Lys Ser Gly Lys Ala Gly	
	115 120 125	
25	CCA GGC GTC AGC GTC AAG GAC GTC TCC CAG TTC GCC GTG TAC GCG GTC	430
	Pro Gly Val Ser Val Lys Asp Val Ser Gln Phe Ala Val Tyr Ala Val	
	130 135 140	
	GAG GCC AGG ACG CTG CAG CTG CTG CGC CCC GAC GAG GGC GTC GAC CTC	478
	Glu Ala Arg Thr Leu Gln Leu Leu Arg Pro Asp Glu Gly Val Asp Leu	
	145 150 155	
30	ACG CTG CAG CCC TTC ACC TAC GAG CTC TTC GTC GTT GCC CCC GTG CGC	526
	Thr Leu Gln Pro Phe Thr Tyr Glu Leu Phe Val Val Ala Pro Val Arg	
	160 165 170 175	
	GTC ATC TCG CAT GAG CGG GCC ATC AAG TTC GCG CCC ATC GGA CTC GCC	574
	Val Ile Ser His Glu Arg Ala Ile Lys Phe Ala Pro Ile Gly Leu Ala	
	180 185 190	
35	AAC ATG CTC AAC ACC GCC GGC GCC GTG CAG GCG TTC GAG GCC AAG AAA	622
	Asn Met Leu Asn Thr Ala Gly Ala Val Gln Ala Phe Glu Ala Lys Lys	
	195 200 205	
40	GAT GCT AGC GGC GTC ACG GCA GAG GTG TTC GTG AAG GGC GCA GGG GAG	670
	Asp Ala Ser Gly Val Thr Ala Glu Val Phe Val Lys Gly Ala Gly Glu	
	210 215 220	
	CTG GTG GCG TAC TCG TCG GCG ACG CCC AGG CTC TGC AAG GTG AAC GGC	718
	Leu Val Ala Tyr Ser Ser Ala Thr Pro Arg Leu Cys Lys Val Asn Gly	
	225 230 235	
45	GAC GAG GCC GAG TTC ACG TAC AAG GAC GGC GTG GTC ACC GTC GAC GTG	766
	Asp Glu Ala Glu Phe Thr Tyr Lys Asp Gly Val Val Thr Val Asp Val	
	240 245 250 255	
50	CCG TGG TCG GGG TCG TCG TCG AAG CTG TGT TGC GTC CAG TAC GTC TAC	814
	Pro Trp Ser Gly Ser Ser Ser Lys Leu Cys Cys Val Gln Tyr Val Tyr	
	260 265 270	
55	TGA GCCGGACGGG CCGATGACTC TCGTCTCTG CTCCCTGCTG GCCTGCTCAG GAC	873
	Stop	
	ATAATCTAAT GTTTAGAGCT TACCAGGTTT TACAGCTCTA TCAGTTTACT TTTGTTTTTC	933
	TGCTCTTCGT TTTTAAAGAA TTATTTCTAT TGTGTGAATT AATGAGTGCT TTCCTTCTAA	993
	AAA	996
60		
65		

ES 2 276 416 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sumitomo Chemical Company, Limited

5 <120> Gen de la rafinosa sintetasa y uso del mismo

<140> 97122417.5

<141> 1997-12-18

10

<150> JP 338673/1996

<151> 1996-12-18

15

<160> 84

<210> 1

<211> 799

20

<212> PRT

<213> *Vicia faba*

<400> 1

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Ala Pro Pro Ser Ile Thr Lys Thr Ala Thr Leu Gln Asp Val Ile
 1           5           10           15
Ser Thr Ile Asp Ile Gly Asn Gly Asn Ser Pro Leu Phe Ser Ile Thr
           20           25           30
Leu Asp Gln Ser Arg Asp Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr
           35           40           45
Gln Val Pro Pro Asn Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ser
           50           55           60
Phe Leu Asn Leu Lys Ser Asn Lys Asp Thr Ile Pro Asn Asn Asn Asn
           65           70           75           80
Thr Met Leu Leu Gln Gln Gly Cys Phe Val Gly Phe Asn Ser Thr Glu
           85           90           95
Pro Lys Ser His His Val Val Pro Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile Lys
           100          105          110
Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val
           115          120          125
Gly Thr Asn Gly Gln Glu Leu Gln His Glu Thr Gln Met Leu Ile Leu
           130          135          140

```

ES 2 276 416 T3

	Asp Lys Asn Asp Ser Leu Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Ile	
	145	150 155 160
5	Leu Glu Asn Thr Phe Arg Thr Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asn Asp His	
		165 170 175
	Ile Gly Met Ser Val Glu Ser Gly Ser Thr His Val Thr Gly Ser Ser	
		180 185 190
10	Phe Lys Ala Cys Leu Tyr Ile His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile	
		195 200 205
	Leu Lys Glu Ala Val Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys	
15		210 215 220
	Thr Leu Glu Glu Lys Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp	
		225 230 235 240
	Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp	
20		245 250 255
	Glu Gly Val Lys Ser Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val	
		260 265 270
25	Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Asp Glu	
		275 280 285
	Asp Asp Ser Gly Met Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys	
		290 295 300
30	Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn	
		305 310 315
	Pro Glu Asn Gly Gly Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu	
35		320 325 330 335
	Lys Glu Glu Phe Gly Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu	
		340 345 350
	Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys	
40		355 360 365
	Ala Arg Val Val Val Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met	
		370 375 380
45	Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val	
		385 390 395 400
	Pro Pro Asp Phe Ala His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu	
		405 410 415
50	Glu Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu	
		420 425 430
	Glu Leu Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala	
55		435 440 445

ES 2 276 416 T3

Tyr Tyr Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn
 450 455 460
 5 Gly Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly
 465 470 475 480
 Thr Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser
 485 490 495
 10 Asp Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His
 500 505 510
 Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln
 515 520 525
 15 Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His
 530 535 540
 Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys
 20 545 550 555 560
 Val Gly Asn His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp
 565 570 575
 25 Gly Ser Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys
 580 585 590
 Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp
 595 600 605
 30 Asn Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly
 610 615 620
 Gly Gly Trp Cys Pro Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe
 35 625 630 635 640
 Ser Arg Ala Val Thr Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys
 645 650 655
 Asn Gly Lys Thr Pro Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val
 40 660 665 670
 Tyr Phe Phe Lys Glu Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg
 675 680 685
 45 Leu Lys Val Ser Leu Glu Pro Phe Ser Phe Glu Leu Met Thr Val Ser
 690 695 700
 Pro Val Lys Val Phe Ser Lys Arg Phe Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly
 705 710 715 720
 50 Leu Val Asn Met Leu Asn Ser Gly Gly Ala Ile Gln Ser Leu Glu Phe
 725 730 735
 Asp Asp Asn Ala Ser Leu Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu
 740 745 750
 55 Met Ser Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Cys Cys Lys Ile Asp Gly
 755 760 765
 Val Lys Val Lys Phe Leu Tyr Glu Asp Lys Met Ala Arg Val Gln Ile
 60 770 775 780
 Leu Trp Pro Ser Ser Ser Thr Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Phe
 785 790 795
 65

ES 2 276 416 T3

<210> 2

<211> 2746

<212> ADN

5 <213> *Vicia faba*

<220>

<221> CDS

10 <222> (101) .. (2500)

<400> 2

```

15      aatttcaag catagccaag itaaccacct tagaaacatt cctacaagct acttatccct    60
      gicaataagc tactaagcta ccagagtcic atcaalcacc atg gca cca cca agc    115
                                   Met Ala Pro Pro Ser
20                                   5
      ala acc aaa act gca acc ctc caa gac gta ata agc acc atc gat att    163
      ile thr lys thr ala thr leu gln asp val ile ser thr ile asp ile
25              10              15              20
      ggt aat ggt aac tca ccc tta ttc tcc ata acc tta gac caa tca cgt    211
      gly asn gly asn ser pro leu phe ser ile thr leu asp gln ser arg
              25              30              35
30      gac ttc ctt gca aat ggc cac cct ttc ctc acc caa gtc cca cct aac    259
      asp phe leu ala asn gly his pro phe leu thr gln val pro pro asn
              40              45              50
35      ata aca aca aca aca aca acc act gct tcc tct ttt ctc aat ctc aaa    307
      ile thr thr thr thr thr thr thr ala ser ser phe leu asn leu lys
              55              60              65
40      tcc aac aaa gat acc att ccc aac aac aac aac acc atg ttg ttg caa    355
      ser asn lys asp thr ile pro asn asn asn asn thr met leu leu gln
              70              75              80              85
45      caa ggt tgt ttc gtt ggt ttc aac tcc acc gaa ccc aaa agc cac cac    403

```

45

50

55

60

65

ES 2 276 416 T3

	Gln Gly Cys Phe Val Gly Phe Asn Ser Thr Glu Pro Lys Ser His His	
	90 95 100	
5	gta gtt cca ctc ggc aaa cta aaa gga atc aaa ttc atg agc ata ttc	451
	Val Val Pro Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile Lys Phe Met Ser Ile Phe	
	105 110 115	
10	cgg ttc aaa gtt tgg tgg aca act cac tgg gtc gga aca aat gga cag	499
	Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Thr Asn Gly Gln	
	120 125 130	
15	gaa cta caa cac gaa aca caa atg tta atc ctg gac aaa aac gac tcc	547
	Glu Leu Gln His Glu Thr Gln Met Leu Ile Leu Asp Lys Asn Asp Ser	
	135 140 145	
20	ctc gga cga ccc tat gtc tta ctc ctc cca atc cta gaa aac acc ttc	595
	Leu Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Ile Leu Glu Asn Thr Phe	
	150 155 160 165	
	cga acc tca ctc caa ccc ggt ctc aac gat cac ata ggc atg tcc gtc	643
	Arg Thr Ser Leu Gln Pro Gly Leu Asn Asp His Ile Gly Met Ser Val	
	170 175 180	
25	gaa agc ggt tca aca cat gtc acc ggg tca agc ttc aaa gca tgt ctt	691
	Glu Ser Gly Ser Thr His Val Thr Gly Ser Ser Phe Lys Ala Cys Leu	
	185 190 195	
30	tac atc cat ctc agt aac gac cca tac agt ata cta aaa gaa gca gtt	739
	Tyr Ile His Leu Ser Asn Asp Pro Tyr Ser Ile Leu Lys Glu Ala Val	
	200 205 210	
35	aaa gta atc caa act cag tta gga aca ttc aag act ctt gaa gaa aaa	787
	Lys Val Ile Gln Thr Gln Leu Gly Thr Phe Lys Thr Leu Glu Glu Lys	
	215 220 225	
40	aca gca cct agt att ata gac aaa ttc ggt tgg tgc acg tgg gat gct	835
	Thr Ala Pro Ser Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala	
	230 235 240 245	
	ttt tac ttg aag gtt cat cca aaa ggt gta tgg gaa ggt gta aag tct	883
	Phe Tyr Leu Lys Val His Pro Lys Gly Val Trp Glu Gly Val Lys Ser	
	250 255 260	
45	ctc aca gat ggt ggt tgt cct ccc ggt ttc gtc ata atc gac gac ggt	931
	Leu Thr Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val Ile Ile Asp Asp Gly	
	265 270 275	
50	tgg caa tcc att tgt cat gac gat gac gat gaa gat gat tca gga atg	979
	Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Ser Gly Met	
	280 285 290	

ES 2 276 416 T3

	aac cga acc tca gcc ggg gaa caa atg cca tgc aga ctt gla aaa tac	1027
	Asn Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Val Lys Tyr	
5	295 300 305	
	gaa gag aat tct aag ttt aga gaa tat gag aat cct gaa aat gga ggg	1075
	Glu Glu Asn Ser Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Asn Pro Glu Asn Gly Gly	
	310 315 320 325	
10	aag aaa ggt ttg ggt ggt ttt gtg agg gat ttg aag gaa gag ttt ggg	1123
	Lys Lys Gly Leu Gly Gly Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu Glu Phe Gly	
	330 335 340	
15	agt gtg gag agt gtt tat gtt tgg cat gcg ctt tgt ggg tat tgg ggc	1171
	Ser Val Glu Ser Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp Gly	
	345 350 355	
20	ggg gtt agg cct gga gtg cat ggg atg ccg aaa gct agg gtt gtt gtt	1219
	Gly Val Arg Pro Gly Val His Gly Met Pro Lys Ala Arg Val Val Val	
	360 365 370	
25	ccg aag gtg tct cag ggg ttg aag atg acg atg gag gat ttg gcg gtg	1267
	Pro Lys Val Ser Gln Gly Leu Lys Met Thr Met Glu Asp Leu Ala Val	
	375 380 385	
30	gat aag att gtt gag aac ggt gtg ggg cta gtg ccg cca gat ttt gca	1315
	Asp Lys Ile Val Glu Asn Gly Val Gly Leu Val Pro Pro Asp Phe Ala	
	390 395 400 405	
	cat gag atg ttt gat ggg ctt cac tct cat ttg gag tgc gcg gga att	1363
	His Glu Met Phe Asp Gly Leu His Ser His Leu Glu Ser Ala Gly Ile	
	410 415 420	
35	gac ggt gtt aaa gtt gat gtt atc cat ctg ctt gag tta cta tca gag	1411
	Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Leu Leu Ser Glu	
	425 430 435	
40	gaa tat ggt gga cga gtt gag cta gca aga gct tat tac aaa gca cta	1459
	Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Arg Ala Tyr Tyr Lys Ala Leu	
	440 445 450	
45	acc tca tca gtg aag aaa cat ttc aaa ggc aat ggt gla att gct agc	1507
	Thr Ser Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala Ser	
	455 460 465	
50	atg gag cat tgc aac gac ttc ttt ctc ctc ggc acc gaa gcc ata tcc	1555
	Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr Glu Ala Ile Ser	
	470 475 480 485	
	ctc ggc cgc gtc gga gat gat ttt tgg tgc tct gat cca tct ggt gat	1603
	Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Ser Asp Pro Ser Gly Asp	

ES 2 276 416 T3

	490	495	500	
5	cca aat ggt aca tai tgg ctc caa ggt tgt cac atg gta cat tgt gcc	1651		
	Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys Ala			
	505	510	515	
10	tac aac agt tta tgg atg gza aat ttc att cag cca gat tgg gac atg	1699		
	Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro Asp Trp Asp Met			
	520	525	530	
15	ttt cag tcc act cat cct tgt gct gaa ttt cat gcc gcc tca cga gcc	1747		
	Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg Ala			
	535	540	545	
20	ata tcc ggc gga cca att tat gtt agt gat tgt gtt ggt aat cac aat	1795		
	Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Cys Val Gly Asn His Asn			
	550	555	560	565
25	ttc aag ttg ctc aaa tct ctt gtt ttg ccc gat ggt tct atc ttg cgt	1843		
	Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg			
	570	575	580	
30	tgt caa cat tac gca ctc cct aca aga gat tgc ttg ttt gaa gac cct	1891		
	Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu Asp Pro			
	585	590	595	
35	ttg cat aat ggc aaa aca atg ctg aaa att tgg aat ctc aac aaa tat	1939		
	Leu His Asn Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys Tyr			
	600	605	610	
40	aca ggt gtt ttg ggt ctt ttc aac tgc caa ggt ggt ggg tgg tgt cct	1987		
	Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys Pro			
	615	620	625	
45	gag gca cgg cga aac aag agt gla tct gaa ttt tca cgc gcg gtg aca	2035		
	Glu Ala Arg Arg Asn Lys Ser Val Ser Glu Phe Ser Arg Ala Val Thr			
	630	635	640	645
50	tgt tat gca agt ccc gaa gac att gaa tgg tgc aat ggg aaa act cca	2083		
	Cys Tyr Ala Ser Pro Glu Asp Ile Glu Trp Cys Asn Gly Lys Thr Pro			
	650	655	660	
55	atg agc acc aaa ggt gtg gat ttt ttt gct gtg tat ttt ttc aag gag	2131		
	Met Ser Thr Lys Gly Val Asp Phe Phe Ala Val Tyr Phe Phe Lys Glu			
	665	670	675	
60	aag aaa ttg agg ctc atg aag tgt tct gat aga ttg aaa gtt tgc ctt	2179		
	Lys Lys Leu Arg Leu Met Lys Cys Ser Asp Arg Leu Lys Val Ser Leu			
	680	685	690	
65	gag cca ttt agt ttt gag cta atg aca gtg tct cca gtg aaa gtg ttt	2227		

ES 2 276 416 T3

Glu Pro Phe Ser Phe Glu Leu Met Thr Val Ser Pro Val Lys Val Phe
 695 700 705
 5 tcg aaa agg ttt ata cag ttt gca ccg att ggg tta gtg aac atg ctg 2275
 Ser Lys Arg Phe Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met Leu
 710 715 720 725
 10 aac tct ggt ggt gcg att cag tct ctc gag ttt gat gat aat gca agt 2323
 Asn Ser Gly Gly Ala Ile Gln Ser Leu Glu Phe Asp Asp Asn Ala Ser
 730 735 740
 15 ttg gtc aag att ggg glg aga ggt tgc ggg gag atg agc gtg ttt gcg 2371
 Leu Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met Ser Val Phe Ala
 745 750 755
 20 tct gag aaa ccg gtt tgc tgc aaa att gat ggg gtt aag gtg aaa ttt 2419
 Ser Glu Lys Pro Val Cys Cys Lys Ile Asp Gly Val Lys Val Lys Phe
 760 765 770
 25 ctt tat gag gac aaa atg gca aga gtt caa att ctg tgg cct agt tct 2467
 Leu Tyr Glu Asp Lys Met Ala Arg Val Gln Ile Leu Trp Pro Ser Ser
 775 780 785
 tca aca ttg tct ttg glc cag ttt tta ttt tga tccctaggaa tccctatgcac 2520
 Ser Thr Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Phe
 790 795
 30 gtgtctctgt ttacaagtac ttatatataag tataatatgt atctatttcc atttttaact 2580
 gtctttatgc aattagggtg tcaattagtt atttgtttgt gaagtaacta acttgcttgt 2640
 gtgtgaagct tataatatat ggicaagttc ctcacttgta tataccgttt gtaigtataa 2700
 35 attttactat atatgactaa catcattatc ttgtgagcaa aaaaaa 2746

<210> 3

<211> 781

<212> PRT

<213> *Glycine max*

<400> 3

Met Ala Pro Ser Ile Ser Lys Thr Val Glu Leu Asn Ser Phe Gly Leu
 5 10 15
 Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ser Ile Thr Leu Glu Gly Ser Asn Phe
 20 25 30
 55 Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr Glu Val Pro Glu Asn Ile Ile
 35 40 45
 Val Thr Pro Ser Pro Ile Asp Ala Lys Ser Ser Lys Asn Asn Glu Asp

ES 2 276 416 T3

	50		55		60											
	Asp	Asp	Val	Val	Gly	Cys	Phe	Val	Gly	Phe	His	Ala	Asp	Glu	Pro	Arg
5	65					70					75					80
	Ser	Arg	His	Val	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Arg	Gly	Ile	Lys	Phe	Met
					85					90					95	
	Ser	Ile	Phe	Arg	Phe	Lys	Val	Trp	Trp	Thr	Thr	His	Trp	Val	Gly	Ser
10					100					105				110		
	Asn	Gly	His	Glu	Leu	Glu	His	Glu	Thr	Gln	Met	Met	Leu	Leu	Asp	Lys
					115					120				125		
15	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Leu	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	Gln
					130					135				140		
	Ala	Ser	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	Gln	Pro	Gly	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Asp
	145					150					155				160	
20	Val	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	Cys	Gly	Ser	Ser	Phe	Gly
					165					170					175	
	Ser	Cys	Leu	Tyr	Val	His	Val	Gly	His	Asp	Pro	Tyr	Gln	Leu	Leu	Arg
					180					185				190		
25	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Val	Arg	Met	His	Leu	Gly	Thr	Phe	Lys	Leu	Leu
					195					200				205		
	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys	Thr
30					210					215				220		
	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Leu	Lys	Val	His	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Glu	Gly
	225					230					235				240	
	Val	Lys	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Leu	Ile
35					245					250				255		
	Asp	Asp	Gly	Trp	Gln	Ala	Ile	Cys	His	Asp	Glu	Asp	Pro	Ile	Thr	Asp
					260					265				270		
40	Gln	Glu	Gly	Met	Lys	Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Pro	Cys	Arg
					275					280				285		
	Leu	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gln	Tyr	Cys	Ser	Gly
					290					295				300		
45	Lys	Asp	Ser	Glu	Lys	Gly	Met	Gly	Ala	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	Glu
	305					310				315				320		
	Gln	Phe	Arg	Ser	Val	Glu	Gln	Val	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Leu	Cys	Gly
					325					330				335		
50	Tyr	Trp	Gly	Gly	Val	Arg	Pro	Lys	Val	Pro	Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Lys
					340					345				350		
	Val	Val	Thr	Pro	Lys	Leu	Ser	Asn	Gly	Leu	Lys	Leu	Thr	Met	Lys	Asp

ES 2 276 416 T3

	355	360	365
	Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Ser Asn Gly Val Gly Leu Val Pro Pro		
5	370	375	380
	His Leu Ala His Leu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser Arg Leu Glu Ser		
	385	390	395
	Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met		
10	405	410	415
	Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Tyr		
	420	425	430
15	Lys Ala Leu Thr Ala Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val		
	435	440	445
	Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr Glu		
	450	455	460
20	Ala Ile Ala Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro		
	465	470	475
	Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val		
	485	490	495
25	His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro Asp		
	500	505	510
	Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala		
30	515	520	525
	Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Cys Val Gly		
	530	535	540
35	Lys His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Pro Asp Gly Thr		
	545	550	555
	Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe		
	565	570	575
40	Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu		
	580	585	590
	Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly		
	595	600	605
45	Trp Cys Pro Val Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ala Ser Glu Phe Ser Gln		
	610	615	620
	Thr Val Thr Cys Leu Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Ser Asn Gly		
50	625	630	635
	Lys Ser Pro Ile Cys Ile Lys Gly Met Asn Val Phe Ala Val Tyr Leu		
	645	650	655
55	Phe Lys Asp His Lys Leu Lys Leu Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu Glu		

ES 2 276 416 T3

	660	665	670
	Val Ser Leu Glu Pro Phe Thr Phe Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro Val		
5	675	680	685
	Ile Val Leu Ser Lys Lys Leu Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val		
	690	695	700
10	Asn Met Leu Asn Thr Gly Gly Ala Ile Gln Ser Met Glu Phe Asp Asn		
	705	710	715
	His Ile Asp Val Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met Lys		
	725	730	735
15	Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Ser Cys Lys Leu Asp Gly Val Val		
	740	745	750
	Val Lys Phe Asp Tyr Glu Asp Lys Met Leu Arg Val Gln Val Pro Trp		
20	755	760	765
	Pro Ser Ala Ser Lys Leu Ser Met Val Glu Phe Leu Phe		
	770	775	780

25 <210> 4
 <211> 2498
 <212> ADN
 30 <213> *Glycine max*
 <220>
 <221>CDS
 35 <222> (62) .. (2407)
 <400> 4

40	ccaaaccata gcaaacctaa gcaccaaacc tctttctttc aagatccitg aattcagttcc	60
	c atg gct cca agc ata agc aaa act gtg gaa cta aat tca ttt ggt	106
	Met Ala Pro Ser Ile Ser Lys Thr Val Glu Leu Asn Ser Phe Gly	
45	5 10 15	
	ctt gtc aac ggt aat ttg cct ttg tcc ata acc cta gaa gga tca aat	154
	Leu Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ser Ile Thr Leu Glu Gly Ser Asn	
50	20 25 30	
	ttc ctc gcc aac ggc cac cct ttt ctc acg gaa gtt ccc gaa aac ata	202
	Phe Leu Ala Asn Gly His Pro Phe Leu Thr Glu Val Pro Glu Asn Ile	
55	35 40 45	
	ata gtc acc cct tca ccc atc gac gcc aag agt agt aag aac aac gag	250

60

65

ES 2 276 416 T3

	Ile	Val	Thr	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Ala	Lys	Ser	Ser	Lys	Asn	Asn	Glu	
				50				55					60				
5	gac	gac	gac	gtc	gta	ggt	tgc	ttc	gtg	ggc	ttc	cac	gcg	gac	gag	ccc	298
	Asp	Asp	Asp	Val	Val	Gly	Cys	Phe	Val	Gly	Phe	His	Ala	Asp	Glu	Pro	
				65				70					75				
10	aga	agc	cga	cac	gtg	gct	tcc	ctg	ggg	aag	ctc	aga	gga	ata	aaa	ttc	346
	Arg	Ser	Arg	His	Val	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Arg	Gly	Ile	Lys	Phe	
				80				85				90				95	
15	atg	agc	ata	ttc	cgg	ttt	aag	gtg	tgg	tgg	acc	act	cac	tgg	gtc	ggt	394
	Met	Ser	Ile	Phe	Arg	Phe	Lys	Val	Trp	Trp	Thr	Thr	His	Trp	Val	Gly	
				100						105					110		
20	agc	aac	gga	cac	gaa	ctg	gag	cac	gag	aca	cag	atg	atg	ctt	ctc	gac	442
	Ser	Asn	Gly	His	Glu	Leu	Glu	His	Glu	Thr	Gln	Met	Met	Leu	Leu	Asp	
				115						120					125		
25	aaa	aac	gac	cag	ctc	gga	cgc	ccc	ttt	gtg	tig	att	ctc	ccg	alc	ctc	490
	Lys	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Leu	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	
				130					135				140				
30	caa	gcc	tgc	ttc	cga	gcc	tcc	ctg	caa	ccc	ggt	tig	gat	gat	tac	gtg	538
	Gln	Ala	Ser	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	Gln	Pro	Gly	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	
				145				150				155					
35	gac	glt	tgc	atg	gag	agc	ggg	tgc	aca	cgt	gtc	tgt	ggc	tcc	agc	ttc	586
	Asp	Val	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	Cys	Gly	Ser	Ser	Phe	
				160				165				170				175	
40	ggg	agc	tgc	tta	tac	gtc	cac	glt	ggc	cat	gac	ccg	tat	cag	tig	ctt	634
	Gly	Ser	Cys	Leu	Tyr	Val	His	Val	Gly	His	Asp	Pro	Tyr	Gln	Leu	Leu	
				180						185					190		
45	aga	gaa	gca	act	aaa	gtc	glt	agg	atg	cat	ttg	ggg	acg	ttc	aag	ctt	682
	Arg	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Val	Arg	Met	His	Leu	Gly	Thr	Phe	Lys	Leu	
				195						200					205		
50	ctc	gag	gag	aaa	acc	gcg	cca	gtg	alc	ata	gac	aag	ttt	ggt	tgg	tgt	730
	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys	
				210					215				220				
55	aca	tgg	gac	gcg	ttt	tac	ttg	aag	gtg	cat	ccc	tca	ggt	gtg	tgg	gaa	778
	Thr	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Leu	Lys	Val	His	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Glu	
				225					230				235				
60	ggg	gtg	aaa	ggg	tig	gtg	gag	gga	ggg	tgc	cct	cca	ggg	atg	gtc	cta	826
	Gly	Val	Lys	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Leu	
				240				245				250				255	

ES 2 276 416 T3

	atc gac gac ggg tgg caa gcc att tgi cac gac gag gac ccc ata acg	874
	Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ala Ile Cys His Asp Glu Asp Pro Ile Thr	
5	260 265 270	
	gac caa gag ggt atg aag cga acc tcc gca ggg gag caa atg cca tgc	922
	Asp Gln Glu Gly Met Lys Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys	
	275 280 285	
10	agg ttg tgg aag ttg gag gaa aat tac aag ttc aga cag tat tgt agt	970
	Arg Leu Val Lys Leu Glu Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Gln Tyr Cys Ser	
	290 295 300	
15	gga aag gat tct gag aag ggt atg ggt gcc ttt gtt agg gac ttg aag	1018
	Gly Lys Asp Ser Glu Lys Gly Met Gly Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys	
	305 310 315	
20	gaa cag ttt agg agc gtg gag cag gtg tat gtg tgg cac gcg ctt tgt	1066
	Glu Gln Phe Arg Ser Val Glu Gln Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys	
	320 325 330 335	
25	ggg tat tgg ggt ggg gtc aga ccc aag gtt ccg ggc atg ccc cag gct	1114
	Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Lys Val Pro Gly Met Pro Gln Ala	
	340 345 350	
30	aag gtt gtc act ccg aag ctg tcc aat gga cta aaa ttg aca atg aag	1162
	Lys Val Val Thr Pro Lys Leu Ser Asn Gly Leu Lys Leu Thr Met Lys	
	355 360 365	
35	gat tta gcg gtg gat aag atc gtc agt aac gga gtt gga ctg gtg cca	1210
	Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Ser Asn Gly Val Gly Leu Val Pro	
	370 375 380	
40	cca cac ctg gct cac ctt ttg tac gag ggg ctg cac tcc cgt ttg gaa	1258
	Pro His Leu Ala His Leu Leu Tyr Glu Gly Leu His Ser Arg Leu Glu	
	385 390 395	
45	tct gcg ggt att gac ggt gtt aag gtt gac gtt ata cac ttg ctg gag	1306
	Ser Ala Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu Leu Glu	
	400 405 410 415	
50	atg cta tcc gag gaa tac ggt ggc cgt gtt gag cta gcc aaa gct tat	1354
	Met Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Gly Arg Val Glu Leu Ala Lys Ala Tyr	
	420 425 430	
55	tac aaa gcg ctg act gct tgg gtg aag aag cat ttc aaa ggc aat ggg	1402
	Tyr Lys Ala Leu Thr Ala Ser Val Lys Lys His Phe Lys Gly Asn Gly	
	435 440 445	
	gtc att gcg agc atg gag cat tgt aat gac ttc ttt ctg ctt ggt acc	1450
	Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Phe Leu Leu Gly Thr	

ES 2 276 416 T3

	450	455	460	
5	gaa gcc ata gcc ctt ggg cgc gla gga gat gat ttt tgg tgc act gat	1498		
	Glu Ala Ile Ala Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp			
	465	470	475	
10	ccc tct gga gat cca aat ggc acg tat tgg ctc caa ggg tgt cac atg	1546		
	Pro Ser Gly Asp Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met			
	480	485	490	495
	gtg cac tgt gcc tac aac agc ttg tgg atg ggg aat ttt att cag ccg	1594		
	Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro			
15	500	505	510	
	gat tgg gac atg ttc cag tcc act cac cct tgt gcc gaa ttc cat gc	1642		
	Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala			
	515	520	525	
20	gcc tct agg gcc atc tct ggt gga cca gtt tac gtt agt gat tgt gtt	1690		
	Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Cys Val			
	530	535	540	
25	gga aag cac aac ttc aag ttg ctc aag agc ctc gct ttg cct gat ggg	1738		
	Gly Lys His Asn Phe Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Pro Asp Gly			
	545	550	555	
30	acg att ttg cgt tgt caa cac tat gca ctc ccc aca cga gac tgt ttg	1786		
	Thr Ile Leu Arg Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu			
	560	565	570	575
35	ttt gaa gac ccc ttg cat gat ggg aag aca atg ctc aaa att tgg aat	1834		
	Phe Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn			
	580	585	590	
	ctc aac aaa tat aca ggt gtt ttg ggt cta ttt aat tgc caa gga ggt	1882		
	Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly			
40	595	600	605	
	ggg tgg tgt ccc gla act agg aga aac aag agt gcc tct gaa ttt tca	1930		
	Gly Trp Cys Pro Val Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ala Ser Glu Phe Ser			
45	610	615	620	
	caa act gtg aca tgc tta gcg agt cct caa gac att gaa tgg agc aat	1978		
	Gln Thr Val Thr Cys Leu Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Ser Asn			
	625	630	635	
50	ggg aaa agc cca ata tgc ata aaa ggg atg aat gtg ttt gct gla tat	2026		
	Gly Lys Ser Pro Ile Cys Ile Lys Gly Met Asn Val Phe Ala Val Tyr			
	640	645	650	655

55

60

65

ES 2 276 416 T3

	ttg ttc aag gac cac aaa cta aag ctc atg aag gca tca gag aaa ttg	2074
	Leu Phe Lys Asp His Lys Leu Lys Leu Met Lys Ala Ser Glu Lys Leu	
5	660 665 670	
	gaa gtt tca ctt gag cca ttt act ttt gag cta ttg aca gtg tct cca	2122
	Glu Val Ser Leu Glu Pro Phe Thr Phe Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro	
	675 680 685	
10	gtg att gtg ctg tca aaa aag tta att caa ttt gct cca att gga tta	2170
	Val Ile Val Leu Ser Lys Lys Leu Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu	
	690 695 700	
15	gtg aac atg ctt aac act ggt ggt gcc att cag tcc atg gag ttt gac	2218
	Val Asn Met Leu Asn Thr Gly Gly Ala Ile Gln Ser Met Glu Phe Asp	
	705 710 715	
20	aac cac ata gat gtg gtc aaa att ggg gtt agg ggt tgt ggg gag atg	2266
	Asn His Ile Asp Val Val Lys Ile Gly Val Arg Gly Cys Gly Glu Met	
	720 725 730 735	
25	aag gtg ttt gca tca gag aaa cca gtt agt tgc aaa cta gat ggg gta	2314
	Lys Val Phe Ala Ser Glu Lys Pro Val Ser Cys Lys Leu Asp Gly Val	
	740 745 750	
30	gtt gta aaa ttt gat tat gag gat aaa atg ctg aga gtg caa gtt ccc	2362
	Val Val Lys Phe Asp Tyr Glu Asp Lys Met Leu Arg Val Gln Val Pro	
	755 760 765	
35	tgg cct agt gct tca aaa ttg tca atg gtt gag ttt tta ttt tga tccct	2412
	Trp Pro Ser Ala Ser Lys Leu Ser Met Val Glu Phe Leu Phe	
	770 775 780	
	gaaggatgaat ttgggatact atgaatgttgg actctctttt taagtaataa gagtcatatt	2472
	tttctgttgt aaaaaaaaaa aaaaaa	2498

<210> 5

<211> 587

45 <212> PRT

<213> *Stachys sieboldii*

<400> 5

50 Thr Asn Gly Ser Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gln Ile Val Val Leu Asp
1 5 10 15
55 Lys Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Ile Val Leu Leu Pro Leu Ile Glu Gly
20 25 30

ES 2 276 416 T3

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

ES 2 276 416 T3

	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Glu	His	Cys	Asn	Asp	Phe	Met	Phe	Leu	Gly
				340					345				350			
5	Thr	Glu	Ala	Ile	Thr	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Trp	Cys	Thr
			355				360					365				
	Asp	Pro	Ser	Gly	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Phe	Trp	Leu	Gln	Gly	Cys	His
10		370				375			380							
	Met	Val	His	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ile	Trp	Met	Gly	Asn	Phe	Ile	His
	385				390				395						400	
15	Pro	Asp	Trp	Asp	Met	Phe	Gln	Ser	Thr	His	Pro	Cys	Ala	Glu	Phe	His
				405				410					415			
	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	Ile	Tyr	Val	Ser	Asp	Ser
20			420				425				430					
	Val	Gly	Lys	His	Asn	Phe	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Pro	Asp
		435				440				445						
25	Gly	Ser	Ile	Leu	Arg	Cys	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Pro	Thr	Arg	Asp	Cys
	450				455				460							
	Leu	Phe	Glu	Asp	Pro	Leu	His	Asn	Gly	Lys	Thr	Met	Leu	Lys	Ile	Trp
	465			470				475				480				
30	Asn	Tyr	Asn	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Phe	Asn	Cys	Gln	Gly
				485				490				495				
	Gly	Gly	Trp	Ser	Arg	Glu	Val	Arg	Arg	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Glu	Tyr
35			500				505				510					
	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Trp	Lys
		515				520			525							
40	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ile	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Lys	Thr	Phe	Ala	Leu
	530				535			540								
	Tyr	Leu	Phe	His	Glu	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Pro	Ser	Asp	Lys
45	545			550			555				560					
	Ile	Asp	Ile	Thr	Leu	Glu	Pro	Phe	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile	Thr	Val	Ser
			565			570			575							
50	Pro	Val	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn	Cys	Thr	Val	Gln					
			580			585										

55 <210> 6
 <211> 1762
 <212> ADN
 <213> *Stachys sieboldii*
 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (2) .. (1762)
 65

ES 2 276 416 T3

<400> 6

5	g aca aac ggg tcg gat ctt gag cgg gaa act caa ata gtc gtg ctc	46
	Thr Asn Gly Ser Asp Leu Glu Arg Glu Thr Gln Ile Val Val Leu	
	1 5 10 15	
10	gac aag tcc gac gac agg ccc tac atc gtg ctg ctt ccg ctc atc gag	94
	Asp Lys Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Ile Val Leu Leu Pro Leu Ile Glu	
	20 25 30	
15	ggg cag ttt cgg gct tcc ctt cag ccc ggt gtg gat gat ttt atc gat	142
	Gly Gln Phe Arg Ala Ser Leu Gln Pro Gly Val Asp Asp Phe Ile Asp	
	35 40 45	
20	att tgt gtc gaa agc ggg tca acc aag gtc aac gag tcc tcg ttc cgt	190
	Ile Cys Val Glu Ser Gly Ser Thr Lys Val Asn Glu Ser Ser Phe Arg	
	50 55 60	
25	gct tcg ctc tac atg cac gcc ggt gat gac cct ttt acc ctg gtg aag	238
	Ala Ser Leu Tyr Met His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Thr Leu Val Lys	
	65 70 75	
30	gac gcc gtg aag gtg gcg cgc cac cac ctc ggg acg ttc agg ctg ctg	286
	Asp Ala Val Lys Val Ala Arg His His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu	
	80 85 90 95	
35	gag gag aaa act ccg ccg ggg atc gtc gac aaa ttc ggg tgg tgc acg	334
	Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr	
	100 105 110	
40	tgg gat gcg ttc tac ctc aac gtc cag ccc cac ggc gtt atg gag ggc	382
	Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Asn Val Gln Pro His Gly Val Met Glu Gly	
	115 120 125	
45	gtg cag ggg ctg gtt gac ggc gga tgt ccg ccg ggg ctg gtg ttg atc	430
	Val Gln Gly Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile	
	130 135 140	
50	gac gac ggg tgg cag tcc att lgt cac gac aac gac gcg ctc acc acc	478
	Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Cys His Asp Asn Asp Ala Leu Thr Thr	
	145 150 155	
55	gag ggg atg ggg aga acc tcc gcc gga gag caa atg ccc tgc agg ttg	526
	Glu Gly Met Gly Arg Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu	

ES 2 276 416 T3

	160	165	170	175	
	atc aag ttt gag gag aat tac aag ttc agg gag tac gag agc ccg aat				574
5	Ile Lys Phe Glu Glu Asn Tyr Lys Phe Arg Glu Tyr Glu Ser Pro Asn				
	180	185	190		
	aaa act ggg ccg ggc ccg aat acg ggg atg ggg gcc ttt att cgt gac				622
10	Lys Thr Gly Pro Gly Pro Asn Thr Gly Met Gly Ala Phe Ile Arg Asp				
	195	200	205		
	atg aag gac aat ttc aag agt gtg gac tac gtg tac gtg tgg cat gcg				670
15	Met Lys Asp Asn Phe Lys Ser Val Asp Tyr Val Tyr Val Trp His Ala				
	210	215	220		
	ttg tgt ggt tat tgg ggc ggg ctc agg ccc aat gtt ccg ggc ctg ccc				718
	Leu Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Asn Val Pro Gly Leu Pro				
	225	230	235		
20	gag gct aag ctc att gag ccc aaa ctg act cct ggg ctt aag acc acc				766
	Glu Ala Lys Leu Ile Glu Pro Lys Leu Thr Pro Gly Leu Lys Thr Thr				
	240	245	250	255	
25	atg gaa gat ttg gct gtt gat aag att gtc aac aat ggc gtg ggt ctg				814
	Met Glu Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Asn Asn Gly Val Gly Leu				
	260	265	270		
30	gtc cca ccg gag ttt gtt gaa caa atg tat gaa gga tta cat tca cat				862
	Val Pro Pro Glu Phe Val Glu Gln Met Tyr Glu Gly Leu His Ser His				
	275	280	285		
35	ctc gaa tct gtg ggg att gat gga gtc aaa gtt gac gtc atc cat ttg				910
	Leu Glu Ser Val Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Leu				
	290	295	300		
	ttg gaa atg ttg tgt gaa gac tat ggt ggg aga gtg gac tta gcc aag				958
40	Leu Glu Met Leu Cys Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys				
	305	310	315		
	gct tat tac aag gcc tta tca agc tca gtt aac aac cac ttc aac ggc				1006
	Ala Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Asn His Phe Asn Gly				
45	320	325	330	335	
	aac ggc gtc atc gct ggc ctg gag cac tgc aat gac ttc atg ttt ctc				1054
	Asn Gly Val Ile Ala Gly Leu Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu				
	340	345	350		
50	gga acc gag gcc att acc ttg ggt cgt gtc ggg gat gat ttt tgg tgc				1102
	Gly Thr Glu Ala Ile Thr Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys				
	355	360	365		
55	acg gat cca tct gga gal ccc aat ggc acg ttc tgg ttg caa ggg tgt				1150

ES 2 276 416 T3

	Thr	Asp	Pro	Ser	Gly	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Phe	Trp	Leu	Gln	Gly	Cys		
	370							375				380						
5	cac	atg	gig	cac	tgc	gcc	tac	aac	agc	ata	tgg	atg	ggt	aat	ttc	atc	1198	
	His	Met	Val	His	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ile	Trp	Met	Gly	Asn	Phe	Ile		
	385							390				395						
10	cac	cct	gat	tgg	gac	atg	ttt	caa	tgc	act	cac	cct	tgc	gct	gaa	ttc	1246	
	His	Pro	Asp	Trp	Asp	Met	Phe	Gln	Ser	Thr	His	Pro	Cys	Ala	Glu	Phe		
	400							405				410						415
15	cac	gct	gcc	tca	cga	gcc	atc	tcc	ggc	ggg	ccc	att	tac	gtc	agt	gac	1294	
	His	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	Ile	Tyr	Val	Ser	Asp		
	420							425				430						
20	tgc	gtc	gga	aag	cac	aac	ttc	gag	ctc	ctt	agg	agc	ctc	gtt	ctt	ccc	1342	
	Ser	Val	Gly	Lys	His	Asn	Phe	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Pro		
	435							440				445						
25	gat	ggc	tcc	atc	ctc	cgt	tgt	gat	tac	tac	gcg	ctt	ccg	act	cgc	gat	1390	
	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Arg	Cys	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Pro	Thr	Arg	Asp		
	450							455				460						
30	tgc	ctc	ttt	gaa	gat	cca	ctt	cac	aat	ggc	aag	act	atg	ctc	aaa	att	1438	
	Cys	Leu	Phe	Glu	Asp	Pro	Leu	His	Asn	Gly	Lys	Thr	Met	Leu	Lys	Ile		
	465							470				475						
35	tgg	aat	tat	aac	aag	ttc	acc	gga	gtt	gtc	gga	act	ttc	aac	tgc	caa	1486	
	Trp	Asn	Tyr	Asn	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Phe	Asn	Cys	Gln		
	480							485				490						495
40	ggt	ggc	ggg	tgg	agc	cgg	gaa	gig	cgt	cgc	aac	caa	tgc	gct	gcc	gag	1534	
	Gly	Gly	Gly	Trp	Ser	Arg	Glu	Val	Arg	Arg	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Glu		
	500							505				510						
45	tat	tcc	cac	gcc	gtc	tcc	tct	agc	gct	ggt	ccg	agt	gac	att	gag	tgg	1582	
	Tyr	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Trp		
	515							520				525						
50	aag	caa	gga	acg	agt	ccg	atc	gac	gtc	gac	ggc	gtc	aaa	aca	ttc	gcg	1630	
	Lys	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ile	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Lys	Thr	Phe	Ala		
	530							535				540						
55	ttg	tac	cta	ttc	cac	gag	aag	aaa	ctc	gtc	ctt	tct	aag	cca	tca	gac	1678	
	Leu	Tyr	Leu	Phe	His	Glu	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Pro	Ser	Asp		
	545							550				555						
60	aaa	atc	gac	atc	acg	ctt	gag	ccc	ttc	gat	ttt	gag	ctg	ata	acc	gtt	1726	
	Lys	Ile	Asp	Ile	Thr	Leu	Glu	Pro	Phe	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile	Thr	Val		
	560							565				570						575
	tct	cca	gtc	aaa	act	cta	gcc	aat	tgc	acc	gtc	caa					1762	
	Ser	Pro	Val	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn	Cys	Thr	Val	Gln						
	580							585										

ES 2 276 416 T3

<210> 7

<211> 271

<212> PRT

5 <213> *Zea mays*

<400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 993

65 <212> ADN

<213> *Zea mays*

ES 2 276 416 T3

<220>

<221> CDS

<222> (2) .. (817)

5

<400> 8

10	c cag tcc acg cac ccc tgc gcc gcc ttc cac gcc gcg tcc cgc gcc	46
	Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser Arg Ala	
	5 10 15	
15	atc tcc ggc ggg ccc atc tac gtc agc gac tgc gtg ggg cag cac gac	94
	Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Gln His Asp	
	20 25 30	
20	ttc gcg ctg ctc cgc cgc ctg gcg ctc ccc gac ggc acc gtc ctc cgg	142
	Phe Ala Leu Leu Arg Arg Leu Ala Leu Pro Asp Gly Thr Val Leu Arg	
	35 40 45	
25	tgc gag ggc cac gcg ctg ccc acg cgc gac tgc ctc ttc gcc gac ccg	190
	Cys Glu Gly His Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Ala Asp Pro	
	50 55 60	
30	ctc cac gac ggc cgg acc gtg ctc aag atc tgg aac gtg aac cgc ttc	238
	Leu His Asp Gly Arg Thr Val Leu Lys Ile Trp Asn Val Asn Arg Phe	
	65 70 75	
35	gcc ggc gtc gtc ggc gcc ttc aac tgc cag ggc ggc ggg tgg agc ccc	286
	Ala Gly Val Val Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Ser Pro	
	80 85 90 95	

40

45

50

55

60

65

ES 2 276 416 T3

gag gcg cgg cgg aac aag tgc ttc tgc gag ttc tcc gtg ccc ctg gcc 334
 Glu Ala Arg Arg Asn Lys Cys Phe Ser Glu Phe Ser Val Pro Leu Ala
 100 105 110
 gcg cgc gcc tgc ccg tcc gac gtc gag tgg aag agc ggc aag gcg ggg 382
 Ala Arg Ala Ser Pro Ser Asp Val Glu Trp Lys Ser Gly Lys Ala Gly
 115 120 125
 cca ggc gtc agc gtc aag gac gtc tcc cag ttc gcc gtg tac gcg gtc 430
 Pro Gly Val Ser Val Lys Asp Val Ser Gln Phe Ala Val Tyr Ala Val
 130 135 140
 gag gcc agg acg ctg cag ctg ctg cgc ccc gac gag ggc gtc gac ctc 478
 Glu Ala Arg Thr Leu Gln Leu Leu Arg Pro Asp Glu Gly Val Asp Leu
 145 150 155
 acg ctg cag ccc ttc acc tac gag ctc ttc gtc gtt gcc ccc gtg cgc 526
 Thr Leu Gln Pro Phe Thr Tyr Glu Leu Phe Val Val Ala Pro Val Arg
 160 165 170 175
 gtc atc tgc cat gag cgg gcc atc aag ttc gcg ccc atc gga ctc gcc 574
 Val Ile Ser His Glu Arg Ala Ile Lys Phe Ala Pro Ile Gly Leu Ala
 180 185 190
 aac atg ctc aac acc gcc ggc gcc gtg cag gcg ttc gag gcc aag aaa 622
 Asn Met Leu Asn Thr Ala Gly Ala Val Gln Ala Phe Glu Ala Lys Lys
 195 200 205
 gat gct agc ggc gtc acg gca gag gtg ttc gtg aag ggc gca ggg gag 670
 Asp Ala Ser Gly Val Thr Ala Glu Val Phe Val Lys Gly Ala Gly Glu
 210 215 220
 ctg gtg gcg tac tgc tgc gcg acg ccc agg ctc tgc aag gtg aac ggc 718
 Leu Val Ala Tyr Ser Ser Ala Thr Pro Arg Leu Cys Lys Val Asn Gly
 225 230 235
 gac gag gcc gag ttc acg tac aag gac ggc gtg gtc acc gtc gac gtg 766
 Asp Glu Ala Glu Phe Thr Tyr Lys Asp Gly Val Val Thr Val Asp Val
 240 245 250 255
 ccg tgg tgc ggg tgc tgc tgc aag ctg tgt tgc gtc cag tac gtc tac 814
 Pro Trp Ser Gly Ser Ser Ser Lys Leu Cys Cys Val Gln Tyr Val Tyr
 260 265 270
 tga gccggacggg ccgatgactc tgcgtctcgc ctcctcgcgc gccctgctcag gac 870
 280 285 290
 aiaatctaat gtttagagct taccaggitt tacagctcta tcagtttact ttgtttttc 930
 tgcctctcgt tttttaagaa ttatttctat tgtgtgaatt aalgagtgct ttccttclaa 990
 aaa 993

60 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

ES 2 276 416 T3

	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 1 (de la lista 1)	
	<400> 9	
5	aattttcaag catagccaag ttaaccacct	30
	<210> 10	
10	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2 (de la lista 1)	
	<400> 10	
20	gctcacaga taatgatgtt agtc	24
	<210> 11	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 3 (de la lista 1)	
	<400> 11	
35	atacaagtga ggaacttgac ca	22
	<210> 12	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 4 (de la lista 1)	
	<400> 12	
50	ccaaaccata gcaaacctaa gcac	24
	<210> 13	
55	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5 (de la lista 1)	
	<400> 13	
65	acaacagaaa aatatgactc ttattact	28

ES 2 276 416 T3

	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6 (de la lista 1)	
10	<400> 14	
	aaaagagagt caaacatcat agtatac	26
15	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 1 (de la lista 2)	
25	<400> 15	
	atggcaccac caagcataac caaaactgc	29
30	<210> 16	
	<211> 43	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2 (de la lista 2)	
40	<400> 16	
	atggcaccac caagcataac caaaactgca accctccaag acg	43
45	<210> 17	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 3 (de la lista 2)	
55	<400> 17	
	tcaaaataaa aactggacca aagac	25
60	<210> 18	
	<211> 30	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 276 416 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 4 (de la lista 2)		
5	<400> 18		
	tcaaaataaa aactggacca aagacaatgt		30
10	<210> 19		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5 (de la lista 2)		
20	<400> 19		
	atggctcaa gcataagcaa aactg		25
25	<210> 20		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6 (de la lista 2)		
35	<400> 20		
	atggctcaa gcataagcaa aactgtggaa ct		32
40	<210> 21		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 7 (de la lista 2)		
50	<400> 21		
	tcaaaataaa aactcaacca ttgac		25
55	<210> 22		
	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 8 (de la lista 2)		
65	<400> 22		
	tcaaaataaa aactcaacca ttgacaattt tgaagcact		39

ES 2 276 416 T3

<210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> *Vicia faba*

 <400> 23
 10 Gly Ile Lys Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr
 1 5 10 15
 His Trp Val Gly
 20

 15 <210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> *Vicia faba*

 <400> 24

 25 Ile Ile Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr
 1 5 10

 <210> 25
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*

 <400> 25
 35
 Gly Gly Cys Pro Pro Gly Phe Val Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln
 1 5 10 15

 40 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*
 45
 <400> 26

 50 Thr Ser Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Val Lys Tyr Glu Glu
 1 5 10 15
 Asn

 55 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*
 60
 <400> 27

 65 Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro
 1 5 10 15

 <210> 28

ES 2 276 416 T3

<211> 20

<212> PRT

<213> *Vicia faba*

5

<400> 28

	Thr	Met	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Lys	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	Val	Gly
	1				5					10					15	
10	Leu	Val	Pro	Pro												
				20												

<210> 29

15

<211> 23

<212> PRT

<213> *Vicia faba*

20

<400> 29

	Gly	Leu	His	Ser	His	Leu	Glu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asp	Gly	Val	Lys	Val
	1				5					10					15	
25	Asp	Val	Ile	His	Leu	Leu	Glu									
				20												

<210> 30

30

<211> 14

<212> PRT

<213> *Vicia faba*

35

<400> 30

	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Leu
	1				5					10				

40

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

45

<213> *Vicia faba*

<400> 31

	Val	Lys	Lys	His	Phe	Lys	Gly	Asn	Gly	Val	Ile	Ala
50	1				5					10		

<210> 32

55

<211> 46

<212> PRT

<213> *Vicia faba*

60

65

ES 2 276 416 T3

<400> 32

5	Glu	His	Cys	Asn	Asp	Phe	Phe	Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ile	Ser	Leu
	1				5					10					15	
	Gly	Arg	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Trp	Cys	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Asp	Pro
				20					25					30		
10	Asn	Gly	Thr	Tyr	Trp	Leu	Gln	Gly	Cys	His	Met	Val	His	Cys		
			35					40					45			

15 <210> 33
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*
 20 <400> 33

25	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Trp	Met	Gly	Asn	Phe	Ile	Gln	Pro	Asp	Trp	Asp
	1				5					10					15	
	Met	Phe	Gln	Ser	Thr	His	Pro	Cys	Ala	Glu	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Arg
				20					25					30		
30	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	Ile	Tyr	Val	Ser	Asp					
			35					40								

35 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*
 40 <400> 34

45	Leu	Pro	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Arg	Cys
	1				5				

<210> 35
 <211> 24
 50 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*
 55 <400> 35

55	Ala	Leu	Pro	Thr	Arg	Asp	Cys	Leu	Phe	Glu	Asp	Pro	Leu	His	Asn	Gly
	1				5					10					15	
	Lys	Thr	Met	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn								
60				20												

<210> 36
 <211> 13
 65 <212> PRT
 <213> *Vicia faba*

ES 2 276 416 T3

<400> 36
 Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp
 1 5 10
 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> *Vicia faba*
 <400> 37
 15 Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met
 1 5
 <210> 38
 20 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1) .. (32)
 30 <223> n = i
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 1-F (de la lista 4)
 35 <400> 38
 ttnaangtnt ggtggacnac ncantgggtn gg 32
 40 <210> 39
 <211> 41
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> base_modificada
 50 <222> (1) .. (41)
 <223> n = i
 <220>
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2-F (de la lista 4)
 <400> 39
 60 atnatngana anttnggntg gtgnacntgg gangcntnt a 41
 <210> 40
 <211> 41
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 276 416 T3

	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (41)	
5	<223> n = i	
	<220>	
10	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2-RV (de la lista 4)	
	<400> 40	
15	tanaangnt cccangtnca ccancnaaan ttntcnatna t	41
	<210> 41	
	<211> 44	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (44)	
	<223> n = i	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 3-F (de la lista 4)	
	<400> 41	
35	ggnggntgnc cncnggntt ngtnatnatn gangangnt ggca	44
	<210> 42	
40	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (44)	
	<223> n = i	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 3-RV (de la lista 4)	
55	<400> 42	
	tgccancnt cntcnatnat nacnaancn ggnggncanc cncc	44
60	<210> 43	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<221> base_modificada	

ES 2 276 416 T3

	<222> (1) .. (32)	
	<223> n = i	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 4-F (de la lista 4)	
	<400> 43	
10	aanaancant tnaanggnaa nggngtnatn gc	32
	<210> 44	
15	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (32)	
25	<223> n = i	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 4-RV (de la lista 4)	
30	<400> 44	
	gcnatnacnc cnttncntt naantgnttn tt	32
35	<210> 45	
	<211> 38	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> base_modificada	
45	<222> (1) .. (38)	
	<223> n = i	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5-F (de la lista 4)	
	<400> 45	
55	tggatgggna anttnatnca nccngantgg ganatgtt	38
	<210> 46	
	<211> 38	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (38)	
	<223> n = i	

ES 2 276 416 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5-RV (de la lista 4)	
5	<400> 46	
	aacatntccc antcnggntg natnaanttn cccatcca	38
10	<210> 47	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (27)	
20	<223> n = i	
	<220>	
25	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6-RV (de la lista 4)	
	<400> 47	
	catnttnacn arnccnatng gngcnaa	27
30	<210> 48	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (26)	
	<223> n = a, g, t o c	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético #8.2 (de la lista 5)	
	<400> 48	
50	aaracngcnc cnagyathat hgacaa	26
	<210> 49	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (20)	
	<223> n = a, g, t o c	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético #13.4 (de la lista 5)	

ES 2 276 416 T3

<400> 49

aarathtgga ayctnaacaa

20

5

<210> 50

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> base_modificada

15 <222> (1) .. (24)

<223> n = a, g, t o c

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético #7.4 (de la lista 5)

<400> 50

25

aargcnagrg tngtngtncc naag

24

<210> 51

<211> 21

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<221> base_modificada

<222> (1) .. (21)

<223> n = a, g, t o c

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético #13.3RV (de la lista 5)

<400> 51

45

yttrttnagr ttccadattt t

21

<210> 52

50

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<221> base_modificada

<222> (1) .. (21)

60

<223> n = a, g, t o c

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético #10.3RV (de la lista 5)

65

ES 2 276 416 T3

	<400> 52	
	yttrtcyter tanagraatt t	21
5	<210> 53	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-2RV (de la lista 6)	
15	<400> 53	
	ggctgaggtt cggttcattc ctgaatcatc	30
20	<210> 54	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-7 (de la lista 6)	
30	<400> 54	
	ccaaatggta catattggct ccaaggttgt	30
35	<210> 55	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-8 (de la lista 6)	
45	<400> 55	
	aagagtgtat ctgaattttc acgcgcggtg	30
50	<210> 56	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-9 (de la lista 6)	
60	<400> 56	
	tggtgcaatg ggaaaactcc aatgagcacc	30
65	<210> 57	
	<211> 30	

ES 2 276 416 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-10 (de la lista 6)	
	<400> 57	
10	atgaagtgtt ctgatatgatt gaaagtttcg	30
	<210> 58	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-11 (de la lista 6)	
	<400> 58	
25	cagtctctgg agtttgatga taatgcaagt	30
	<210> 59	
30	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-N (de la lista 7)	
	<400> 59	
40	cgcggatcca ccatggcacc accaagcata accaaaaactg c	41
	<210> 60	
45	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-C (de la lista 7)	
	<400> 60	
55	tgctctagat tatcaaaata aaaactggac caaagac	37
	<210> 61	
60	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<221> base_modificada	

ES 2 276 416 T3

	<222> (1) .. (35)	
	<223> n = i	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 1-F (de la lista 8)	
	<400> 61	
10	cgattnaang tntgtggac nacncantgg gtngg	35
	<210> 62	
15	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (45)	
25	<223> n = i	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2-RV (de la lista 8)	
30	<400> 62	
	ggcctanaan gentceccang tncaccancc naantntn atnat	45
35	<210> 63	
	<211> 41	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> base_modificada	
45	<222> (1) .. (41)	
	<223> n = i	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5-F (de la lista 8)	
	<400> 63	
55	cgatggatgg gnaanttnat ncancngan tggganatgt t	41
	<210> 64	
	<211> 32	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (32)	
	<223> n = i	

ES 2 276 416 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6-RV (de la lista 8)	
5	<400> 64	
	ggccacatnt tnacnarncc natngngcn aa	32
10	<210> 65	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SN-1 (de la lista 9)	
20	<400> 65	
	cacgaactgg ggcacgagac acagatgatg	30
25	<210> 66	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SC-3RV (de la lista 9)	
35	<400> 66	
	aagcaagtca cggagtgtga atagtcagag	30
40	<210> 67	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SC-5 (de la lista 9)	
50	<400> 67	
	acacgagact gtttgtttga agacccttg	30
55	<210> 68	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SC-6 (de la lista 9)	
65	<400> 68	
	tggaatctca acaaataac aggtg	25

ES 2 276 416 T3

	<210> 69	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SN-3RV (de la lista 9)	
10	<400> 69	
	gggtcatggc caacgtggac gtataagcac	30
15	<210> 70	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético SN-4RV (de la lista 9)	
25	<400> 70	
	gatgatcact ggcgcgggtt tctctcgag	30
30	<210> 71	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (35)	
	<223> n = i	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 1-F (de la lista 10)	
	<400> 71	
50	cgattnaang tntggtggac nacncantgg gtngg	35
	<210> 72	
55	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1) .. (37)	
	<223> n = i	
65	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 4-RV (de la lista 10)	

ES 2 276 416 T3

<400> 72

ggccagcnat nacncnttn ccntnaant gntntt

37

5

<210> 73

<211> 44

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> base_modificada

15 <222> (1) .. (44)

<223> n = i

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 2-F (de la lista 10)

<400> 73

25

cgaatnatng anaantnng ntggtgnacn tgggangcnt tnta

44

<210> 74

<211> 32

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<221> base_modificada

<222> (1) .. (32)

<223> n = i

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6-RV (de la lista 10)

<400> 74

45

ggccacatnt tnacnarncc natngngcn aa

32

<210> 75

50

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<221> base_modificada

<222> (1) .. (41)

60

<223> n = i

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 5-F (de la lista 11)

65

ES 2 276 416 T3

	<400> 75	
	cgatggatgg gnaanttnat ncancngan tggganatgt t	41
5	<210> 76	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<221> base_modificada	
15	<222> (1) .. (32)	
	<223> n = i	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 6-RV (de la lista 11)	
	<400> 76	
25	ggccacatnt tnacnarncc natngngcn aa	32
	<210> 77	
	<211> 25	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético M-10 (de la lista 12)	
	<400> 77	
40	gacgtcgagt ggaagagcgg caagg	25
	<210> 78	
	<211> 25	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético M-11 (de la lista 12)	
	<400> 78	
55	cacctacgag ctcttcgtcg ttgcc	25
	<210> 79	
	<211> 25	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:conector sintético BamSac-(+) (de la lista 13)	

ES 2 276 416 T3

	<400> 79	
	gatcgagctc gtgtcggatc cagct	25
5	<210> 79	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:conector sintético BamSac-(+) (de la lista 13)	
15	<400> 79	
	gatcgagctc gtgtcggatc cagct	25
20	<210> 80	
	<211> 17	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:conector sintético BamSac-(-) (de la lista 13)	
30	<400> 80	
	ggatccgaca cgagctc	17
35	<210> 81	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético 35S (de la lista 14)	
45	<400> 81	
	ttccagtatg gacgattcaa ggcttgcttc	30
50	<210> 82	
	<211> 25	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético NOS (de la lista 14)	
60	<400> 82	
	atgtataatt gcgggactct aatca	25
65	<210> 83	
	<211> 30	

ES 2 276 416 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-F (de la lista 14)	
	<400> 83	
10	aagagtgtat ctgaatttc acgcgcggtg	30
	<210> 84	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial:cebador sintético RS-RV (de la lista 14)	
	<400> 84	
25	accttcccat acaccttttg gatgaacctt caa	33
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		